



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**LİPOİK ASİTİN YAŞLI MEMELİ KALP FONKSİYONUNA ETKİSİNİN
YAŞLANMA MODELİ GELİŞTİRİLMİŞ VENTRİKÜLER H9C2 HÜCRE
HATTINDA MİTOKONDİRİ FONKSİYONU İNCELENEREK
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Gülay SENCAR

**DİSİPLİNLERARASI GIDA, METABOLİZMA VE KLİNİK BESLENME
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

PROF. DR. Nuray YAZIHAN

ANKARA

2021

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**LİPOİK ASİTİN YAŞLI MEMELİ KALP FONKSİYONUNA ETKİSİNİN
YAŞLANMA MODELİ GELİŞTİRİLMİŞ VENTRİKÜLER H9C2 HÜCRE
HATTINDA MİTOKONDİRİ FONKSİYONU İNCELENEREK
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Gülay SENCAR

DİSİPLİNLERARASI GIDA, METABOLİZMA VE KLİNİK BESLENME

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Nuray YAZIHAN

İKİNCİ DANIŞMAN

Prof. Dr. Belma TURAN

**Bu araştırma TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek Programı 119S984 numaralı projesi
ile desteklenmiştir.**

ANKARA

2021

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırladığım “Lipoik Asitin Yaşlı Memeli Kalp Fonksiyonuna Etkisinin Yaşlanma Modeli Geliştirilmiş Ventriküler H9c2 Hücre Hattında Mitokondri Fonksiyonu İncelenerek Değerlendirilmesi” başlıklı tez bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanlarım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler ve yorumları bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı, Soyadı: Gülay Sencar

Tarih:

İmza:

İÇİNDEKİLER

Etik beyan	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	iv
Simgeler ve kısaltmalar	v
Şekiller	vi
1.GİRİŞ	1
1.1. Yaşlanma	1
1.2. Kalbin Yapısı ve Kardiyovasküler Yaşlanma	2
1.3. Yaşlanma ve Mitokondri Fonksiyonları	2
1.4. Mitokondri Aracılı Reaktif Oksijen Türleri Üretimi	5
1.5. Antioksidanlar ve Alfa Lipoik Asit	6
2. GEREÇ VE YÖNTEM	8
2.1. H9C2 Hücre Kültürü Üretilmesi ve Kullanılması	8
2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması	8
2.3. Elektrofizyolojik Ölçümler	9
2.3.1. Mitokondri Membran Potansiyelinin Ölçülmesi	9
2.3.2. Konfokal Mikroskop ile ROS Ölçümü	10
2.4. Biyokimyasal Ölçümler	10
2.4.1. MTT Hücre Canlılık Ölçümü	10
2.4.2. Total Antioksidan Durum (TAS) / Total Oksidan Durum (TOS) Ölçümü	10
2.4.3. Western Blot Tekniği ile Protein Seviyesi Ölçülmesi	11
2.5. Kullanılan Kimyasallar	12
2.6. İstatiksel Analiz	12
3. BULGULAR	13
4. TARTIŞMA	28
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	33
ÖZET	34
SUMMARY	35
KAYNAKLAR	36
ÖZGEÇMİŞ	42

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezim olarak gerçekleştirdiğim bu çalışmada alfa lipoik asidin yaşlanmaya bağlı kalp fonksiyon bozukluğundaki rolünün mitokondri üzerinden araştırılması amacıyla sıçan ventrikül hücre hattı olan H9c2’de yaşlanma modeli oluşturularak bu antioksidanın etkileri değerlendirilmiştir. Bu çalışma sonuçlarının lipoik asidin etkilerini değerlendirecek diğer çalışmalara öncülük etmesini dilerim.

Bu tez çalışmamda her türlü olanağı sağlayarak yanımda olan başta tez danışmanım Prof.Dr. Nuray YAZIHAN, eş-danışmanım Prof.Dr. Belma TURAN olmak üzere Disiplinlerarası Gıda, Metabolizma ve Klinik Beslenme ve Biyofizik anabilim dalları öğretim üyelerine, deneylerimin yürütülmesinde yardımcı olan Öğr.Gör.Dr. Burcu Kesikli hocama, bölüm arkadaşlarıma ve en önemlisi her zaman yanımda olan canım aileme teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
ATP	Adenozin Trifosfat
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
MtDNA	Mitokondriyal Deoksiribo Nükleik Asit
GTPaz	Guanozin Trifosfataz
ER	Endoplazmik Retikulum
MFN1	Mitofüsin1
MFN2	Mitofüsin2
DRP1	Dinamin 1 İlişkili Protein
FIS1	Mitokondriyal Fisyon 1 Protein
ACTB	Anti Beta Aktin
ETS	Elektron Taşıma Sistemi
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
α -LA	alfa Lipoik Asit
DHLA	Dihidro Lipoik Asit
BD-IX	Berlin Drucksey IX Rat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
JC-1	5,5',6,6'-tetrakloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazol- Karbosiyaniniyodid
FCCP	Fenilhidrazol
DCF-DA	2',7'-Diklorofloresin Diasetat
MTT	Metiltiazol Difenil Tetrazolyum
ABTS	2,2'-Azino-bis Diamonyum Tuzu
FBS	Fetal Bovine Serum
DGAL	D-Galaktoz
TAS	Total Antioksidan Durum
TOS	Total Oksidan Durum

ŞEKİLLER

Şekil 3.1. 24 saat lipoik asit uygulamasının hücre canlılığına etkisi	13
Şekil 3.2. Lipoik asidin 48 saat uygulamasının hücre canlılığına etkisi	14
Şekil 3.3. Lipoik asidin 24 saat ve 48 saat uygulamasının hücre canlılığına etkisinin karşılaştırılması	15
Şekil 3.4. MFN1, MFN2, FIS1 ve β -aktin'e ait immuno-blot	16
Şekil 3.5. Ölçülen proteinlerin orantısal değerleri	18
Şekil 3.6. Hücrelerin 6 saatlik lipoik asit inkübasyonu sonrası mitokondri membran potansiyelinin konfokal mikroskopu ile incelenmesi	19
Şekil 3.7. Hücrelerin 24 saatlik lipoik asit inkübasyonu sonrası mitokondri membran potansiyelinin konfokal mikroskopu ile incelenmesi	20
Şekil 3.8. Konfokal mikroskopu ile 48 saatlik lipoik asit inkübasyonu yapılmış hücrelerde mitokondri membran potansiyelinin incelenmesi	21
Şekil 3.9. Hücrelerin 24 saat D-galaktoz ve lipoik asit inkübasyonu sonrası ROS seviyelerinin konfokal mikroskopu ile incelenmesi	22
Şekil 3.10. 48 saat D-galaktoz, 24 saat lipoik asit inkübasyonu sonrası ROS seviyeleri	23
Şekil 3.11. Hücrelerin 48 saat D-galaktoz ve lipoik asit inkübasyonu sonrası ROS seviyelerinin konfokal mikroskopu ile incelenmesi	23
Şekil 3.12. H9c2 hücrelerinde total antioksidan durumun (TAS) kuantitasyonu	25
Şekil 3.13. H9c2 hücrelerinde total oksidan durumun (TOS) incelenmesi	26
Şekil 3.14. Oksidatif Stres İndeksinin 6, 24 ve 48 saat lipoik asit inkübasyonu sonrası gruplar arası karşılaştırılması	27

1.GİRİŞ

1.1. Yaşlanma

Dünya Sağlık Örgütünün tanımına göre doğumdan ölüme kadar devam eden bir süreç olan yaşlanma, çevresel faktörlere adaptasyon yetisinin zamanla giderek azalmasıdır. Yaşlılık kardiyovasküler hastalıklar için en önemli risk faktörlerinden biri olup yaşlılıkla beraber organlarda ve damar sisteminde meydana gelen ilerleyici yapısal ve fonksiyonel değişiklikler kardiyovasküler hastalık gelişme riskini artırmaktadır. Dünyadaki çeşitli kuruluşlar tarafından yapılan araştırmalardaki yaşlanma raporuna göre, yaşlanmanın sol ventrikülde hipertrofi prevalansını arttırdığı, diyastolik fonksiyon bozukluğuna yol açtığı, atriyal fibrillasyon insidansını arttırdığı bildirilmiştir (Lakatta ve Levy 2003, Ferrucci 2008). Yaşlanma, genellikle organizmaların zamanla ve yavaş ilerleyen fonksiyon azalması olarak tanımlanmaktadır ve birbirine bağlı çeşitli hücresel fonksiyonların aynı anda bozulmasından kaynaklanmaktadır (Nussey ve ark. 2013). Çeşitli klinik ve deneysel çalışma sonuçları yaşlanmanın vücut ağırlığına ve yağ miktarına bağlı olmaksızın insülin direnci gelişimine neden olduğu ve altında birden fazla mekanizmanın yattığını göstermiştir. Normal insülin bağlanma süreçlerine rağmen insülin direncinin gelişmesinde postreseptör defektlerin varlığını işaret edilmiştir (Fink ve ark. 1983, Escriva ve ark. 2007, Evans ve Goldfine 2013). Hücresel seviyede yaşlanmaya bağlı kardiyomiyosit sayısında azalma ve azalan hücre sayısının kompensasyonu olarak kardiyomiyositlerde büyüme (hipertrofi) gözlenmektedir (Olivetti ve ark. 1991). Ayrıca yaşlanmaya bağlı olarak çeşitli sinyal mekanizmalarının bozulduğu, iyon kanallarının ve reseptörlerin fonksiyonlarının değiştiği ile ilgili çalışma sonuçları literatürde mevcuttur (Xiao ve ark. 1994, Fares ve Howlett 2010, Dai ve ark. 2014). Yaşlanmanın nedenlerini açıklamak için çeşitli mekanizmalar bulunmaktadır. Bu mekanizmalar; serbest radikal reaksiyonlarının neden olduğu hasarlar, immünolojik fonksiyonlardaki değişiklikler, çekirdek DNA'sındaki yaşlanma genleri ve çekirdeksel

ve mitokondriyal genetik değişikliklerin somatik birikimi olarak ileri sürölmektedir (Harman 1991).

1.2. Kalbin Yapısı ve Kardiyovasköler Yaşlanma

Kalp kasılma faaliyetlerinin ömür boyu sürdürölmesi için enerji ihtiyacı sürekli devam eden bir organdır. Mitokondriyal oksidatif enerjiye bağlı olduğundan mitokondriden zengindir. Mitokondride oksidatif fosforilasyon ile üretilen ATP gelişim evrelerine göre farklılık göstermektedir. Fetal gelişim sırasındaki mitokondri daha küçük krista, perinökleer lokalizasyon ile farklı bir biyoenerjitik fenotip sunmaktadır. Olgunlaşmamış mitokondride daha az oksidatif metabolizma bileşenleri içerirken, daha fazla glikolitik enerji bileşenleri sunmaktadır (Chung ve ark. 2007).

Yaşlanma ile birlikte kalp işlevlerinde azalma ve bozulmalar meydana gelirken hücrel olarak kardiyomiyositlerde hipertrofi ve otofaji görölmektedir. Normal şartlarda kardiyomiyositlerin enerji ihtiyacı oksidatif hasara maruziyeti arttırdığından otofaji gereklidir. Yaşlanma ile azalan otofaji işlevsiz mitokondrilerin temizlenememesi yanında artan oksidatif hasar ile ilişkilidir. Yetersiz otofaji ve artan oksidatif stres altında hipertrofik sinyalle yanıt olarak artan protein sentezi ile hasarlı protein ve organeller birikmektedir. Buna ek olarak hipertrofik miyositlerin artmış enerji talebi disfonksiyonel mitokondriden ROS üretimini artırır sitokrom c salınımı ile kardiyomiyositlerde apoptoza neden olur (Shinmura 2016).

1.3. Yaşlanma ve Mitokondri Fonksiyonları

Yaşlanma kalbin yapısında ve fonksiyonunda ilerleyici bozulmalara neden olan bir süreçtir. Yapılan araştırma sonuçlarına göre genel olarak yaşlanma, kalpte hipertrofi,

fibroz, iltihap ve kasılma fonksiyon bozuklarına neden olmaktadır. Yüksek enerji gerektiren bir organ olan kalp mitokondriden oldukça zengindir ve dokunun %35'i mitokondriden meydana gelmiştir (Page ve McCallister 1973). Yapılan çalışmalar, bu nedenelerle mitokondrilerin etkisinin yaşlanma mekanizmasında önemli rol oynadığını göstermektedir. Her bir mitokondrinin aktivitesi normal olarak yaşla birlikte çeşitli nedenlerle azalmakta ve bunu takiben dokulardaki biyoenerji kapasitesinin düşmesi sonucu yaşla ilgili hastalıklar ortaya çıkmaya başlamaktadır. Artan oksidatif stresle birlikte hücrede mitokondri hasarına bağlı reaktif oksijen türleri (ROS) ve sitokrom C gibi hücre nekrozunu ve apoptozunu indükleyen moleküller salınmaktadır. Yaşlanma da bu stresin kaynaklarından biridir (Dutta ve ark. 2012). Fizyolojik koşullarda mitokondri tarafından sürekli olarak üretilen ROS, glutatyon ve süperoksit dismutaz antioksidan enzimleri ile sürekli dengede tutulmaktadır. Serbest radikal yaşlanma teorisi ile birlikte mitokondri yaşlanma alanında çalışmaların odağı haline gelmiştir (Harman 2002). Bu teoride mitokondride görülen yaşlanma ile ROS'un artması ve buna bağlı hücre hasarı ile yaşlanmanın daha da tetiklenmesi söz konusudur (Bokov ve ark. 2004).

