DOI: 10.4274/atfm.29863

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası 2018;71(3):139-144

Hipoksi-Reoksijenasyon ile İndüklenen Kardiyak Mitokondriyal Disfonksiyon

Hypoxia-Reoxygenation Induced Cardiac Mitochondrial Dysfunction

© Gül Şimşek, © Hilmi Burak Kandilci

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Öz

Amaç: Hücrelerin azalan oksijen konsantrasyonuna verdikleri yanıt hipoksinin şiddeti ve süresine göre değişiklik göstermektedir. Bu konuda oldukça fazla çalışma yapılmış olmasına karşın, hipoksi ile indüklenen fonksiyonel yanıtların altında yatan mekanizmalar büyük ölçüde aydınlatılamamıştır. Bu çalışmada, kardiyak kökenli HL-1 hücrelerinin, uzun süreli (48 saat) kesintisiz hipoksiye verdikleri yanıtta mitokondrinin hücrel enerji ve reaktif oksijen türevleri (ROS) dengesindeki rolü araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada memeli atriyum kökenli hücre serisi HL-1 hücrelerinde uzun süreli hipoksida (48 saat, %1 O₂) ve normoksik (48 saat, %21 O₂) şartlarda kültür edilmiştir. Normoksik kontrol ve hipoksik hücrelerden mitokondri membran potansiyeli ve ROS miktarı floresan boyalar ile konfokal mikroskopta ölçülmüş, GAPDH protein seviyeleri western blot yöntemi ile belirlenmiştir.

Bulgular: Sonuçlarımıza göre, kardiyak HL-1 hücrelerinde 48 saat hipoksi bazal mitokondri membran potansiyeli ve oksijenli solunum kapasitesini değiştirmedir. Bununla birlikte hipoksik hücrelerin reoksijenasyon sırasında ortamdan tekrar oksijen uzaklaştırılmasına olan mitokondriyal depolarizasyon yanıtları normoksik kontrol hücrelere göre yavaştı. Hipoksik hücrelerde bazal ROS miktarında artış gözlenirken, hidrojen peroksit olan yanıtlar normoksik kontrol grubuna göre azaldı. GAPDH protein seviyesinde gruplar arası bir fark saptanmadı.

Sonuç: Bu sonuçlar, uzun süreli hipoksi ile indüklenen mitokondriyal oksidatif fosforilasyon kenetindeki kalıcı disfonksiyonun hücrel ROS artışından sorumlu olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: HL-1 Hücreleri, Hipoksi, Mitokondri Membran Potansiyeli, Reaktif Oksijen Türevleri

Abstract

Objectives: Cellular response to low oxygen tension is altered by severity and duration of hypoxia. Although the subject has been studied extensively, mechanisms leading to hypoxia-reoxygenation damage remain undefined. Here, we investigated the effect of long term continuous hypoxia (48 hours) on cardiac derived HL-1 cells, mainly the role of mitochondria in cellular energy and reactive oxygen species homeostasis.

Materials and Methods: In this study, mammalian atrium derived HL-1 cells were cultured either in long term hypoxia (48 hours, 1% O₂) or in normoxia (48 hours, 21% O₂) conditions. Mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species (ROS) level was measured using fluorescent dyes in a confocal microscope. GAPDH protein levels were detected by western blotting in normoxic control and hypoxic cells.

Results: Present results demonstrate that, 48 hours of hypoxia did not alter baseline mitochondrial membrane potential and its oxidative respiration capacity in cardiac HL-1 cells. The mitochondrial depolarization response to in reoxygenation period of oxygen deprived cells was slower in hypoxic cells. In hypoxic cells, basal ROS levels were higher whereas hydrogen peroxide response was smaller when compared with the normoxic control group. GAPDH protein levels were unaltered between groups.

Conclusion: Present results indicate that, persistent mitochondrial oxidation phosphorylation uncoupling may lead to an over production of ROS.