Kardiyomiyositlerde hücresel olarak yaşla birlikte sayıca azalma görülürken miktarca büyüme gözlenmektedir (Olivetti ve ark. 1991). Hücre sayısındaki azalma beraberinde mitokondride de sayıca azalmayı getirmektedir. Yapılan çalışmalar yaşa bağlı olarak mitokondriyal bütünlüğün azaldığını göstermektedir. Yaş ile birlikte mitokondriyal DNA'nın oksidatif hasara duyarlılığının arttığı bildirilmiştir. Yaşlanma ile ilgili mitokondriyal değişiklikler özellikle kalp ve kas dokudaki düşüşün ana nedeni olarak görülmektedir. Yaşlanan dokuda mitokondri sayı ve yoğunluğundaki azalmaya ek olarak mitogeneze düşüş, ATP sentezinde ve solunum kapasitesinde bozulma, mitokondriyal dinamiklerde değişimler yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Boengler ve ark. 2017). Ayrıca yaşlanan dokuda mitokondriyal DNA'da (mtDNA) delesyonlar görülmüş bunların nedeni olarak ise mtDNA'nın reaktif oksijen türleri kaynağına yakınlığı dolayısı ile oksidatif hasar gösterilmiştir (Richter 1995).

Geçmiş çalışmalar yaş ile mitofajinin ilişkili olduğunu ortaya koymuş, mitokondriyal dinamikler ile mitofaji ilişkişli görülmüştür. Mitokondriyal füzyon ve fizyon proteinleri mitokondri dinamiklerinde rol oynayan GTPazlardır ve füzyonda görevli üç GTPaz bulunmaktadır. Bunlardan MFN1(mitofüsin1) ve MFN2(mitofüsin2)

mitokondri dış zarının füzyonuna katılan proteinler iken, OPA1 iç mitokondriyal membranda yer almaktadır. Mitokondriyal fisyonu düzenleyen GTPaz'lar ise dış zarda FIS1, sitozolde DRP1'dir. Dış membran uzamasından sorumlu füzyon proteinlerinden MFN2'nin MFN1'den farklı olarak bir görevi de endoplazmik retikulum (ER) ile bağlantı kurarak kalsiyum iyonu (Ca^{+2}) sinyalini ER'den mitokondriye iletmesidir. Bu özelliği özellikle Ca^{+2} 'nin önemli olduğu kalp dokusunun işlevini iyi yapabilmesi açısından önemlidir (Seo ve ark. 2010). Fizyon ve füzyon arasındaki denge mitokondriyal bütünlüğün korunması açısından gereklidir. Füzyon aktivitesindeki bir artış, mitokondriyal uzamaya yol açarken, fizyon aktivitesindeki bir artış, mitokondriyal parçalanma ile sonuçlanmaktadır (Chan 2006). Mitokondri biyogenezindeki düşüş ve mitokondriyal aktivitedeki bozukluklar mitokondri dinamiklerinde dengesizliklere yol açarak, artmış ROS ve azalmış enerji üretimi ile ilişkili olmaktadır (Roy ve ark. 2015). Mitokondriyal fizyonun füzyondan fazla olduğu durumlarda ise sitokrom C artışı dolayısı ile hücre ölümü ile karşılaşmaktadır. Mitokondri fonksiyon bozukluğuna neden olan FIS1, DNA hasarına neden olan ROS seviyelerinin artmasına da neden olmaktadır. Yani oksidatif stres ve artan ROS oluşumu mitokondriyal fizyon ile ilişkilidir. Aynı zamanda mitokondriyal fisyon artmış repolarizasyonla da ilişkili bulunmuştur (Tanaka ve ark. 2010). Yapılmış in vitro çalışmalarda baskılanmış fizyonun artmış ATP sentezi ile de ilişkili olduğu görülmüştür (Jendrach ve ark. 2008). Bütün bunların ana nedeni ise fisyon ve füzyondaki dengesizlik sonucu ETS aktivitesinde düşüş, dolayısı ile ATP üretiminde azalma, mitokondri fonksiyon bozukluğuna bağlı membran potansiyelinde azalma, solunumda azalma ve Ca^{+2} iyon düzenlenmesinde azalma şeklinde açıklanabilir. Tüm bu sonuçlar ise hücreyi apoptoza götürmektedir (Seo ve ark. 2010). Mitokondri fonksiyon bozukluğu; mitokondri biyogenezinde azalma, membran potansiyelinde değişme, mitokondri sayısındaki azalma ve hücre ve dokularda biriken ROS nedeniyle oksidatif proteinlerin aktivitelerinde değişme ile karakterizedir.

1.4. Mitokondri Aracılı Reaktif Oksijen Türleri Üretimi

Serbest radikaller eşlememiş elektrona sahip olan ve diğer moleküllerle elektron alışverişi yaparak onların yapılarını bozabilen bileşiklerdir. Süperoksit, hidroksil, peroksil, alkoksil, nitrik oksit, azot dioksit eşleşmemiş elektrona sahip olan reaktif oksijen türleridir. Hücrel olarak serbest radikallerin en büyük kaynağı mitokondride gerçekleşen elektron transport sistemi esnasındaki kaçaklardır(Espinosa-Diez ve ark. 2015). Oksidatif fosforilasyon ile ATP oluşurken ara ürün olarak tek (singlet) oksijen, hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri salınmaktadır. Mitokondriyal enzim olan sitokrom c oksidaz oksijenin %98'ini suya indirgerken, %1-2 süperoksit ve hidrojen peroksit oluşmaktadır (Halliwell 2006). Ancak dengesiz ROS seviyeleri diğer oksijen türlerinde, lipitlerde ve proteinlerde geri dönüşümsüz hasara yol açabilmektedir (Cao ve ark. 2001). Endojen olarak ROS hücre zarı, mitokondri, peroksisom, endoplazmik retikulumda üretilmektedir. Hücrede ROS üretimi; plazma membranında NADPH oksidaz, peroksisomda lipit oksidasyonu, mitokondride oksidatif fosforilasyon, sitoplazmada siklooksijenaz ve ksantin oksidaz gibi çoklu enzimler tarafından üretilmektedir (Dai ve ark. 2012). Hücre zarının yapısını oluşturan lipitler serbest oksijen radikalleri ile tepkimeye girerlerse bir dizi reaksiyon sonucu lipit peroksidasyonu gerçekleşmekte ve son ürün olarak malondialdehit (MDA) gibi reaktif aldehitler meydana gelmektedir. Bu zincir reaksiyon sonrası oluşan reaktifler membran yapısında ve dolayısıyla membrandaki iyonik geçişlerde ve sekresyonda bozulmaya neden olmaktadır (Halliwell ve Chirico 1993). Oksidatif stres etkisi ile serbest radikallere maruz kalan hücrelerin membran yapısında bozulmalar meydana gelmektedir. Mitokondri bileşenleri serbest radikallerin oluşum bölgesinde olduğundan oksidatif hasara karşı mitokondriyal genom çok duyarlıdır. Mitokondri fonksiyonu sonucu oluşan ROS özellikle DNA, proteinler, lipitler ve diğer moleküller ve hücrel bileşenlerle etkileşime girerek mitokondri fonksiyon bozukluğuna neden olmaktadır (Bhatti ve ark. 2017).

1.5. Antioksidanlar ve Alfa Lipoik Asit

Aerobik metabolizma sonucu oluşan endojen ROS oluşumuna karşı vücutta hücresel ve dokusal çapta savunma sistemleri gelişmiştir (Sies 1993). Serbest radikaller ile bağ yaparak bu bileşiklerin hücre yapılarına zarar vermelerini önleyerek vücudun savunma mekanizmasını oluşturan yapılar antioksidan olarak adlandırılmaktadır. Antioksidanlar vücutta sentezlenebildikleri gibi diyetle dışardan da alınabilmektedirler. Vücutta sentezlenen endojen antioksidanlar enzim yapıda olan ve enzim yapıda olmayan şekilde ayrılmaktadırlar. Enzim yapıdaki endojen antioksidanlar; süperoksit dismutaz, sitokrom oksidaz, katalaz, glutatyon peroksidaz iken enzim olmayan endojen antioksidanlar α - tokoferol, β -karoten, α -lipoik asit, askorbik asit, albümin, billurubin, ferritin, glutatyon, seruloplazmin, laktoferrin, sistein, transferrin, melatonin, ürat şeklinde tanımlanmıştır. Bunların dışında besinlerle ekzojen olarak alınabilen antioksidanlar da bulunmaktadır. Bunlar vitamin ve minerallerin yanı sıra biyoaktif besin bileşenleri de olabilmektedir (Yu 1994). Bu bileşikler oksidanlarla tepkimeye girerek, yağların peroksidasyonunu önleyerek ya da pro oksidan özellikler göstererek ROS hasarının önüne geçebilmektedir (Vertuani ve ark. 2004).

Alfa lipoik asit mitokondriyal dehidrojenaz enzimlerinde görev alan ve vücutta doğal olarak sentezlenebilen bir antioksidandır (Solmonson ve DeBerardinis 2018). 1,2-ditiolan-3-pentanoik asit ya da 6,8-tioktik asit olarak da kimyasal adlandırılması yapılmaktadır. Son yıllarda E.coli'nin biyokimyasal analizi ile lipoik asit biyosentezi mekanizmaları ile aydınlatılmıştır (Cronan 2014). İlk kez 1951'de çok yüksek miktarda sığır karaciğerinden doğal olarak elde edilmiştir ancak lipoik asidin sentetik formu kullanılmaktadır ve bu formu R ve S enantiyomerlerini içermektedir (Reed 1953). Mitokondrisi yoğun olan kalp, böbrek, karaciğer gibi hayvansal dokular ve yeşil yapraklı sebzeler besinsel kaynaklarıdır (Kramer ve ark. 2001). Asıl görevi enerji metabolizmasında pürivattan asetil coA meydana getiren pürivat dehidrojenaz enziminin koenzimi olmasıdır. Hücreler için metabolik enerji sağlanırken glikoliz ve sitrik asit döngüsü ile pürivattan asetil coA oluşumunda pürivat dehidrojenaz enzim kompleksi kilit noktada yer almaktadır. Bu enzim kompleksi 3 alt birimden oluşmuş

ve E2 alt biriminde coA'dan asetil coA oluşmakta, burada dihidrolipoil asetil transferaz enzimi aracılığı ile lipoil parçası açıl grubunu eklemektedir. Dihidrolipoil dehidrojenaz olan E3 alt birimi ise E2'nin lipoil parçasındaki disülfid bağının yenilenmesi ve başka bir döngünün katalizlenmesi için hazırlık yapılmasından sorumlu olmaktadır (Cronan ve ark. 2005).

Yapılan çalışmalarda lipoik asitin singlet oksijen, hidrojen peroksit, hidroksil gibi serbest radikalleri azaltarak antioksidan olarak görev yaptığı ortaya konmuştur. Ayrıca α -LA ve redükte formu DHLA; radikallerin baskılanması, metal şelasyonu, amfifilik karakter, biyoyararlanım ve güvenilirlik gibi özelliklere sahip olmakla antioksidan olma potansiyelini fazlasıyla karşılamaktadır. Lipoik asit endojen enzimatik olmayan şeklinde antioksidan sınıflamada yer alabilir. Lipoik asitin redükte formu olan dihidrolipoik asidin (DHLA) antioksidan fonksiyonlarda daha etkin olduğu belirtilmiştir (Moini ve ark. 2002). Alfa lipoik asit ve dihidrolipoik asit antioksidan etkilerini serbest radikalleri süpürerek göstermektedir.

Kalp fonksiyonları ve mitokondri üzerinde lipoik asidin etkilerini değerlendiren çalışmalarda 30 μ M üzeri dozlarının Ca^{+2} akımlarını azalttığı ve mitokondri membran geçirgenliğini azalttığı belirtilmiştir (Saris ve ark. 1998). Miyokardiyal iskemi/reperfüzyon sırasında oluşan otofajiyi yine lipoik asit takviyesinin azalttığı gözlemlenmiştir (Cao ve ark. 2013).

Bu tez çalışmasında, alfa lipoik asidin yaşlanmaya bağlı kalp fonksiyon bozukluğundaki rolünün mitokondri üzerinden araştırılması hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda sıçan ventrikül hücre hattı olan H9c2'de yaşlanma modeli oluşturularak bir antioksidan olan alfa lipoik asitin mitokondri fonksiyonu üzerindeki etkilerinin incelenmesi planlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. H9C2 Hücre Kültürü Üretilmesi ve Kullanılması

BD-IX sıçan kalp dokusunun orijinal alt klonu olarak türetilen H9c2 hücre hattı enzimatik olarak yaşlandırıldı. Monolayer olarak kültüre edilen hücre hattı 105 hücre/cm² yoğunlukta, %1 penicillin ve %10 fetal sığır serum içeren medium besi ortamında 37 °C ve %5 CO₂ koşullarında büyütüldü. Bu hücre hattının hem yenidoğan hem de yetişkin kardiyomiyosit hücrelerinden fenotip olarak oldukça farklı olduğu ve çizgili kas miyofibrillerinin oluşumu için gerekli proteinlerden yoksun oldukları bilinmektedir (Zordoky ve El-Kadi 2007).

Enerji metabolizması ve mitokondriyal kütle bakımından H9c2 ile HL1 hücrelerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada H9c2 hücreleri daha yüksek hücre ATP seviyesi, daha yüksek mitokondriyal kütle ve solunum kapasitesi içerdiği, ventriküler hücreden türetilmiş olduklarından daha yüksek mitokondriyal içeriğe sahip oldukları belirtilmiştir (Kuznetsov ve ark. 2015).

Çalışmamızda kullanılan bu hücrelerin ortamları her iki günde bir değiştirildi. Hücreler %70-80 sıklığına ulaştığında 1:3 oranında flasklara yeniden ekildi. Hücreler bölünürken 3 ml TyrpLE ile 3 dk inkübatörde tutularak flaskın tabanından kaldırıldı, daha sonra 7 ml DMEM eklenip tüplere alındı. 1000 rpm’de 5 dk santrifüj sonrası pelet üstü atılıp üstüne DMEM eklenerek yeniden flasklara ekildi.

2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması

Ekilen flasklardan 1’inin deney gruplarını oluşturmak üzere bölünmesi sağlanırken 1 diğeri ise sürekli bölünüp kontaminasyona karşı donduruldu. Bölünen hücrelerden 1 grup kontrol olarak ayrıldı. Diğer gruplara 50 mg/ml D-galaktoz ile 24 saat ve 48 saat

muamele edilerek yaşlanma modeli oluşturuldu. Lipoik asit etkisinin gözlenmesi için kontrol ve D-galaktoz grupları 30, 100 ve 300 μM konsantrasyondaki lipoik asit ile inkübe edildi. Çalışma planımızda belirlediğimiz 6, 24, 48 saatlik inkübasyonlar gerçekleştirildikten sonra hücreler dondurulup deney aşamasına geçinceye dek saklandı.

2.3. Elektrofizyolojik Ölçümler

2.3.1. Mitokondri Membran Potansiyelinin Ölçülmesi

Başka bir mitokondriyal fonksiyon değerlendirme yöntemi olan mitokondri membran potansiyeli ($\Delta\psi$) de çalışmamızda değerlendirildi. Bu yöntem için LEICA TCS SP5 konfokal mikroskop ile değerlendirme yapıldı. Mitokondri membran potansiyeli bakılırken JC-1 (5,5',6,6'-tetrakloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazol-karbosiyaniniyodid) ($5\mu\text{M}$, 45dk, 37 °C) adlı mitokondriyal depolarizasyonu belirlemek için kullanılan ve mitokondride biriken katyonik bir boya kullanılmaktadır. Normal şartlarda hücre dışına göre negatif olan hücre içi, mitokondriden daha pozitif halde bulunmaktadır. Yani mitokondri hücre içine göre daha negatif kalmaktadır. Konfokal mikroskopla belirlenen mitokondriyal membran potansiyeli bakılırken verilen katyonik boya daha negatif olan hücre mitokondrisine geçmekte 488 nm uyarılma birleşik halde bulunan boyanın 585 nm'ye yanıt veren ikinci kısmını uyarmakta ve kırmızı ışıma yapmaktadır. Hücre fenilhidrazol (FCCP, $5\mu\text{M}$) ile depolarizasyon durumuna geçtiğinde ise mitokondriden çıkıp daha geniş olan sitoplazmaya geçen iki komponentli boya ayrılmakta ve 535 nm'ye yanıt veren kısmı yeşil ışıma yapmaktadır. Bu şekilde mitokondrinin işlevselliği değerlendirilmektedir (Olğar Y., 2018).

2.3.2. Konfokal Mikroskop ile ROS Ölçümü

$\Delta\psi$ deki artış göreceli olarak daha yüksek ROS üretimi ile ilişkili bulunmaktadır. Bu nedenle çalışmada ROS ölçümü de değerlendirildi. ROS test kiti hücre içi ROS tayininde kullanılmaktadır. Hücreden geçebilen florojenik bir boya olan DCF-DA (10 μ M) kullanılmaktadır. DCF yüksek oranda floresandır ve yeşil ışık vermektedir. DCF-DA ROS'lar ile oksitlenerek hızlıca DCF'ye dönüşmektedir. Reaktif oksijen türleri için eksitasyon ve emisyon dalga boyları: Eex: 490 nm ve Eem: 530 nm kullanılacaktır. Hücrelerden bazal yanıt alındıktan sonra 100 μ M H₂O₂ verilerek maksimum ROS oluşumu gözlenmesi sağlanıp miktar indirekt olarak hesaplandı. Sonuç olarak konfokalde görüntülenen floresan yoğunluğu ROS yoğunluğu ile orantılı çıkmaktadır (Eruslanov ve ark., 2010).

2.4. Biyokimyasal Ölçümler

2.4.1. MTT Hücre Canlılık Ölçümü

Metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı hücre proliferasyon testlerinde yaygın olarak Metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT) kullanılmaktadır. Proliferasyona uğrayan hücrelerde dehidrojenaz enziminin aktivasyonu ile sarı renkli tetrazolyum tuzu mor renge dönüşmektedir. Renk değişiminin spektrofotometrik ölçümü ile hücre canlılıkları değerlendirilmektedir (Terzioğlu ve ark. 2013).

2.4.2. Total Antioksidan Durum (TAS) / Total Oksidan Durum (TOS) Ölçümü

TAS ölçümü için genellikle bir tip radikal kullanılır ve buna karşı gelişen antioksidan ölçümü gerçekleştirilir. Kimyasal olarak 2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-

sülfonik asit) diamonyum tuzu (ABTS) kullanılır. İndirgenmiş ABTS renksizdir. Oksitlenince mavi-yeşil ABTS⁺ rengini alır. Renkli ABTS⁺ oksitleyici bir ajanla muamele edilince indirgenerek tekrar orijinal rengine döner. Ölçüm bu şekilde gerçekleştirilmektedir.

TOS ölçümü için ise ferröz iyon-o-dianisidin kompleksi kullanılmaktadır. Deney gruplarının içerdikleri oksidanlar bu kompleks ile tepkimeye girdiklerinde ferrik iyonla dönüştürülür. Ferrik iyonun asidik ortamda ksilenol oranj ile oluşturduğu renk spektrofotometrik ölçüm ile örnekte bulunan oksidan moleküllerin total miktarını vermektedir (Altunhan 2011).

2.4.3. Western Blot Tekniği ile Protein Seviyesi Ölçülmesi

Spesifik bir proteini görüntülememizi sağlayan bir teknik olan western blot ile enerji metabolizmasında görev alan lipoik asitin mitokondriyal fonksiyonlarını değerlendirmek amacıyla MFN1, MFN2, DRP1 ve FIS1 mitokondri proteinleri bakılması planlandı. Western blot yöntemine geçmeden önce flasktan toplanıp -80 °C'ye kaldırılan hücreler çıkartılıp liziz buffer ile örneklerin yüklemeye hazır hale gelmesi sağlandı. Bradford Assay yöntemi ile her bir örnekteki hücre miktarı tayin edilmiş yüklenecek hücre miktarı belirlendi. Protein içeriği belirlendikten sonra 50 µg/ml'lik toplam proteine örnek yükleme tamponu ilave edilerek immuno-blot yöntemine geçildi (Yükleme tamponu: Gliserol; SDS 10%, 0,5 M Tris HCl pH 6,8, β-merkaptoetanol ve bromfenol 0,5%). Tüm protein ölçümleri için, protein miktarları eşitlenmiş olan örnekler %10 por çaplı dikey yönlü jellere yüklenmiş ve önce 80 V' da 1 saat sonra 150 V'luk sabit voltaj altında 2 saat yürütüldü. Elektrik alan altında ile ağırlıklarına göre ayrılan proteinler transfer cihazı yardımıyla 30 dakika süresince PVDF membrana transfer edildi. Bu aşamadan sonra membranlar TTBS (solüsyonunda (%3 oranında albumin içeren) %0,1 Tween-20, 10 mM Tris ve 150 mM NaCl) alındı ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon aşamasının ardından %3 oranında albumin içeren TTBS solüsyonunda birincil antikorlar (MFN-1, MFN-2, DRP-1, FIS-1) protokole uygun hazırlanıp 1 gece +4 °C'de inkübasyona bırakıldı. Bir gün sonra membranlar TTBS solüsyonu ile 3 defa 10' ar dakika süreyle yıkama

işleminin ardından ikincil antikorlama aşamasına geçildi. Daha sonra membranlar tekrar yıkanarak ECL substratı olan luminol ile ışımaya yapılması sağlanarak hassas X-ışını radyografi filmleri yardımıyla görüntüleme yapıldı. Elde edilen protein bant görüntüleri ImageJ programı kullanılarak analiz edildi.

2.5. Kullanılan Kimyasallar

Hücre kültüründe kullanılan malzemeler: α lipoik asid, D-galaktoz, DMEM, fetal sıgır serumu (FBS), penicillin, streptomisin, tripsin, PBS (fosfat tamponu)

Western Blot deneyinde kullanılan malzemeler: TrisHCl, TEMED, amonyum persülfat (APS), sodyum dodesil sülfat (SDS), glisin, Tween-20, beta merkaptotanol, bromfenol, gliserol, albumin, etanol, RIPA, EDTA, PMSF, proteaz inhibitörü, ECL, TBS-T (tween eklenmiş tris tamponu)

Mikroskopik ve kolorimetrik inceleme boyaları: DCDFDA-Am, JC-1 (5,5',6,6'-tetrakloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazol-karbosiyaniniyodid), FCCP (fenilhidrazol), TyrpLE, 2 2'-azino-bis diamonyum tuzu (ABTS), metil bifenil tetrazolyum (MTT).

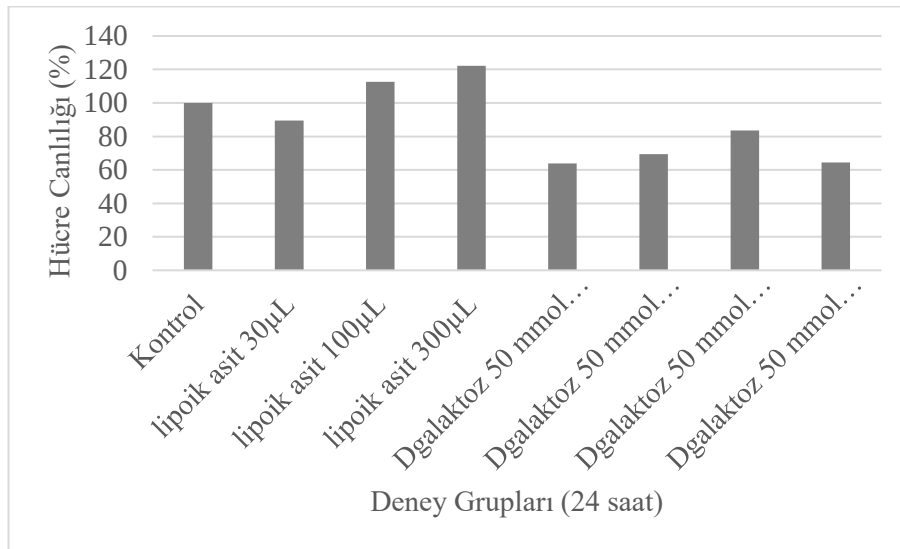
2.6. İstatiksel Analiz

Değerler arasındaki farkın istatistiksel olarak değeri SPSS 20.0 kullanılarak değerlendirildi. Çalışma sonucunda elde edilecek verilerin dağılımları değerlendirildikten sonra değerler arasındaki farkın istatistiksel olarak değeri ANOVA (TUKEY post-hoc) veya Student t-testi (one-tailed) kullanılarak analiz edildi. İstatiksel olarak anlamlılığın değerlendirilemediği veriler için gruplar arası kat artışı baz alındı.

3. BULGULAR

3.1. DGAL veya LA Uygulamalarının H9C2 Hücre Hattı Canlılığına Etkisi

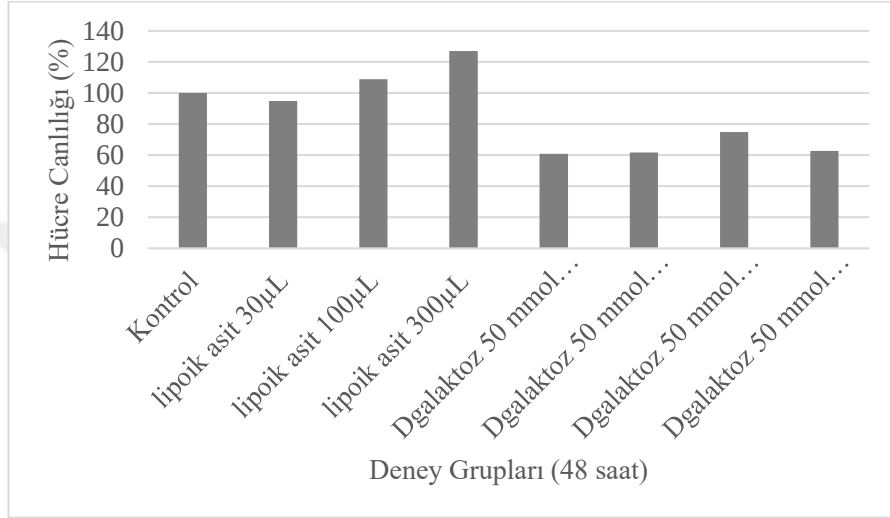
MTT testi ile hücrenin indirgeme potansiyeline bağlı hücre canlılığı spektrofotometrik olarak analiz edildi. 24 saat için kontrol grubuna göre 100 ve 300 μ M lipoik asit verilen gruplarda hücre canlılığının arttığı belirlendi. Yaşlandırılmış DGAL grubunda hücre canlılığının %63,77 olduğu başka bir ifade ile hücrelerin yaşlandırma modelinin çalıştığı gösterildi (Şekil 3.1.). Yaşlanma sonrası lipoik asit verilen gruplarda hücre canlılığı değerlendirildiğinde 30 μ M (%69,4), 100 μ M (%85,55) ve 300 μ M (%64,33) lipoik asit uygulanan DGAL grubunda hücre canlılığı korunduğu gözlemlendi. Bununla birlikte DGAL gruplarında 24 saat lipoik asit uygulamasının hücre canlılığını arttırdığı görüldü.