Key Words: HL-1 Cells, Hypoxia, Mitochondrial Membrane Potential, Reactive Oxygen Species

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Hilmi Burak Kandilci

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Tel.: +90 312 595 81 53 E-posta: kandilci@medicine.ankara.edu.tr ORCID ID: orcid.org/0000-0003-3050-6443

Geliş Tarihi/Received: 17.09.2018 Kabul Tarihi/Accepted: 27.11.2018

©Telif Hakkı 2018 Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, Galenos Yayınevi tarafından yayınlanmıştır.

Yayınlanan tüm içerik CC BY-NC-ND lisansı altındadır.

Giriş

Mitokondriyal disfonksiyon, kardiyak iskemi-reperfüzyon hasarı ve kanser gibi hipoksi ile ilişkili kompleks hastalıklarda gözlenen ortak bir bulgudur (1,2). Hücrede normoksik (%21 O₂) mitokondriyal solunum sırasında elektron donörleri nikotinamid adenin dinükleotit ve flavin adenin dinükleotit'ten gelen elektronlar sırası ile mitokondri iç membranında kompleks 1 ve 2 olarak adlandırılan solunum zinciri proteinlerine transfer edildikten sonra kompleks 3'e taşınıp moleküler oksijen tarafından yakalanır. Son olarak, sitokrom oksidaz enzimi kompleks 4 ile etkileşip oksijen ve suya indirgenir. Mitokondriyal komplekslerin bu işlevi sonucu mitokondri iç membranında oluşan proton gradienti, hücrede adenosin trifosfat (ATP) sentezi için gerekli enerjiyi sağlar. Böylece mitokondri ATP üretimi için ana metabolik yolak olan oksidatif fosforilasyon ile hücredeki oksijenin %85-90'ını tüketir. Kardiyak iskemik bozukluklar gibi hücreye az oksijenin ulaştığı hipoksi durumlarında yetersiz ATP üretimi (glikolitik yoldan ATP üretimi verimsiz olduğundan) hücrenin ölümüne gidebilecek yolları tetikleyebilir. Bu durumu engellemek amacıyla bazı memeli hücre tiplerinin hipoksi sırasında bozulan oksidatif fosforilasyonun sonucu azalan ATP üretimini telafi etmek için genellikle glikolizde ve glukoz transport yolağında görev alan genlerin ekspresyonunun arttığı bilinmektedir (3-6). Normoksida, mitokondriyal elektron transport zincirinde oksijenin yaklaşık %2-3'lük kısmının suya indirgenerek ATP üretimi yerine reaktif oksijen türevleri (ROS) oluşturduğu tahmin edilmektedir (7). Hipoksida ise, oksijen miktarının azalması ve mitokondriyal solunumun durmasından dolayı mitokondriyal ROS üretiminde azalma bildirilmiştir (2,8). Ancak, hipoksinin mitokondriyal ROS üretiminde beklenenin aksine artışa yol açtığını bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (9). Hipoksi sırasında hücre içi ROS artışından mitokondriyal elektron transport zincirindeki disfonksiyonel kompleks 1 ve 3'ün sorumlu olabileceği düşünülmektedir (9,10). Ayrıca, mitokondriyal dinamiklerdeki değişikliklerin de hipoksida ROS artışına yol açabileceği bildirilmiştir (11).