Şekil 3.1. 24 saat lipoik asit uygulamasının hücre canlılığına etkisi

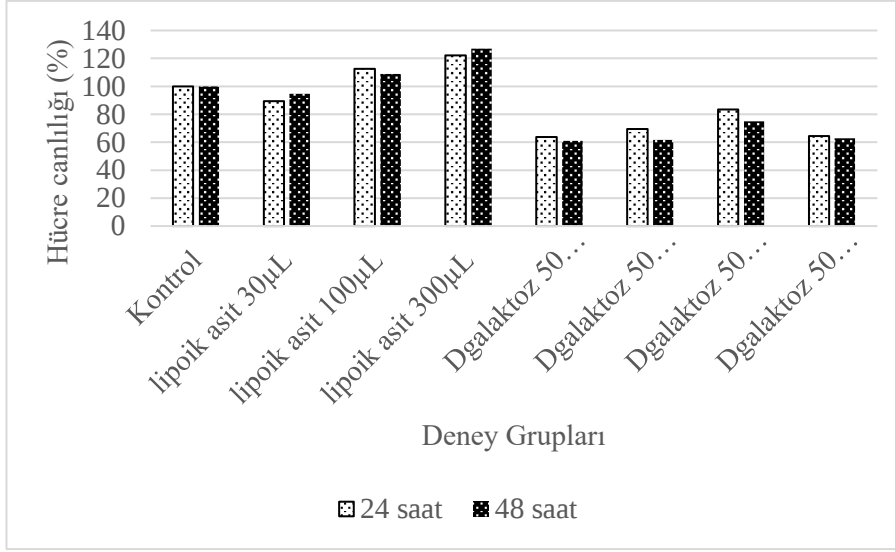
48 saat lipoik asidin etkisi değerlendirildiğinde kontrole göre 300 μ M lipoik asit verilen grupta hücre canlılığı %27 artmış, 48 saat süreyle yaşlandırılmış DGAL

grubunda hücre canlılığının %60,94 olduğu başka bir ifade ile hücrelerin yaşlandırma modelinin çalıştığı gösterildi. Yaşlanma sonrası lipoik asit verilen gruplarda hücre canlılığı değerlendirildiğinde 30 μ M (%61,66), 100 μ M (%74,87) ve 300 μ M (%62,77) lipoik asit uygulanan DGAL grubunda hücre canlılığı korunduğu gözlemlendi (Şekil 3.2.). Bununla birlikte DGAL gruplarında 48 saat lipoik asit uygulamasının hücre canlılığını arttırdığı görüldü.



Şekil 3.2. Lipoik asitin 48 saat uygulamasının hücre canlılığına etkisi

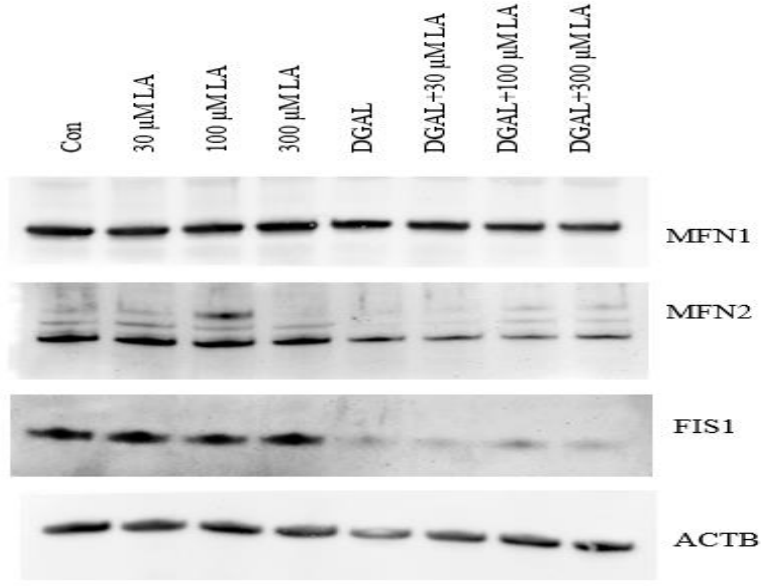
48 saat 50 mmol D-galaktoz uygulayarak oluşturulan kardiyomiyosit modeli H9c2 hücrelerini yaşlandırma modelinin çalıştığı gösterildi. 24 ve 48 saat verileri karşılaştırıldığında lipoik asitin koruyuculuğu iki koşulda da birbirine benzer bulundu (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Lipoik asitin 24 saat ve 48 saat uygulamasının hücre canlılığına etkisinin karşılaştırılması

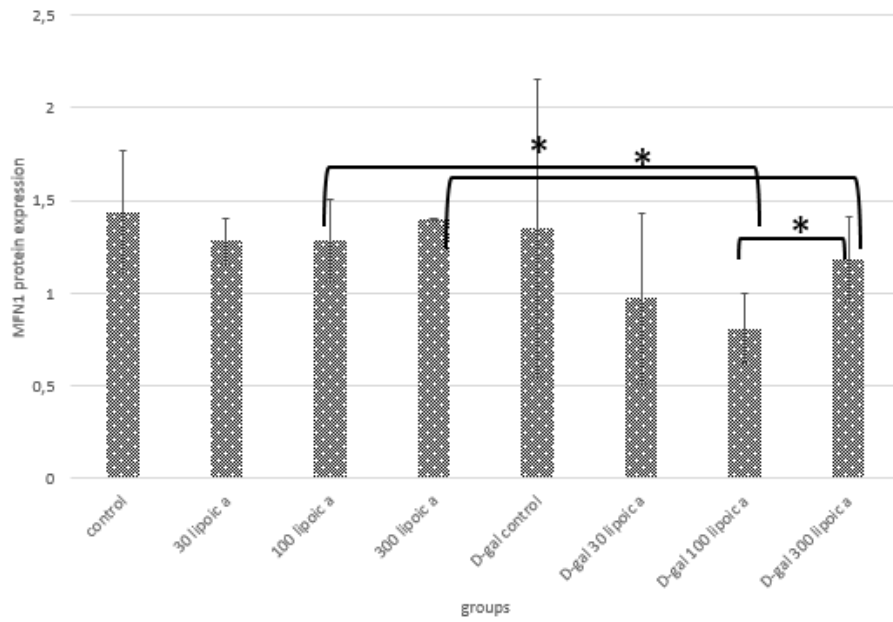
3.2. Lipoik Asit Uygulamasının Yaşlanma Modeli Oluşturulmuş Ventrikül Hücre Hattı H9C2'lerde Mitofusion/Mitofission Proteinlerine Etkileri

Kalpdeki en temel enerji üretim merkezi olan mitokondri fizyolojisinde yaşlanma ile füzyon süreçlerini düzenleyen mitofusion-1 (MFN1), mitofusion-2 (MFN2) ve fisyon süreçlerinde rol olan FIS1 ve DRP1 proteinleri Western Blot yöntemi ile ölçüldü. β -aktin kontrol antikoru olarak kullanıldı. İlgili proteinlerin densitometrik ölçümleri sonucu elde edilen miktarlar β -aktin protein miktarı ile normalize edilerek değerlendirildi (Şekil 3.4.).

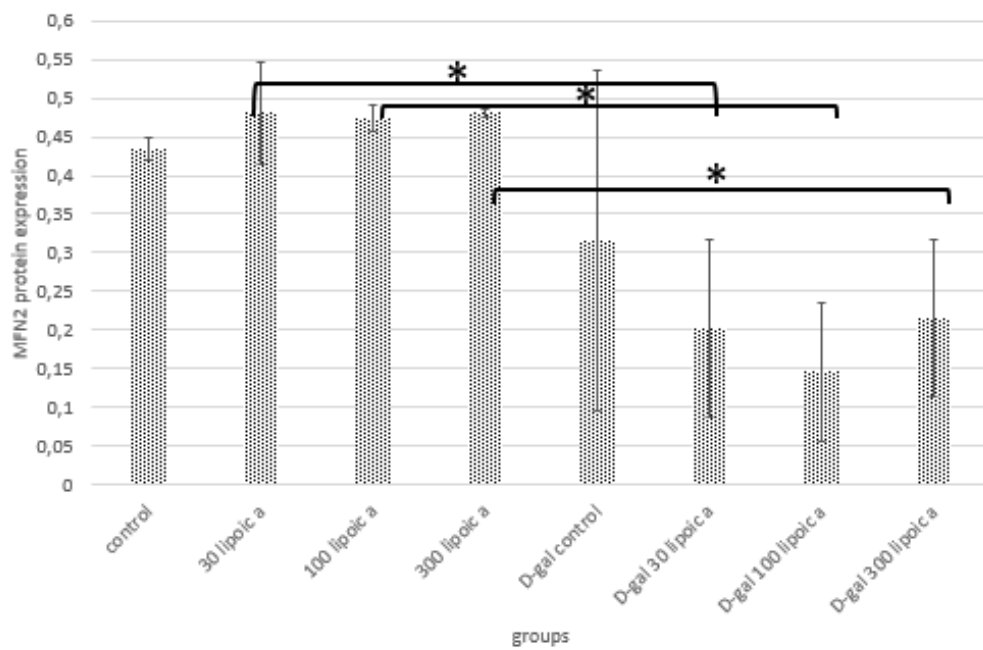


Şekil 3.4. MFN1, MFN2, FIS1 ve β -aktin'e ait immuno-blot

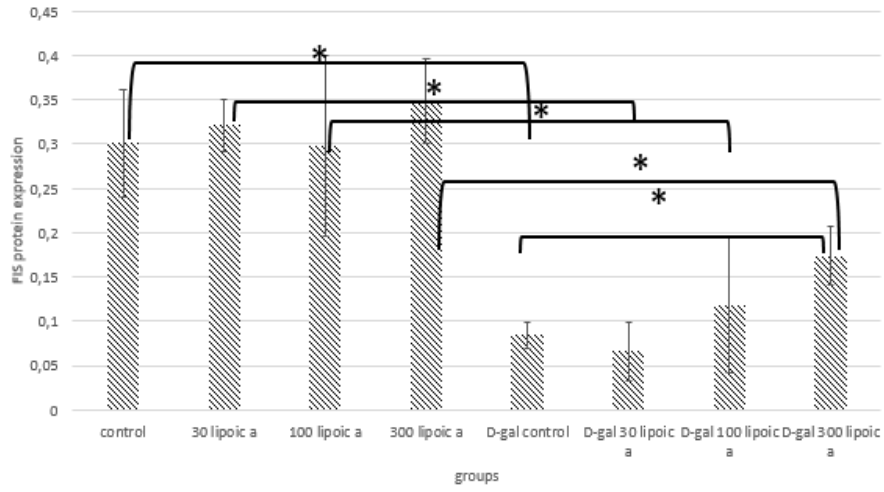
A



B



C



Şekil 3.5. Ölçülen proteinlerin orantısal değerleri. A) MFN1 protein ekspresyonunun densitometrik analiz grafiği B) MFN2 protein ekspresyonunun densitometrik analiz grafiği C) FIS1 protein ekspresyonunun densitometrik analiz grafiği

Bir füzyon proteini olan MFN1 proteini ekspresyon düzeyleri bakımından normal H9c2 hücrelerine lipoik asit ve 50 mM D-galaktoz ile yaşlandırılmış H9c2 hücrelerine (DGAL) lipoik asit uygulanan deney grupları birbiriyle karşılaştırıldı. MFN1 proteini ekspresyonunun 100 μ M ve 300 μ M lipoik asit uygulanan gruplarda, yaşlandırılmış gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$). 300 μ M lipoik asit uygulaması grup içinde karşılaştırıldığında kontrol gruplarına göre anlamlı fark gözlenmedi. DGAL ile yaşlanma sonrası lipoik asit verilen gruplardan 300 μ M lipoik asit verilen grup 100 μ M lipoik asit verilen gruba oranla daha yüksek MFN1 ekspresyonu olduğu bulundu ($p < 0,05$) (Şekil 3.5.A).

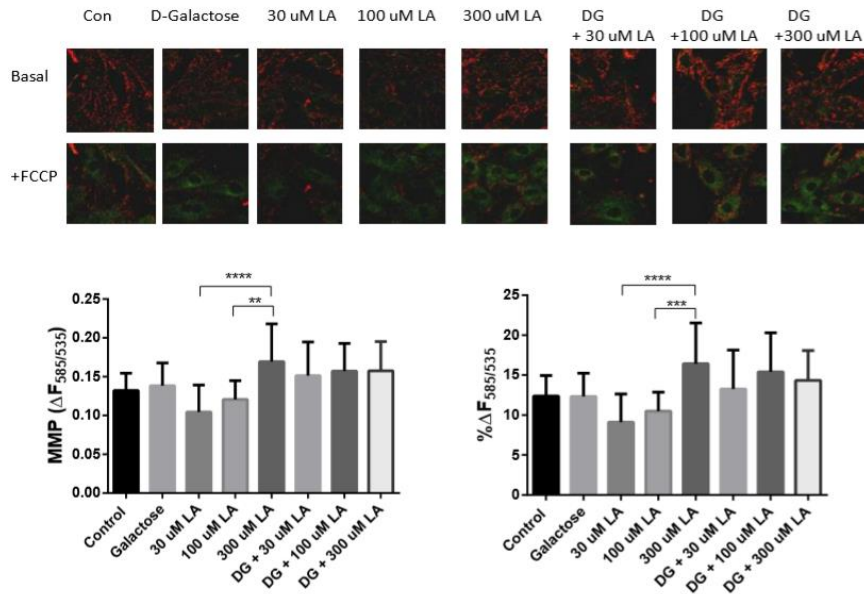
Bir diğer füzyon proteini olan MFN2 proteini ekspresyon düzeyleri bakımından normal H9c2 hücrelerine lipoik asit ve 50 mM D-galaktoz ile yaşlandırılmış H9c2 hücrelerine (DGAL) lipoik asit uygulanan deney grupları birbiriyle karşılaştırıldı (Şekil 2.1, Şekil 2.2.B). MFN2 proteini ekspresyonu 30 μ M, 100 μ M ve 300 μ M lipoik asit uygulanan gruplarda, yaşlandırılmış aynı dozda lipoik asit uygulanan gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p < 0,05$) (Şekil 3.5.B).

Fisyon proteinlerinden DRP1 için bant görüntüsü elde edilememiş olup yalnızca FIS1 değerlendirildi (Şekil 3.5.C).

Normal H9c2 hücreleri ile yaşlandırılmış hücreler karşılaştırıldığında FIS1 protein ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı gözlemlendi ($p < 0,05$). FIS1 ekspresyonu 30 μM , 100 μM ve 300 μM lipoik asit uygulanan gruplarda, yaşlandırılmış aynı dozda lipoik asit uygulanan gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p < 0,05$). FIS1 protein ekspresyonu yaşlandırılmış ve 300 μM lipoik asit uygulanmış grupta yaşlandırılmış gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmaktadır ($p < 0,05$) (Şekil 3.5.C).

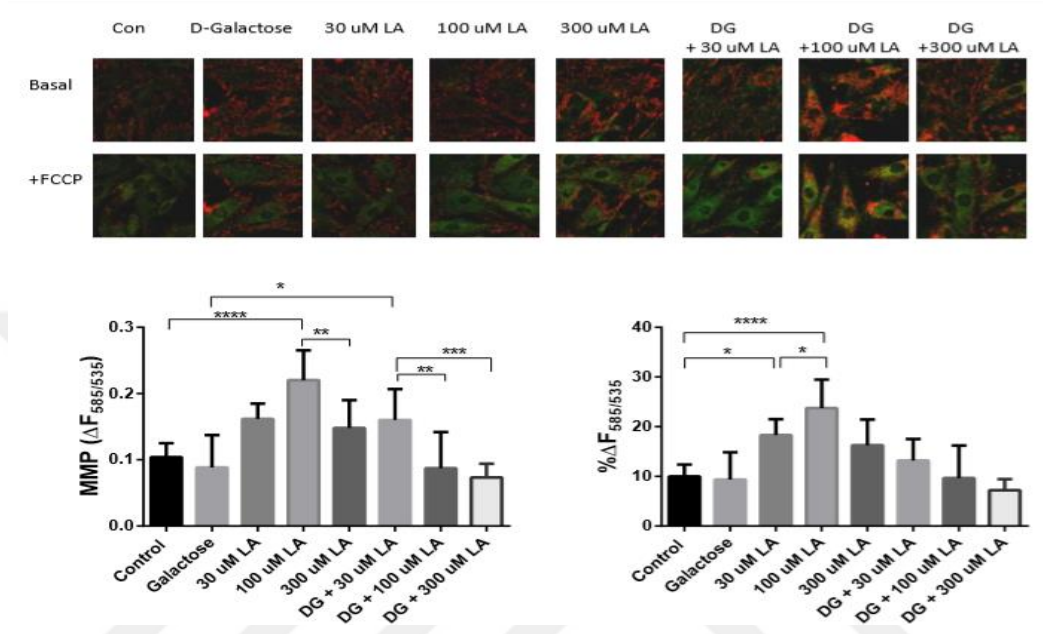
3.3. Lipoik Asit Uygulamasının Yaşlanma Modeli Oluşturulmuş H9C2'lerde Mitokondri Membran Potansiyeline Etkileri

Yaşlanmada mitokondriyal fonksiyonları değerlendirebilmek ve mitokondri hedefli lipoik asidin etkisini test etmek amacıyla mitokondriyal membran potansiyeli ölçümü yapıldı.



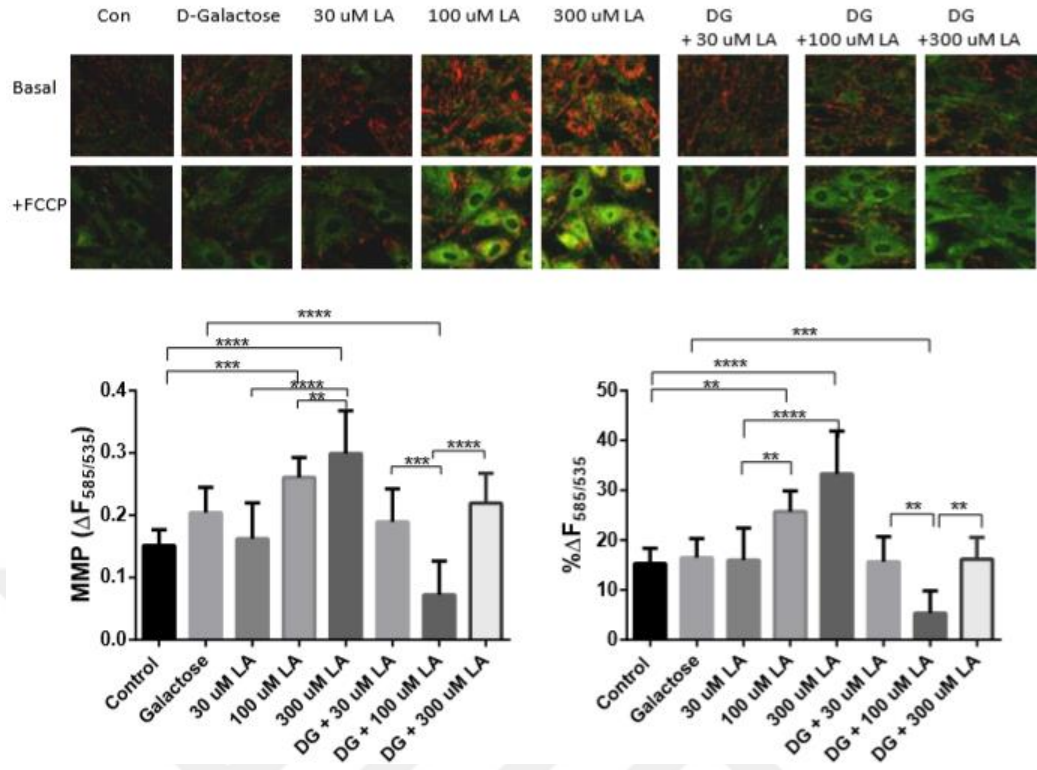
Şekil 3.6. Hücrelerin 6 saatlik lipoik asit inkübasyonu sonrası mitokondri membran potansiyelinin konfokal mikroskobu ile incelenmesi

6 saatlik lipoik asit uygulaması sonrası mitokondri membran potansiyelleri karşılaştırıldığında 300 μ M lipoik asit uygulaması grubunda 30 μ M ve 100 μ M gruplarına göre anlamlı düzeyde artış gözlemlendi ($p<0,01$, $p<0,0001$) (Şekil 3.6).



Şekil 3.7. Hücrelerin 24 saatlik lipoik asit inkübasyonu sonrası mitokondri membran potansiyelinin konfokal mikroskobu ile incelenmesi

24 saatlik lipoik asit uygulaması sonuçları değerlendirildiğinde 50mM D-galaktoz ile yaşlandırılan grupta azalan mitokondri membran potansiyeli D-galaktoz sonrası verilen 30 μ M lipoik asit ile istatistiksel olarak anlamlı derecede arttı ($p<0,05$). 24 saatlik DGAL+30 μ M lipoik asit grubunun diğer DGAL+lipoik asit gruplarına göre mitokondriyal membran potansiyelinin anlamlı derecede daha yüksek olduğu bulundu ($p<0,01$, $p<0,001$). Kontrole göre lipoik asit uygulaması gruplar arası karşılaştırıldığında 24 saatte yüksek membran potansiyeli değişimi 100 μ M lipoik asit grubunda olup bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$) (Şekil 3.7). Kontrole göre lipoik asit uygulaması gruplar arası membran potansiyeli yüzde değişimi karşılaştırıldığında 24 saatte yüksek membran potansiyeli 100 μ M lipoik asit grubunda olup bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,0001$) (Şekil 3.7).

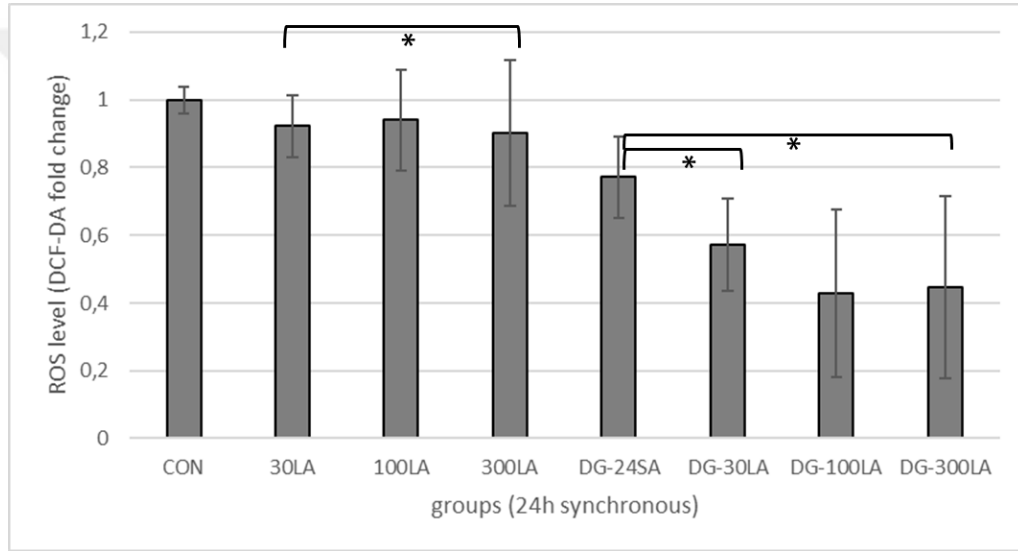


Şekil 3.8. Konfokal mikroskobu ile 48 saatlik lipoik asit inkübasyonu yapılmış hücrelerde mitokondri membran potansiyelinin incelenmesi

48 saatlik lipoik asit uygulaması sonuçlarında kontrole göre 100 μ M ve 300 μ M lipoik asit uygulanan gruplarda mitokondri membran potansiyeli anlamlı derecede arttı ($p<0,001$, $p<0,0001$) (Şekil 3.8). Yaşlandırılan hücelere verilen lipoik asit beklenenin aksine mitokondri membran potansiyelinde artış göstermemiştir. Ancak DGAL grupları kendi içlerinde değerlendirildiğinde 48 saatte 30 μ M ve 300 μ M gruplarında mitokondri membran potansiyeli 100 μ M grubuna göre yüksek bulundu ($p<0,05$). D-galaktoz uygulaması sonrası ve D-galaktoz ardından 100 μ M lipoik asit grubu karşılaştırıldığında mitokondrial membran potansiyelinin lipoik asit uygulamasıyla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı görüldü ($p<0,001$).

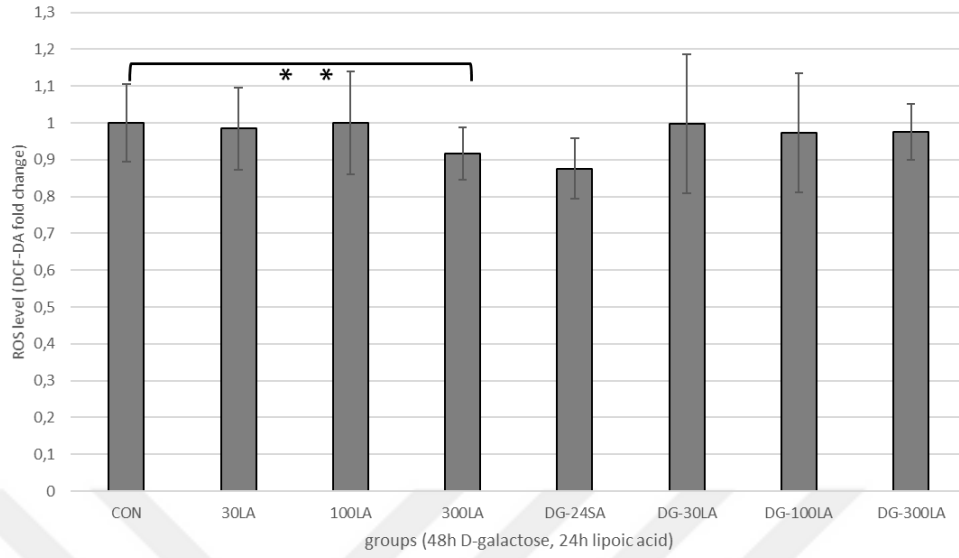
3.4. Lipoik Asit Uygulamasının Yaşlanma Modeli Oluşturulmuş H9C2 Hücre Hattında ROS Üretimine Etkileri

Yaşlanmayla birlikte redoks sistemindeki bozulmanın ve hücresel oksidan düzeyinin lipoik asit varlığında değişimi ROS ölçümü ile incelendi. DCFDA ile yüklenmiş hücrelerden bazal yanıt alındıktan sonra 100 μM H_2O_2 verilerek hücrenin maksimum oksidan durumu gözlemlendi. 24 saat D-galaktoz ve lipoik asit, 48 saat D-galaktoz ve 24 saat lipoik asit, 48 saat D-galaktoz ve 48 saat lipoik asit şeklinde ölçümler yapıldı.



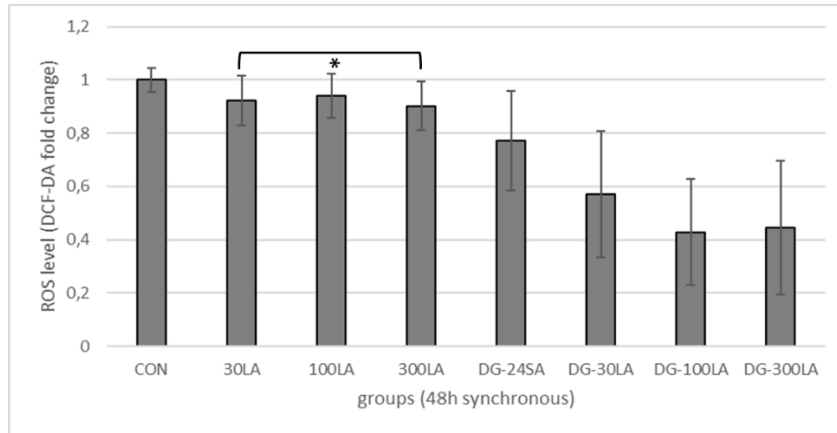
Şekil 3.9. Hücrelerin 24 saat D-galaktoz ve lipoik asit inkübasyonu sonrası ROS seviyelerinin kpnfokal mikroskobu ile incelenmesi

Bazala göre ROS kat artışı 24 saatlik inkübasyon için değerlendirildiğinde ROS seviyesi en düşük olan D-galaktoz ve 100 μM lipoik asit grubunda kontrole göre %58 azalma saptandı. D-galaktoz ile 24 saat muamele edilen hücrelerde ROS seviyeleri kontrol grubundan daha düşük bulundu. Ancak DGAL grupları kendi içlerinde değerlendirildiklerinde lipoik asit uygulananlarda DGAL grubuna göre 0,16 kat 30 μM , 0,27 kat 100 μM ve 0,26 kat 300 μM lipoik asit ile inkübasyon koşullarında ROS seviyeleri azaldı. 24 saatlik eş zamanlı inkübasyon koşullarında D-galaktoz uygulanan gruplar içinde kontrol grubu ile 30 μM ve 300 μM lipoik asit grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$) (Şekil 3.9.).