Daha önceki bulgularımıza göre, HL-1 hücrelerinde 48 saat hipoksi sonrası 2 saat reoksijenasyon ile, azalan hücre içi ATP miktarı yerine konmamıştır (12). Bu sonuç, hipoksida gelişen kalıcı mitokondriyal disfonksiyonun reoksijenasyonda mitokondride oksidatif fosforilasyon eşleşmesi yerine ROS üretimine kaydığını düşündürmektedir. Bu hipotezi test etmek amacıyla, çalışmamızda, 48 saat hipoksida mitokondri fonksiyonu ile hücredeki bazal ROS miktarı araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Hücre Kültürü ve Uzun Süreli Hipoksik Şartların Oluşturulması

Fare atriyal tümör kökenli HL-1 hücreleri uygun şekilde kültür edildi (13). Hücreler, Claycomb (Sigma) besiyeri içeren

yuvarlak camlara ekildi ve %21 O₂, %5 CO₂'de 24-36 saat tutuldu. %70 yoğunluğa ulaşan hücreler, 6 mL Claycomb besiyeri içeren 60 mm petri kaplarına aktarıldı. Hipoksi için, hücreler oksijen konsantrasyonunun paralel ölçüldüğü (Oxymicro, WPI) kapalı kap (Billups-Rothenberg, Inc.) içerisinde 48 saat %1 O₂, %5 CO₂, %94 N₂'de tutuldu. Kapalı kaptaki oksijen gazının dengelendiği 1. ve sonrasında 24. saatlerde kabın gaz içeriği yenilendi. Kontrol normoksik hücreler ise, 48 saat boyunca %21 O₂ ve %5 CO₂'de tutuldu. Bu protokol ile, hipoksi ve kontrol deneylerin sonunda hücre besiyeri pH'si ~7,4 olarak ölçüldü.

Western Blot Analizi

HL-1 hücrelerinde *GAPDH* miktarını ölçmek amacıyla hücreler ilk başta +4 °C'deki fosfat tamponlu salin çözeltisi ile yıkandıktan sonra kazındı ve pellet haline getirildi (+4 °C, 1000 g, 5 dakika). Tüm proteinleri elde etmek için, pellet deterjan içeren çözeltide [50 mM HEPES (pH: 7,6)], 150 mM sodyum klorür, 1 mM etilendiamin tetraasetik asit, 1,5 mM magnezyum klorür, %0,5 NP-40 ve proteaz inhibitör kokteyli (Complete, Roche) düzenli aralıklar ile karıştırılarak 15 dakika boyunca +4 °C'de tutuldu ve süpernatant alındı (13750 g, 10 dakika, +4 °C). Daha sonra, poliakrilamid jel elektroforez ile ayrıştırılan proteinler polivinilidinden florür membrana (Santa Cruz) aktarıldı ve fare monoklonal antikorları *GAPDH* (Santa Cruz, 1/1000) ve β -aktin (Santa Cruz, 1/1000) ile işaretlendi. Protein görüntülenmesi için ECL ve yaban turpu peroksidaz -konjuge tavşan anti fare antikorları (Abcam, 1/25000) kullanıldı. Film dansitometrik analizi ImageJ yazılımı ile yapıldı. *GADPH* protein seviyesi β -aktin miktarına normalize edildi.

Reaktif Oksijen Türevleri Ölçümü

Hücrelerdeki reaktif oksijen türevlerinin (süperoksit, O₂⁻; hidroksil radikali, OH singlet oksijen, ¹O₂; hidrojen peroksit, H₂O₂) ölçümü için floresan özellikteki klorometil-2',7'-diklorodihidrofloresein diasetat (CM-DCFDA) kullanıldı. 30 dakika 37 °C'de CM-DCFDA (10 mM) ile inkübe edilen hücreler 488 nM dalga boyunda uyarıldı ve 535 nM dalga boyundaki floresan emisyon konfokal mikroskop ile 37 °C'de toplandı (TCS SP5, Leica).