Şekil 3.10. 48 saat D-galaktoz, 24 saat lipoik asit inkübasyonu sonrası ROS seviyeleri

D-galaktoz ile toplamda 48 saat muamele edilerek yaşlandırılan H9c2 hücrelerinde 24 saatlik lipoik uygulamasının etkilerine bakıldığında beklenenin aksine lipoik asit ROS'u azaltmadı. Aksine kontrole çok yakın sonuçlar elde edilen bu ölçümde DGAL+LA gruplarında ROS sırasıyla 0,13 kat, 0,11 kat ve 0,11 kat arttı fakat sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Kontrol grubuna göre 300 μ M lipoik asit grubunda anlamlı bir düşüş gözlemlendi ($p < 0,05$) (Şekil 3.10.). Bu sonuçlardan 24 saatlik lipoik asit uygulamasının miyokaryositlerde ROS birikimine anlamlı bir katkısı olmadığı anlaşılmaktadır.



Şekil 3.11. Hücrelerin 48 saat D-galaktoz ve lipoik asit inkübasyonu sonrası ROS seviyelerinin kpnfokal mikroskopu ile incelenmesi

48 saat D-galaktoz ile muamele edilerek yaşlandırılırken aynı zamanda 48 saat lipoik asit uygulanan hücrelerde ROS seviyeleri değerlendirildiğinde en düşük ROS seviyesi kontrole göre %58 azalma ile DGAL+100 μ M lipoik asit alan grupta belirlendi. Yaşlandırılan hücreler kendi içlerinde değerlendirildiklerinde DGAL+LA gruplarında ROS seviyeleri DGAL grubuna göre sırasıyla 0,26 kat, 0,55 kat ve 0,57 kat azaldı, fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 3.11.).

Sonuçlara göre eş zamanlı lipoik asit uygulanması yaşlanan hücrelerde biriken ROS düzeylerinin azalmasını sağlamaktadır. Lipoik asit uygulaması yaşlanma sürecinde mitokondride ROS birikimine karşı mitokondriyi korumaktadır (Şekil 3.11.).

3.5. DGAL veya LA Uygulamalarının H9C2 Hücre Hattı Total Antioksidan Seviyelerine (TAS), Total Oksidan Seviyelerine (TOS) Etkileri

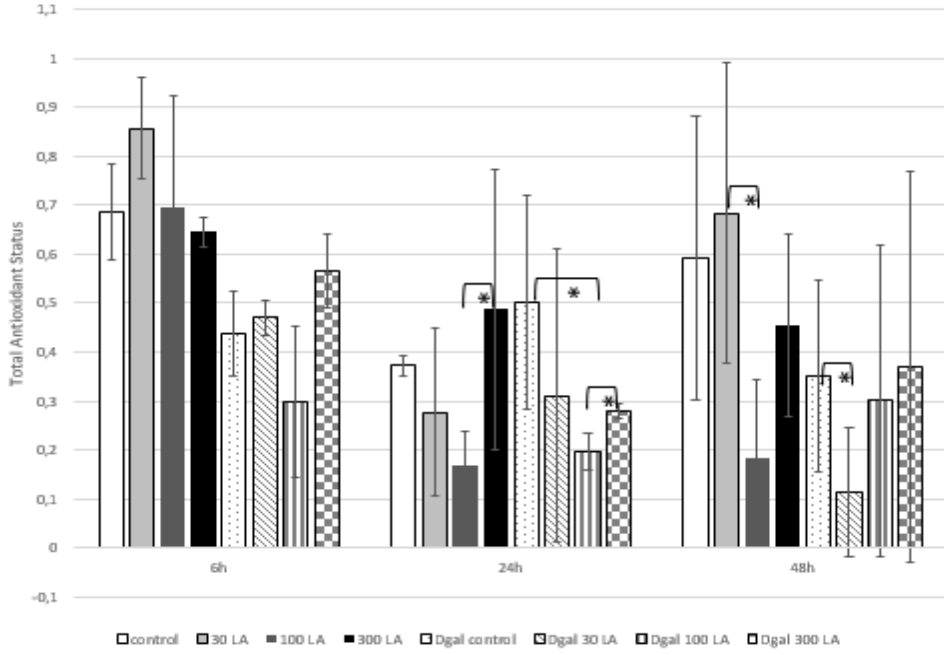
Yaşlanmayla birlikte redoks sistemindeki bozulmanın ve hücresel oksidan düzeyinin lipoik asit varlığında total antioksidan ve total oksidan seviyelerinin değişimi üzerindeki etkileri incelendi.

6 saat lipoik asit uygulanması sonrası grupların total antioksidan seviye ölçümlerinde yaşlandırılan DGAL grubunda kontrole göre antioksidan seviyesinin %56 azaldığı, DGAL kontrole göre 300 μ M lipoik asit uygulanan yaşlandırılmış hücrelerde antioksidan seviyenin %30 arttığı gözlemlendi (Şekil 3.12.).

24 saatlik ölçümlerde yaşlanma modelinde total antioksidan seviyelerinde kontrol ile karşılaştırıldığında lipoik asit uygulanan gruplarda düşüş gözlemlendi. Total antioksidan seviyesi normal ve yaşlandırılmış hücrelerde 300 μ M lipoik asit uygulanan gruplarda 100 μ M lipoik asit uygulanan gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı yükselme gerçekleşti ($p<0,05$) (Şekil 3.12.).

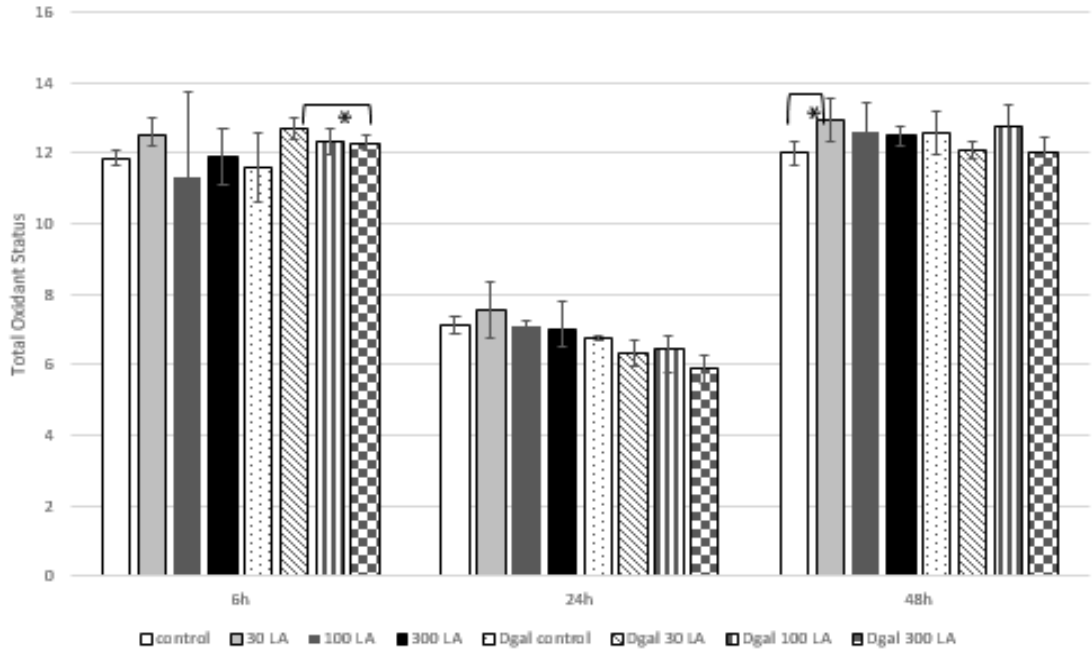
D-galaktoz inkübasyonu ile yaşlandırılan hücrelerde 48 saatlik 30 μ M lipoik asit uygulaması sonrası total antioksidan seviye kontrole göre %40 azaldı ($p<0,05$). DGAL kontrole göre 300 μ M lipoik asit uygulanan yaşlandırılmış hücrelerde antioksidan seviye %5.7 arttı fakat istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. 48 saatlik

inkübasyonda lipoik asit miktarı arttıkça antioksidan düzeyinin arttığı fakat istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlendi (Şekil 3.12.). Bu sonuçlara göre lipoik asit uygulaması yaşlanma süresinde hücresel düzeyde antioksidan kapasiteyi anlamlı düzeyde artırmamaktadır.



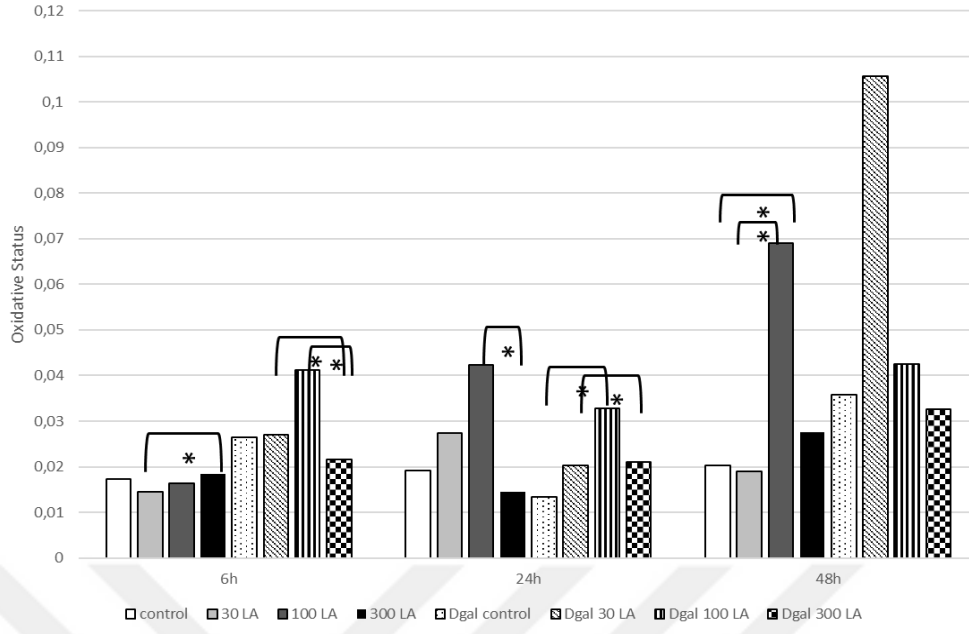
Şekil 3.12. H9c2 hücrelerinde total antioksidan durumun (TAS) kuantitasyonu.

Total oksidan durumu bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 3.13.). 48 saatlik inkübasyonda DGAL kontrole göre 30 ve 300 μ M lipoik asit uygulanan yaşlandırılmış hücrelerde antioksidan seviye %3.4 azaldı fakat istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.



Şekil 3.13. H9c2 hücrelerinde total oksidan durumunun (TOS) incelenmesi

Oksidatif Stres İndeks (TAS/TOS oranı) hesaplamasından çıkan sonuçlarda en dikkat çeken 48 saat 100 μ M lipoik asit grubunun oksidatif stres indeksinin kontrol grubunun 3,45 katı artmasıdır (Şekil 3.14.). Yine 48 saat gruplarından DGAL+30 μ M lipoik asit grubunun oksidatif stres indeksi yaşlandırılan DGAL kontrol grubunun 3 katı arttı. DGAL+100 μ M lipoik asit grubunda oksidatif stres indeksi DGAL kontrol grubunun 1.2 katı arttığı gözlemlendi. D-galaktoz sonrasında 300 μ M lipoik asit uygulanan grubun oksidatif stres indeksi DGAL kontrol grubundan %8,5 daha düşük bulundu fakat istatistiksel anlamlı olmadığı görüldü. Tüm bu sonuçlar lipoik asit uygulamasının yaşlanma sürecinde ortaya çıkan oksidatif strese karşı hücresel boyutta koruyuculuğu oldukça zayıftır. Lipoik asitin koruyucu etkisi mitokondriyal düzeyde gerçekleşmektedir.



Şekil 3.14. Oksidatif Stres İndeksinin 6, 24 ve 48 saat lipoik asit inkübasyonu sonrası gruplar arası karşılaştırılması

4. TARTIŞMA

Yaşlanma ile ilişkili fizyolojik değişikliklere bağlı fonksiyon yetersizlikleri, özellikle kalp fonksiyon yetersizliği, daha çok mitokondride gerçekleşen değişmelerden/bozulmalardan kaynaklanmaktadır. Bu nedenle bu çalışma kapsamında, *in vitro* koşullarda yaşlanma modeli oluşturulmuş ventrikül hücre hattı (H9c2) kullanılarak öncelikle mitokondrinin fonksiyonu ve biyokimyasal özellikleri incelenmiş ve daha sonra lipoik asidin bu parametreler üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonuçlarımız, lipoik asit uygulamasının konsantrasyon ve uygulama sürelerine bağlı olarak mitokondri fonksiyonu üzerinde etkiler gerçekleştiğini göstermiştir.

Yaşlandırılmış DGAL grubunda hücre canlılığının %64 olduğu başka bir ifade ile hücrelerin yaşlandırma modelinin çalıştığı gösterildi (Şekil 1.1). Yaşlanma sonrası lipoik asit verilen gruplarda hücre canlılığı değerlendirildiğinde 30 μ M (%69), 100 μ M (%86) ve 300 μ M (%64) lipoik asit uygulanan DGAL grubunda hücre canlılığı korunduğu gözlemlendi. Bununla birlikte DGAL gruplarında 24 saat lipoik asit uygulamasının hücre canlılığını arttırdığı görüldü. 48 saat süreyle yaşlandırılmış DGAL grubunda hücre canlılığının %61 olduğu başka bir ifade ile hücrelerin yaşlandırma modelinin çalıştığı gösterildi. Yaşlanma sonrası lipoik asit verilen gruplarda hücre canlılığı değerlendirildiğinde 30 μ M (%62), 100 μ M (%75) ve 300 μ M (%63) lipoik asit uygulanan DGAL grubunda hücre canlılığı korunduğu gözlemlendi (Şekil 1.2). Bununla birlikte DGAL gruplarında 48 saat lipoik asit uygulamasının hücre canlılığını arttırdığı görüldü. 48 saat 50 mmol D-galaktoz uygulayarak oluşturulan kardiyomiyosit modeli H9c2 hücrelerini yaşlandırma modelinin çalıştığı gösterildi. 24 ve 48 saat verileri karşılaştırıldığında lipoik asitin koruyuculuğu iki koşulda da birbirine benzerdir.