Mitokondri Membran Potansiyeli Ölçümü

HL-1 hücrelerinden mitokondriyal membran potansiyeli ölçümü için 1,1',3,3'-tetra etil benzamidazol karbosiyanin iyodür (JC-1, Anaspec) floresan boyası kullanıldı. Kırk sekiz saat hipoksida tutulan hücreler hipoksiden alındıktan sonra 20 dakika 37 °C'de JC-1 (5 mM) ile yüklendi. Potansiyometrik JC-1 boyası, mitokondri polarize olduğunda mitokondriyal membranlar arasında toplanarak (j-agregat formu) kırmızı floresan (590 nM) artışı gösterir. Mitokondriyal depolarizasyon ise, boyanın diffüz bir şekilde sitoplazmaya dağılmasını sağlar ve boyanın bu formu yeşil floresan (530 nM) özelliktedir. 488 nm'de uyarılan hücrelerden elde edilen emisyon eş zamanlı (ratiometrik) olarak

530 nM ve 590 nM'de 37 °C'de konfokal mikroskop ile toplandı (TCS SP5, Leica). Bazal emisyon oranları Leica yazılımı ile ölçüldü.

İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada kontrol ve 48 saat hipoksi bağımsız deney gruplarında deneysel protokol uygulamaları sonrasında oluşan yanıt ortalamaları student's t-testi ile karşılaştırılmıştır. $P < 0,05$ anlamlı kabul edilmiş ve sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir.

Bulgular

HL-1 Hücrelerinde 48 Saat Hipoksi Sonrasında Reoksijenasyon Mitokondriyal Membran Potansiyelini Değiştirmedir

Uzun süreli hipoksi sonrasında 2 saatlik reoksijenasyon süresinde ölçüm alınan hücrelerdeki ψ , normoksik kontrol hücrelerden farklı değildi (Şekil 1a, b). Sodyum ditionit, uzun süreli hipoksik ve kontrol hücre ψ 'ini güçlü bir şekilde depolarize etti ve gruplar arası fark saptanmadı (Şekil 1a, b). Ancak, 48 saatlik hipoksi grubunda sodyum ditionit'in oluşturduğu ψ depolarizasyon cevabı kontrol grubuna göre daha yavaştı (Şekil 1c).

Uzun Süreli Hipoksi Glikoliz Yolağında Rol Alan GAPDH Protein Ekspresyonunu Etkilemedi

HL-1 hücrelerinde hipoksi sırasında glikolitik yoldan enerji üretiminde rol alan ana enzimlerden GAPDH seviyesi ölçüldü. HL-1 hücrelerinde 48 saatlik uzun süreli hipoksi GAPDH protein miktarını değiştirmedir (Şekil 2a, b).

48 saat Hipoksi ve Reoksijenasyon Hücrel ROS Oluşumunu Artırdı

HL-1 hücrelerinde ROS ölçümü için, 48 saatlik hipokside tutulan hücreler hipoksik ortamdan çıkartıldıktan sonra normoksik koşullarda (%21 O_2 , 37 °C) membrandan geçebilen hücre içi ROS boyası (CM-DCFDA) ile 30 dakika inkübe edilerek yüklendi. Normoksik kontrol hücrelerindeki bazal ROS sinyali, hidrojen peroksit (1 mM, H_2O_2) uygulaması ile $\sim$ %50 arttı (Şekil 3a, b). 48 saatlik hipoksi grubunda, bazal ROS miktarında kontrol grubuna göre artış gözlenirken, normoksik kontrol grubundaki H_2O_2 yanıtı ise ortadan kalktı (Şekil 3a, b).

Tartışma

Hücredeki oksijen miktarı hücre metabolizması ve gen ekspresyonunu belirleyen bir faktördür. İzole veya iskeminin eşlik ettiği hipokside hücrelerin Krebs döngüsü hızında azalma ve hipoksi ile indüklenen faktör (hif) aracılı değişiklikler olmaktadır. Hipoksik şartlarda hücreler glikozu daha çok kullanarak ATP'yi az verimli oksijensiz solunum (glikoliz ve laktat oluşumu) ile elde ederler (Pastör etkisi). Bu koşullarda, mitokondri yeterli

Şekil 1: a) Kırk sekiz saat hipoksi grubundan bazal durumda ve oksijen süpürücüsü (1 mM sodyum ditionit) uygulandıktan sonra kaydedilen mitokondri membran potansiyelinin konfokal mikroskopta çekilen görüntüleri (JC-1 floresanı, 37 °C, n=4). HL-1 hücrelerinin mitokondrieleri bazal durumda (hiperpolarize, kırmızı) belirgin olarak izlenebilirken ditionit uygulamasından sonra membran potansiyelinin kaybı yüzünden kaybolmaktadır (depolarize, difüz yeşil). b) Hipoksi grubunda bazal ve ditionit uygulamasından (1 mM, Ok) sonraki JC-1 sinyalinin grafikleri. Deneysel protokoller ekli olarak şekil üstüne yerleştirilmiştir. c) Elektron transport zinciri akısını gösteren, ditionit uygulaması ile JC-1 sinyalinin zamana bağlı değişimi. "n" sayısı yuvarlak camlarda farklı günlerde çoğaltılan bağımsız HL-1 hücre gruplarını göstermektedir. * $p < 0,05$ kontrole göre. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir

Şekil 2: GAPDH protein western blot analizi (37 kDa). a) 48 saat hipoksi ve normoksi kontrol grubu hücre lizatından elde edilen örnek western blotlar. b) Aktin proteinine normalize edilen GAPDH'nin dansimetrik analizi. 48 saat hipoksi normalize GAPDH protein miktarını değiştirmemektedir (n=3). "N" sayısı yuvarlak camlarda farklı günlerde çoğaltılan bağımsız HL-1 hücre gruplarını göstermektedir. *p<0,05 kontrole göre. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterilmiştir

Şekil 3: a) Kırk sekiz saat hipoksi ve normoksik kontrol hücrelerinden kaydedilen bazal ve 1 mM H₂O₂ uygulaması sonrası kaydedilen ROS sinyalinin konfokal mikroskoptaki görüntüsü. H₂O₂ maksimum boya yanıtı (oksidasyon) gözlemek için kullanılmıştır. b) Hipoksi ve normoksik kontrol grubunda bazal ve 1 mM H₂O₂ uygulamasından (1 mM, 0k) sonraki ROS sinyalinin grafikleri. Deneyel protokoller ekli olarak şekil üstüne yerleştirilmiştir. "N" sayısı yuvarlak camlarda farklı günlerde çoğaltılan bağımsız HL-1 hücre gruplarını göstermektedir. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterilmiştir

substratlar ile (asetil-CoA ve oksijen) beslenemediğinden yapısı, fonksiyonu ve dinamiklerinde önemli değişiklikler olduğu bildirilmiştir (14).

Daha önceki çalışmalarda, uzun süreli hipoksinin mitokondri membran geçirgenliğini artırarak mitokondri membran potansiyelini (ψ) depolarize edebileceği öne sürülmüştür (15,16). Bu bulguların aksine sonuçlarımız, ortamdan oksijenin uzaklaştırıldığında uzun süreli hipoksik hücrelerin normoksik kontrol hücrelere benzer miktarda mitokondriyal depolarizasyon cevabı oluşturduğunu göstermektedir (Şekil 1a, b). HL-1 hücrelerinde uzun süreli hipoksiye rağmen hücrelerin akut oksijensizliğe yanıt oluşturabilmesi, uzun süreli hipoksi sonrası reoksijenasyonun ψ 'nin hızlıca (30 dakikadan az) normoksik kontrol bazal değerlerine (polarize olduğunu) geri döndüğünü göstermektedir. Bu bulgular uzun süreli hipoksiden sonra mitokondrinin oksijenli solunum kapasitesinde kalıcı