Yaşlanma mitokondriyal elektron taşınmasının yan ürünleri olarak reaktif oksijen türlerinin (ROS) salınması ile mitokondriyal bozulmanın önemli bir faktörü olarak görülmektedir (Kokoszka ve ark. 2001). Yaşlanmaya bağlı azalan otofaji mitokondride fonksiyonel bozukluklar ile sonuçlanmaktadır. Bunların başında mitofajinin

bozulması gelmektedir (Wang ve ark. 2019). Bu nedenle ilk olarak mitokondri füzyon ve füzyon dinamiklerine odaklanarak bunlardan sorumlu proteinlerin yaşlanma sonrası durumları değerlendirilmiştir. Bu hususta, gelişmiş insülin dirençli yaşlı sıçan kalpleri ile yapılan çalışmalarda, genç yetişkin sıçanlarla karşılaştırıldığında, histolojik incelemeler kalp dokusunda önemli yapısal değişimler geliştiğini, özellikle mitokondride fragmentasyonun çok belirgin olduğunu ve elektron yoğunluğunun arttığını göstermiştir. Aynı kalplerden izole edilen ventrikül hücrelerinde yapılan ölçünlerde ROS üretiminin yüksek ve mitokondri membran potansiyeninde (MMP) depolarizasyon geliştiğini göstermiştir (Olgar Y ve ark. Exp. Geront. 2020). Mitofüzyon ve mitofizyon proteinlerin ifade düzeylerinde yaşa bağlı değişimlerin geliştiği gözlenmiştir. Ayrıca, bu bulgulara ek olarak bu kalplerde MFN1, MFN2, FIS1 ve OPA1 gibi mitof *in vitro* koşullarda insülin direnci oluşturulmuş H9c2 hücre hattında, yine bu hücrelerde de ROS artışı ve mitokondri membran potansiyelinde (MMP) depolarizasyon ile elektron mikroskobu inceleme sonuçları da otofagozom sayısında artış ve mitokondride belirgin dejenerasyon olduğunu göstermiştir (Olgar ve ark. Mol. Cell. Biochem. 2020). MFN1 proteini ekspresyonunun 100 μ M ve 300 μ M lipoik asit uygulanan gruplarda, yaşlandırılmış gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu gözlemlendi ($p<0.05$). DGAL ile yaşlanma sonrası lipoik asit verilen gruplardan 300 μ M lipoik asit verilen grup 100 μ M lipoik asit verilen gruba kıyasla daha yüksek MFN1 ekspresyonu olduğu bulundu ($p<0,05$) (Şekil 2.3). MFN2 proteini ekspresyonu 30 μ M, 100 μ M ve 300 μ M lipoik asit uygulanan gruplarda, yaşlandırılmış aynı dozda lipoik asit uygulanan gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0,05$) (Şekil 2.6). Mitofajik bozuklukların özellikle azalmış MFN2 ifadesinin artmış ROS seviyeleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Song ve ark. 2014). Çalışmamızda lipoik asit konsantrasyonu arttıkça MFN2 ekspresyonunun arttığı gözlemlendi fakat istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunmadı. FIS1 protein ekspresyonu yaşlandırılmış ve 300 μ M lipoik asit uygulanmış grupta yaşlandırılmış gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmaktadır ($p<0,05$) (Şekil 2.9). Mitokondri fonksiyon bozukluğuna neden olan FIS1, DNA hasarına neden olan ROS seviyelerinin artışına da neden olmaktadır. Yani oksidatif stres ve artan ROS oluşumu mitokondride füzyon ile ilişkilidir. Aynı zamanda mitokondriyal füzyon artışı repolarizasyonla da ilişkili bulunmuştur (Tanaka ve ark.

2010). Mitokondriyal füzyon ve fizyon süreçleri hücre döngüsü içerisinde hep bir denge içinde sürmektedir. Yaşlanmayla gelen organel düzeyindeki işlevsizlik beraberinde füzyon ve fizyon dengesizliğini getirmektedir. Çalışmamızın sonunda bu süreci düzenleyen proteinlerden MFN1, MFN2 ve FIS1, DGAL verilerek yaşlandırılan gruplarda kontrole ve öncesi sonrası aynı miktarlardaki lipoik aside kıyasla daha düşük ekspresyonlara sahip olmuşlardır. Yani yaşlanma beraberinde mitofajide bozuklukları getirmiş ancak lipoik asit bu durumu zayıf bir şekilde baskılamıştır, hem füzyon hem de fizyon protein miktarları azalmıştır.

6 saatlik lipoik asit uygulaması sonrası MMP'ler karşılaştırıldığında 300 μ M lipoik asit uygulaması grubunda 30 μ M ve 100 μ M gruplarına göre anlamlı düzeyde artış gözlemlendi ($p<0,01$, $p<0,0001$) (Şekil 3.1). 24 saatlik DGAL+30 μ M lipoik asit grubunun diğer DGAL+lipoik asit gruplarına göre MMP'lerin anlamlı derecede daha yüksek olduğu bulundu ($p<0,01$, $p<0,001$). Kontrole göre lipoik asit uygulaması gruplar arası karşılaştırıldığında 24 saatte yüksek MMP100 μ M lipoik asit grubunda olup bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,0001$) (Şekil 3.2). 48 saatlik lipoik asit uygulaması sonuçlarında kontrole göre 100 μ M ve 300 μ M lipoik asit uygulanan gruplarda MMP'ler anlamlı derecede arttı ($p<0,001$, $p<0,0001$) (Şekil 3.3). Lipoik asitin kontrol gruplarında mitokondri membran depolarizasyonunu yani mitokondri fonksiyonunun normal değerlerine yaklaştığı gözlemlenmiştir. Literatürde fare iskelet kası hücre hattı modelinde de lipoik asit uygulamasının mitokondriyal aktiviteyi arttırdığı gözlemlenmiştir (Wang ve ark. 2010). Yaşlandırılan hücrelere verilen lipoik asit MMP'de artış göstermemiştir. Ancak DGAL grupları kendi içlerinde değerlendirildiğinde 48 saatte 30 μ M ve 300 μ M gruplarında MMP100 μ M grubuna göre yüksek bulundu ($p<0,05$). D-galaktoz ardından 30 ve 300 μ M lipoik asit 48 saat inkübasyon grubunda membran potansiyelinin daha yüksek, mitokondri membranı hasarının D-galaktozun tek başına uygulandığı gruptan daha az olduğu, yaşlanmaya bağlı olarak artan H_2O_2 'nin etkilerinden mitokondriyi koruduğu gözlemlendi. D-galaktoz ardından 30 μ M lipoik asit 24 saat inkübasyon grubunda mitokondri membranı hasarının D-galaktozun tek başına uygulandığı gruptan anlamlı düzeyde daha az olduğu, yaşlanmaya bağlı olarak artan H_2O_2 'nin etkilerinden mitokondriyi koruduğu gözlemlendi. Tüm bu sonuçlardan yola çıkarak yaşlanma ve MMP ilişkisi 24 saat ve 48 saatlik inkübasyonlarda daha net olarak anlaşılmaktadır. 24 saat D-galaktoz uygulaması sonrası ve D-galaktoz ardından

lipoik asit grubu farkının sadece 30 μ M lipoik asit uygulamasında istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi ($p<0,001$). 48 saatlik inkübasyonlarda lipoik asit miktarı arttıkça MMP'li azalmıştır (hiperpolarize durum).

Yaşlanma sürecindeki en önemli değişikliklerden biri de ROS birikiminin artışıdır. 24 saatlik eş zamanlı inkübasyon koşullarında D-galaktoz uygulanan gruplar içinde kontrol grubu ile 30 μ M ve 300 μ M lipoik asit grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$) (Şekil 4.1). D-galaktoz uygulanan koşulda biriken ROS miktarı lipoik asit eklenmesiyle anlamlı düzeyde azaldı. 48 saat D-galaktoz ile muamele edilerek yaşlandırılırken aynı zamanda 48 saat lipoik asit uygulanan hücrelerde ROS seviyeleri değerlendirildiğinde en düşük ROS seviyesi kontrole göre %58 azalma ile DGAL+100 μ M lipoik asit alan grupta belirlendi. Yaşlandırılan hücreler kendi içlerinde değerlendirildiklerinde DGAL+LA gruplarında ROS seviyeleri DGAL grubuna göre sırasıyla 0,26 kat, 0,55 kat ve 0,57 kat azaldı, fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 4.3). Sonuçlara göre eş zamanlı lipoik asit uygulanması yaşlanan hücrelerde biriken ROS düzeylerinin azalmasını sağlamaktadır. Sonuçlarımıza göre lipoik asit uygulaması yaşlanma sürecinde mitokondride ROS birikimine karşı mitokondriyi korumaktadır (Şekil 4.1, 4.3).

Membran potansiyeli yaşlanan hücrelerde daha fazla depolarize olmuş, yaşlanma ile mitokondride meydana gelen hasar depolarizasyon süresinde uzamayı da beraberinde getirmiştir (Olgar ve ark. 2018). Çalışmamızdaki verilere uyumlu olarak D-galaktoz ile yaşlandırılan H9c2 hücre hattındaki mitokondrial membran potansiyeli ölçümünde benzer sonuçlar görülmüş olup lipoik asit uygulanan yaşlandırılmış gruplar daha az depolarize olmuştur. Depolarizasyonun azalması daha az ROS üretimi ile ilişkilendirilmiştir. Li ve ark.'nın çalışmasında diyabetik sıçanların böbrek hücrelerinde LA'nın membran potansiyeli ve ROS üretimi gibi etkilerine bakılmış ve oksidanların oluşumunu önemli ölçüde engellemiş ve bunun getirisiyle diyabetin getirdiği membran potansiyelindeki azalma LA takviyesiyle önemli ölçüde iyileşmiştir (Wang ve ark. 2013).

6 saat lipoik asit uygulanması sonrası grupların total antioksidan seviye ölçümlerinde yaşlandırılan DGAL grubunda kontrole göre antioksidan seviyesinin %56 azaldığı bir başka deyişle yaşlılık modelinde antioksidanların azaldığı, DGAL kontrole göre 300

μM lipoik asit uygulanan yaşlandırılmış hücrelerde antioksidan seviyenin %30 arttığı gözlenmiştir (şekil 5.1). 24 saatlik ölçümlerde yaşlanma modelinde total antioksidan seviyelerinde kontrol ile karşılaştırıldığında lipoik asit uygulanan gruplarda 30 μM lipoik asit uygulanan grupta yükseliş, diğer gruplarda düşüş gözlendi. Total antioksidan seviyesi normal ve yaşlandırılmış hücrelerde 300 μM lipoik asit uygulanan gruplarda 100 μM lipoik asit uygulanan gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı yükselme gerçekleşmiştir ($p<0,05$) (şekil 5.1). D-galaktoz inkübasyonu ile yaşlandırılan hücrelerde 48 saatlik DGAL kontrole göre 300 μM lipoik asit uygulanan yaşlandırılmış hücrelerde antioksidan seviyesi %5.7 arttı fakat istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. 48 saatlik inkübasyonda lipoik asit miktarı arttıkça antioksidan düzeyinin arttığı fakat istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir (şekil 5.1). Literatürde yaşlılık ile birlikte mitokondri fonksiyonlarının azaldığı lipoik asit uygulaması ile bu etkilerin geri dönüştürüldüğü bildirilmiştir (Palaniappan ve Dai 2007). Bu sonuçlara göre lipoik asit uygulaması yaşlanma süresinde hücresel düzeyde antioksidan kapasiteyi hücresel boyutta istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttırmadığı belirlendi.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda lipoik asidin yaşlanmaya bağlı kalp fonksiyon bozukluğundaki rolünün mitokondri üzerinden araştırılması amaçlanmıştır. Bu nedenle hücresel düzeyde biyokimyasal ve elektrofizyolojik ölçümler gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen veriler, lipoik asit uygulamasının yaşlanma sürecinde ortaya çıkan oksidatif strese karşı koruyuculuğunun hücresel düzeyde zayıf olduğunu işaret etmiştir. Buna karşın, lipoik asitin koruyucu etkisi mitokondriyal düzeyde gerçekleştiğini bu çalışma sonuçları kuvvetlice işaret etmiştir.

Bu çalışma ile yaşlanmanın kardiyomiyositlerde meydana getirdiği hasara lipoik asidin olası olumlu etkilerinin açıklığa kavuşturulmuştur ve bu alanda kullanımına ilişkin ürün geliştirmeye yönelik çalışmalara referans oluşturmaktadır. Mitokondrial füzyon ve fizyon proteinlerinin (MFN1, MFN2 ve FIS1) yanı sıra başka mitokondrial proteinlerin değişimi de incelenebilir. Lipoik asit başka proteinler ve ilişkili sinyal yollarını kullanıyor olabilir. Mitokondrial analizlerdeki anlamlı sonuçların/değişikliklerin aynı düzeyde hücresel düzeyde görülmesi için, farklı konsantrasyonlarda lipoik asit ile deneylerin tekrarlanması yararlı olur inancındayız. Lipoik asitin antioksidan etkisinin detaylı olarak gösterilmesi için, farklı proteinler ile etkileşimleri konusunda farklı çalışmalar planlanarak çalışmalar detaylanabilir ve daha pozitif sonuçlar elde edilebilir görüşündeyiz.