bir değişiklik oluşturmadığını desteklemektedir. Ancak, daha önceki sonuçlarımıza göre 48 saatlik hipoksi sonrası 2 saatlik reoksijenasyon ile azalan hücre içi ATP miktarının yerine konmaması (12), oksijenli solunumun tekrar başlamasının boşalan ATP havuzunu yenileyemediğini göstermektedir. Bu sonuç, uzun süreli hipoksi sırasında HL-1 hücrelerinde 48 saat hipoksi ve reoksijenasyon sonrasında, ATP üretim yolağında az verimli glikolizin ön plana çıktığını ya da ATP kullanımında artış olabileceğini düşündürmektedir. Ancak bu çalışmada, glikoliz yolağında görev alan ana enzimlerden biri olan GAPDH miktarında bir değişiklik görülmemesi (Şekil 2a, b), hücrelerin kalıcı şekilde glikolitik yolağı tercih ettikleri yönünde yorum yapılmasını güçleştirmektedir. Benzer şekilde, daha önce yapılmış diğer çalışmalarda 48 saat hipoksi ya da normokside hipoksi ile indüklenen faktör (hif) yıkımını önleyen dimetil oksoglutarat ile inkübasyonunun hücre ATP miktarını, uzun süreli hipoksi gibi, %60 oranında azalttığı bildirilmiştir (17). Bu sonuçlar hif'in ATP döngüsü üzerinde etkili olabileceğini öne sürmektedir. Bu bulgular, fare yetişkin kardiomyositlerinde akut hipoksi (PO₂ <0,2 mmHg) sırasında K_{ATP} kanal aktivitesi ölçülerek saptanan ATP seviyesindeki azalmanın, reoksijenasyon ile yerine konduğu bildiren çalışmalar ile paralellik göstermemektedir (18). Bu farklılık, akut ve uzun süreli hipokside ayrı mekanizmaların ön planda olduğunu düşündürmektedir.

Bu çalışmadaki bulgularımız, uzun süreli hipoksi ile mitokondri membran potansiyeli değişikliklerinden bağımsız ve geri dönüşümsüz (ya da çok yavaş geri dönüşümlü) mitokondri disfonksiyonu olduğunu işaret etmektedir. Mitokondri membran potansiyeli oluşturan mitokondriyal H⁺ gradienti ve ATP üretimi arasındaki eşleşmenin belirgin olarak kaybolması, mitokondrinin reoksijenasyon sırasında ROS üretim yolağına kaydığını düşündürmektedir (19,20). Bu hipotez ile uyumlu olarak mitokondri potansiyelinin akut oksijen süpürülmesine yanıtı 48 saat hipoksik hücrelerde %30 oranında daha yavaştı (Şekil 1c). Bu durum, normoksik kontrollerine göre, 48 saatlik hipoksik hücrelerde elektron transport zincirindeki akımın kalıcı olarak yavaşladığını düşündürmektedir. Bu etki daha önceki çalışmalarda bildirilen iskemi reperfüzyon hasarındaki fonksiyonu bozulan mitokondriyal kompleksler ile ilgili olabilir (21,22). 48 saat hipoksik ve normoksik kontrol hücrelerdeki kararlı durum mitokondriyal membran potansiyelindeki benzerlik, azalan mitokondriyal elektron transportuna (membran potansiyelinde az polarizasyon) karşılık azalan ATP üretimi (membran potansiyelinde az depolarizasyon) arasındaki rastgele bir denge yüzünden gerçekleşmiş olabilir. Dolayısı ile, bulgularımız uzun dönem hipoksiden sonra elektron transport zinciri akımında hif aracılı ve kalıcı bir disfonksiyon olasılığını işaret etmektedir.