ÖZET

Lipoik Asitin Yaşlı Memeli Kalp Fonksiyonuna Etkisinin Yaşlanma Modeli Geliştirilmiş Ventriküler H9c2 Hücre Hattında Mitokondri Fonksiyonu İncelenerek Değerlendirilmesi

Yaşlanma, çevresel faktörlere adaptasyon yetisinin zamanla azalmasıdır. Enerji üretim merkezi olan mitokondri, reaktif oksijen türlerinin (ROS) sürekli üretimi ile yaşlanma mekanizmasının odağı haline gelmiştir. Yaşlılıkla beraber organlarda ve damar sisteminde meydana gelen ilerleyici yapısal ve fonksiyonel değişiklikler kardiyovasküler hastalık gelişme riskini artırmaktadır. Kalp kasılma faaliyetlerinin ömür boyu sürdürülmesi için enerji ihtiyacı sürekli devam eden bir organdır ve mitokondriyal oksidatif enerjiye bağlı olduğundan mitokondriden zengindir. Yaşlanmanın kalpte meydana getirdiği başlıca değişiklikler oksijen tüketiminde ve ATP üretiminde azalma şeklinde ifade edilmektedir ve bu fonksiyon bozukluklarından mitokondriyal değişiklikler sorumlu tutulmaktadır. Alfa lipoik asit (α -LA) mitokondriyal dehidrogenaz enzimlerinde görev alan ve vücutta doğal olarak sentezlenebilen bir antioksidandır. α -LA'ın yaşlanmada kalp fonksiyonlarına olumlu etkileri olabileceği düşünülmektedir, fakat çalışmalar kısıtlıdır. α -LA'ın kalp üzerinde mitokondriyal fonksiyonlarını mitokondri fisyon ve füzyon proteinleri ile değerlendiren ve yaşlanma modelindeki oksidatif hasara etkilerine bakan hücresel mekanizmaları aydınlatmaya yönelik *in vitro* bir çalışma bulunmamaktadır. Ventriküler hücreden türetilmiş H9c2 hücrelerinin yüksek hücre ATP seviyesi, yüksek mitokondriyal kütle ve solunum kapasitesi içerdiği, daha yüksek mitokondriyal içeriğe sahip oldukları literatürde belirtilmiştir. Bu çalışmanın amacı *in vitro* yaşlanma ile oluşmuş oksidatif hasar modelinde mitokondriye odaklanan potansiyel mekanizmayı tespit etmek ve bu amaçla lipoik asidin farklı dozlarda ve farklı sürelerde H9c2 hücre hattındaki etkilerini araştırmaktır. Çalışmamızda H9c2 hücrelerine 50 mg/ml D-galaktoz ile 24 saat ve 48 saat muamele edilerek yaşlanma modeli oluşturuldu. Kontrol ve D-galaktoz grupları 30, 100 ve 300 μ M konsantrasyondaki α -LA ile inkübe edildi. Çalışma planımızda belirlediğimiz 6, 24, 48 saatlik α -LA inkübasyonları gerçekleştirildikten sonra deney sistemi gereklerine göre akabinde incelendi veya hücreler dondurulup deney aşamasına geçinceye dek saklandı. Deney gruplarımızda mitokondriyal membran potansiyeli, ROS miktarı, total oksidan ve antioksidan düzeyleri (TOS/TAS), mitokondriyal fisyon ve füzyon proteinlerinin ekspresyonları değerlendirildi. Çalışmamızın sonuçlarına göre alfa lipoik asit uygulaması, yaşlandırılmış H9c2 hücrelerinde mitokondri fonksiyonları, ROS birikimini ve oksidatif stresi olumlu yönde etkilemektedir.

Anahtar Sözcükler: Alfa Lipoik Asit, Yaşlanma, H9c2, Mitokondri

SUMMARY

Evaluation of the Effect of Lipoic Acid on Heart Function in Aged Mammals by Examining Mitochondrial Function in the Aging Model Improved Ventricular H9c2 Cell Line

Aging is the decrease in adaptation ability to environmental factors. Mitochondria have become the focus of the aging mechanism with the continuous production of reactive oxygen species (ROS). Progressive structural and functional changes during aging increase the risk of developing cardiovascular disease. The heart is rich in mitochondria because it depends on mitochondrial oxidative energy. Mitochondrial changes are thought to be responsible for the main changes caused by aging. Alpha lipoic acid (α -LA) is an antioxidant that is involved in mitochondrial dehydrogenesis enzymes. It is thought that α -LA may have positive effects on heart functions in aging, but studies are limited. There is no in vitro study to evaluate the mitochondrial functions of α -LA on the heart via mitochondrial fission and fusion proteins and to elucidate the cellular mechanisms looking at the effects of oxidative damage in the aging model. H9c2 cells derived from ventricular cells contain high cellular ATP level, mitochondrial mass and respiratory capacity, and have higher mitochondrial content. The aim of this study is to determine the potential mechanism that focuses on mitochondria in the oxidative damage model caused by in vitro aging and to investigate the effects of α -LA at different doses and at different durations on the H9c2 cell line. In our study, the aging model was created by treating H9c2 cells with 50 mg/ml D-galactose for 24 hours and 48 hours. Cells were incubated with changing concentrations of α -LA. In our study plan 6, 24, and 48 hours α -LA incubations were performed, then they were subsequently examined or the cells were frozen and stored until they examined. In our experimental groups, mitochondrial membrane potential, ROS, total oxidant and antioxidant levels, expression of mitochondrial fission and fusion proteins were evaluated. As a result of our study, α -LA administration positively affects mitochondrial functions, ROS accumulation and oxidative stress in aged H9c2 cells.

Keywords: Alpha Lipoic Acid, Aging, H9c2, Mitochondria

KAYNAKLAR

ALTUNHAN H. (2011) Preeklampitik anne bebeklerinde total oksidan seviye, total antioksidan seviye ve paraoksonaz düzeyleri. *Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi*.

BHATTI JS, BHATTI GK VE REDDY PH (2017). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders—A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* **1863**(5): 1066-1077.

BOENGLER K, KOSIOL M, MAYR M, SCHULZ R VE ROHRBACH S (2017). Mitochondria and ageing: role in heart, skeletal muscle and adipose tissue. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* **8**(3): 349-369.

BOKOV A, CHAUDHURI A VE RICHARDSON A (2004). The role of oxidative damage and stress in aging. *Mechanisms of ageing and development* **125**(10-11): 811-826.

CAO C, REN X, KHARBANDA S, KOLESKE A, PRASAD K VE KUFE D (2001). The ARG tyrosine kinase interacts with Siva-1 in the apoptotic response to oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* **276**(15): 11465-11468.

CAO X, CHEN A, YANG P, SONG X, LIU Y, LI Z, WANG X, WANG L VE LI Y (2013). Alpha-lipoic acid protects cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation injury by inhibiting autophagy. *Biochemical and biophysical research communications* **441**(4): 935-940.

CHAN DC (2006). Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**: 79-99.

CHUNG S, DZEJA PP, FAUSTINO RS, PEREZ-TERZIC C, BEHFAR A ve TERZIC A (2007). Mitochondrial oxidative metabolism is required for the cardiac differentiation of stem cells. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* **4 Suppl 1**: S60-67.

CRONAN JE (2014). Biotin and Lipoic Acid: Synthesis, Attachment, and Regulation. *EcoSal Plus* **6**(1).

CRONAN JE, ZHAO X ve JIANG Y (2005). Function, attachment and synthesis of lipoic acid in Escherichia coli. *Adv Microb Physiol* **50**: 103-146.

DAI D-F, RABINOVITCH PS ve UNGVARI Z (2012). Mitochondria and cardiovascular aging. *Circulation research* **110**(8): 1109-1124.

DAI DF, CHIAO YA, MARCINEK DJ, SZETO HH ve RABINOVITCH PS (2014). Mitochondrial oxidative stress in aging and healthspan. *Longev Healthspan* **3**: 6.

DUTTA D, CALVANI R, BERNABEI R, LEEUWENBURGH C ve MARZETTI E (2012). Contribution of impaired mitochondrial autophagy to cardiac aging: mechanisms and therapeutic opportunities. *Circulation research* **110**(8): 1125-1138.

ESCRIVA F, GAVETE ML, FERMIN Y, PEREZ C, GALLARDO N, ALVAREZ C, ANDRES A, ROS M ve CARRASCOSA JM (2007). Effect of age and moderate food restriction on insulin sensitivity in Wistar rats: role of adiposity. *J Endocrinol* **194**(1): 131-141.

ESPINOSA-DIEZ C, MIGUEL V, MENNERICH D, KIETZMANN T, SÁNCHEZ-PÉREZ P, CADENAS S ve LAMAS S (2015). Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox biology* **6**: 183-197.

EVANS JL ve GOLDFINE ID (2013). Aging and insulin resistance: just say iNOS. *Diabetes* **62**(2): 346-348.

FARES E VE HOWLETT SE (2010). Effect of age on cardiac excitation-contraction coupling. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **37**(1): 1-7.

FERRUCCI L (2008). The Baltimore Longitudinal Study of Aging (BLSA): a 50-year-long journey and plans for the future. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* **63**(12): 1416-1419.

FINK RI, KOLTERMAN OG, GRIFFIN J VE OLEFSKY JM (1983). Mechanisms of insulin resistance in aging. *J Clin Invest* **71**(6): 1523-1535.

HALLIWELL B (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology* **141**(2): 312-322.

HALLIWELL B VE CHIRICO S (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* **57**(5 Suppl): 715S-724S; discussion 724S-725S.

HARMAN D (1991). The aging process: major risk factor for disease and death. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**(12): 5360-5363.

HARMAN D (2002). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Science's SAGE KE* **2002**(37): 14.

JENDRACH M, MAI S, POHL S, VOTH M VE BEREITER-HAHN J (2008). Short- and long-term alterations of mitochondrial morphology, dynamics and mtDNA after transient oxidative stress. *Mitochondrion* **8**(4): 293-304.

KOKOSZKA JE, COSKUN P, ESPOSITO LA VE WALLACE DC (2001). Increased mitochondrial oxidative stress in the Sod2 (+/-) mouse results in the age-related decline of mitochondrial function culminating in increased apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**(5): 2278-2283.

KRAMER K, HOPPE P-P ve PACKER L (2001). Nutraceuticals in health and disease prevention, CRC Press.

KUZNETSOV AV, JAVADOV S, SICKINGER S, FROTSCHNIG S ve GRIMM M (2015). H9c2 and HL-1 cells demonstrate distinct features of energy metabolism, mitochondrial function and sensitivity to hypoxia-reoxygenation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* **1853**(2): 276-284.

LAKATTA EG ve LEVY D (2003). Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part II: the aging heart in health: links to heart disease. *Circulation* **107**(2): 346-354.

MOINI H, PACKER L ve SARIS NE (2002). Antioxidant and prooxidant activities of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Toxicol Appl Pharmacol* **182**(1): 84-90.

NUSSEY DH, FROY H, LEMAITRE J-F, GAILLARD J-M ve AUSTAD SN (2013). Senescence in natural populations of animals: widespread evidence and its implications for bio-gerontology. *Ageing research reviews* **12**(1): 214-225.

OLIVETTI G, MELISSARI M, CAPASSO JM ve ANVERSA P (1991). Cardiomyopathy of the aging human heart. Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy. *Circ Res* **68**(6): 1560-1568.

PAGE E ve MCCALLISTER L (1973). Quantitative electron microscopic description of heart muscle cells: application to normal, hypertrophied and thyroxin-stimulated hearts. *The American journal of cardiology* **31**(2): 172-181.

PALANIAPPAN A ve DAI A (2007). Mitochondrial ageing and the beneficial role of α -lipoic acid. *Neurochemical research* **32**(9): 1552-1558.

REED LJ (1953). Metabolic functions of thiamine and lipoic acid. *Physiol Rev* **33**(4): 544-559.

RICHTER C (1995). Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to ageing. *Int J Biochem Cell Biol* **27**(7): 647-653.

ROY M, REDDY PH, IJIMA M ve SESAKI H (2015). Mitochondrial division and fusion in metabolism. *Curr Opin Cell Biol* **33**: 111-118.

SARIS NEL, KARJALAINEN A, TEPLOVA VV ve LINDROS KO (1998). The stimulation of the mitochondrial permeability transition by dihydrolipoate and α -lipoate. *IUBMB Life* **44**(1): 127-134.

SEO AY, JOSEPH AM, DUTTA D, HWANG JC, ARIS JP ve LEEUWENBURGH C (2010). New insights into the role of mitochondria in aging: mitochondrial dynamics and more. *J Cell Sci* **123**(Pt 15): 2533-2542.

SHINMURA K (2016). Cardiac Senescence, Heart Failure, and Frailty: A Triangle in Elderly People. *Keio J Med* **65**(2): 25-32.

SIES H (1993). Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* **215**(2): 213-219.

SOLMONSON A ve DEBERARDINIS RJ (2018). Lipoic acid metabolism and mitochondrial redox regulation. *J Biol Chem* **293**(20): 7522-7530.

TANAKA A, CLELAND MM, XU S, NARENDRA DP, SUEN DF, KARBOWSKIM ve YOULE RJ (2010). Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *J Cell Biol* **191**(7): 1367-1380.

TERZIOĞLU G, KESKIN A ve DEMIREL G (2013). Hücre Proliferasyonu Ölçüm Yöntemleri ve Çeşitli Ticari Proliferasyon Kitlerinin Karşılaştırılması. *Turk J Immunol* **1**(3): 74-89.

VERTUANI S, ANGUSTI A ve MANFREDINI S (2004). The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Curr Pharm Des* **10**(14): 1677-1694.

WANG Y, LI Y, HE C, GOU B ve SONG M (2019). Mitochondrial regulation of cardiac aging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* **1865**(7): 1853-1864.

XIAO RP, SPURGEON HA, O'CONNOR F ve LAKATTA EG (1994). Age-associated changes in beta-adrenergic modulation on rat cardiac excitation-contraction coupling. *The Journal of clinical investigation* **94**(5): 2051-2059.

YU BP (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* **74**(1): 139-162.

ZORDOKY BN ve EL-KADI AO (2007). H9c2 cell line is a valuable in vitro model to study the drug metabolizing enzymes in the heart. *Journal of pharmacological and toxicological methods* **56**(3): 317-322.