Deneylerimizde, normoksik kontrol ve 48 saat hipoksi gruplarının bazal ROS miktarları karşılaştırılmasında ratiometrik

olmayan (non-ratiometrik) ROS boyası kullanılmıştır. Non-ratiometrik boya kullanıldığında gruplar arası farklar, hücrelerden boya kaybı gibi sebeplere bağlı olabileceğinden kıyaslama yapmak oldukça zordur. Ancak, deney grupları arasındaki bazal ROS sinyali ve H_2O_2 'ye olan yanıtlarının birbirine zıt olması (toplu sonuçlar için bkz. Tablo 1), sonuçlar değerlendirilirken ROS boyasının bu dezavantajını büyük ölçüde ortadan kaldırmaktadır. Normoksik grupta gözlenen H_2O_2 yanıtının hipoksizde olmaması, hipoksi grubuna özgü boya kaybını düşündürürken aynı zamanda hipoksi grubunda bazal ROS sinyalinin normoksi grubuna göre yüksek olması bu olasılığı azaltmaktadır. Dolayısı ile, hipoksi ve/veya reoksijenasyon sırasında üretilen ROS'nin CM-DCFDA boyasında maksimum floresan sinyali (doğunluk) oluşturduğunu ve üzerine daha fazla H_2O_2 yanıtının alınamadığını düşündürmektedir. Tüm bu sonuçlar, 48 saat hipoksi sonrası kontrole göre bazal ROS sinyalindeki artıştan (Şekil 3a, b) mitokondrinin sorumlu olabileceğini işaret eder. Ancak, hücre sitoplazmasında mitokondri dışında da ROS oluşturabilecek bölgeler (plazma membranında NADPH oksidaz veya sitoplazmada bulunan ksantin oksidaz ya da lizozom, endoplazmik retikulum gibi organeller) bulunmaktadır (23). HL-1 hücrelerinde uzun süreli hipoksi ile indüklenen ROS artışında mitokondri dışındaki kaynakların da etkisi olabilir.

Tablo 1: Elde edilen bulguların toplu halde gösterimi

Ölçüm	Bazal		Uygulama	
	48 saat normoksi (Kontrol)	48 saat hipoksi	48 saat normoksi (Kontrol)	48 saat hipoksi
Reaktif oksijen türevleri (ROS)	Kontrol seviye	Kontrolle göre ~3 kat artış	H_2O_2 'ye yanıt var	H_2O_2 'ye yanıt yok
Mitokondri potansiyeli	Kontrol seviye	Kontrolle aynı	Sodyum ditionit'e ψ depolarizasyon yanıtı	Sodyum ditionit ile kontrole yakın ψ depolarizasyon yanıtı

Sonuç

Kardiyak HL-1 hücrelerinde uzun süreli hipoksi, mitokondrinin oksijenli solunum kapasitesini değiştirmemekte ancak oksidatif fosforilasyon eşleşmesini bozduğu için kalıcı disfonksiyona sebep olmaktadır. Hipoksizde bozulan oksidatif fosforilasyon eşleşmesinin mitokondriyal ROS üretimine kayma olasılığı (akut anoksidedeki depolarizasyon yanıtının normoksik kontrollere göre yavaş olması, Şekil 1c) hücre sitoplazmasındaki bazal ROS miktarında artışın ana kaynağı olabilir. Bu çalışma ile ilk defa, kardiyak hücrelerde uzun süreli hipoksi ile indüklenen hücre içi ROS artışından mitokondrinin sorumlu olabileceği öne sürülmüştür. İzole memeli kardiyomiyosit primer hücre kültürü

uzun sürede hücre canlılığı gibi problemler ortaya çıkartmaktadır. Bu sebeple, kardiyak HL-1 hücreleri kalpte uzun süreli hipoksinin etkisini araştırmak için iyi bir modeldir. Hipoksik ROS oluşumuna yol açan mekanizmaların ve ROS sinyalinin efektör alt yollarının aydınlatılması, kardiyak hücrelerin hipoksiye olan yanıtlarının anlaşılmasında ve dolayısı ile kardiyak iskemi/reperfüzyon veya ateroskleroz gibi patofizyolojilere karşı tedavi stratejilerinin oluşturulmasında kritik önem taşımaktadır.

Etik

Etik Kurul Onayı: Etik kurul onayı alınmamıştır.

Hasta Onayı: Hasta onayı alınmamıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

Yazarlık Katkıları

Konsept: G.Ş., H.B.K., **Dizayn:** G.Ş., H.B.K., **Veri Toplama veya İşleme:** G.Ş., H.B.K., **Analiz veya Yorumlama:** G.Ş., H.B.K., **Literatür Arama:** G.Ş., H.B.K., **Yazan:** G.Ş., H.B.K.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından çıkar çatışması yoktur.

Finansal Destek: Bu proje Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (H.B. Kandilci, 17B0230001) tarafından desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Liu B, Tewari AK, Zhang L, et al. Proteomic analysis of protein tyrosine nitration after ischemic reperfusion injury: mitochondria as the major target. *Biochim Biophys Acta* 2009;1794:476-485.
- Solaini G, Harris DA. Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischemia and reperfusion. *Biochem J*. 2005;390:377-394.
- Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr Opin Genet Dev*. 1998;8:588-594.
- Semenza GL, Roth PH, Fang HM, et al. Transcriptional regulation of gene encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1994;269:23757-23763.
- Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, et al. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1996;271:32529-32537.
- Ebert BL, Firth JD, Ratcliffe PJ. Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct cis-acting sequences. *J Biol Chem* 1995;270:29083-29089.
- Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 2003;552:335-344.
- Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, et al. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab*. 2006;3:187-197.
- Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, et al. Reactive oxygen species generated at mitochondrial Complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *J Biol Chem*. 2000;275:25130-25138.
- Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, et al. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci*. 1998;95:11715-11720.
- Baracca A, Chiaradonna F, Sgarbi G, et al. Mitochondrial Complex I decrease is responsible for bioenergetic dysfunction in K-ras transformed cells. *Biochim Biophys Acta* 2010;1797:314-323.

12. Şimşek G, Vaughan-Jones RD, Swietach P, et al. Recovery from hypoxia-induced internalization of cardiac Na⁺/H⁺ exchanger 1 requires an adequate intracellular store of anti-oxidants. *J Cell Physiol* 2018.
13. Claycomb WC, Lanson NA, Stallworth BS, et al. HL-1 cells: A cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:2979-2984.
14. Jezek P, Plecitiá-Hlavatá L. Mitochondrial reticulum network dynamics in relation to oxidative stress, redox regulation, and hypoxia. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41:1790-1804.
15. Skarka L, Ostadal B. Mitochondrial membrane potential in cardiac myocytes. *Physiol Res* 2002;51:425-434.
16. Halestrap AP, Pasdois P. The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1787:1402-1415.
17. Sridharan V, Guichard J, Li CY, et al. O(2)-sensing signal cascade: clamping of O(2) respiration, reduced ATP utilization, and inducible fumarate respiration. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008;295:C29-37.
18. Ganitkevich V, Reil S, Schwethelm B, et al. Dynamic Responses of Single Cardiomyocytes to Graded Ischemia Studied by Oxygen Clamp in On-Chip Picochambers. *Circ Res*. 2006;99:165-171.
19. Chen Q, Moghaddas S, Hoppel CL, et al. Reversible blockade of electron transport during ischemia protects mitochondria and decreases myocardial injury following reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;319:1405-1412.
20. Chen CH, Budas GR, Churchill EN, et al. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. *Science*. 2008;321:1493-1495.
21. Lesnefsky EJ, Gudiz TI, Migita CT, et al. Ischemic injury to mitochondrial electron transport in the aging heart: damage to the iron-sulfur protein subunit of electron transport complex III. *Arch Biochem Biophys* 2001;385:117-128.
22. Lesnefsky EJ, Slabe TJ, Stoll MS, et al. Myocardial ischemia selectively depletes cardiolipin in rabbit heart subsarcolemmal mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280:H2770-2778.
23. Görlach A, Dimova EY, Petry A, et al. Reactive oxygen species, nutrition, hypoxia and diseases: Problems solved? *Redox Biology*. 2015;6:372-385.