İnsülin-dirençli Memeli Kalp Fonksiyon Bozukluğunda Mitokondri-hedefli Antioksidan Mitotempo Uygulamasının Pozitif Etkileri

Beneficial Effect of a Mitochondrial-targeted Antioxidant Mitotempo in Insulin-resistant Mammalian Cardiac Dysfunction

© Ceylan Verda Bitirim¹, © Yusuf Olgar², © Deniz Billur³, © Kamil Akçalı², © Belma Turan⁴

¹Ankara Üniversitesi Kök Hücre Enstitüsü, Kök Hücre ve Yenileyici Tıp Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

²Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

³Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

⁴Lokman Hekim Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Öz

Amaç: Karbonhidrat ve/veya yağ ağırlıklı beslenme bireylerde insülin direnci ile karakterize metabolik sendrom (MetS) gelişmesine neden olmaktadır. Yaşam süresinin uzaması da toplumlar da ileri yaş grubu oranının hızla yükselmesi ile sonuçlanmakta ve yaşlanan popülasyonun önemli bir oranında ise insülin direnci gelişebilmektedir. İnsülin direnci ve kalp fonksiyonu bozukluğu arasında en azından reaktif oksijen türlerinin kontrolsüz üretimi yoluyla yakın ilişki olduğu ve bu ilişkide mitokondri bozulmasının rol oynadığı ileri sürülmektedir. Bu nedenle bu çalışmada, izole sıçan kardiyomiyositlerinde mitokondriyon-hedefli bir antioksidan uygulamasının olası pozitif etkilerinin elektrofizyolojik ve histolojik olarak incelenmesi hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada 24 aylık Wistar türü erkek sıçanlar (yaşlı grup; 7 adet), %32 oranında sukroz-beslenmesi ile MetS-grup oluşturulan erişkin (6 aylık; 7 adet) ve standart yemle beslenen erişkin (kontrol grup; 6 aylık ve 7 adet) sıçanlar kullanılmıştır. MetS, yüksek kan şekeri, oral glikoz tolerans testi ve serum insülin seviyeleri ile doğrulandı. Sol ventrikülden enzimatik yolla hücre izole edilerek, mitokondriyonların yapısal incelemeleri, hücrelerde fonksiyonel parametreler ve adenosin trifosfat (ATP)-duyarlı K⁺-kanal akımları (I_{KATP}) (patch-clamp ile) incelenmiştir.

Bulgular: İnsülin direnci gelişen sıçan kardiyomiyositlerinde, mitokondride fragmentasyonun arttığı, mitokondriyon-membran-potansiyelinin depolarize olduğu ve reaktif oksijen türleri miktarının arttığı gözlenmiştir. Yaşlı-sıçan kardiyomiyositlerinde I_{KATP}'nin deprese olduğu (p<0,05) ve ATP miktarının azaldığı (p<0,05) görülmüştür. MitoTEMPO uygulaması (0,1 µM ve 4-5 saat 37°C'de inkübasyon) tüm bu bozulmalarda pozitif etkiler oluşturmuştur (p<0,05).

Sonuç: Çalışma sonuçlarımız, mitokondriyon-hedefli antioksidan uygulamasının insülin direnci gelişmiş memeli MetS veya yaşlı sıçan kalp fonksiyon bozukluğunda koruyucu etkiler oluşturabildiğini ve ilaç tasarımlarında mitokondriyonların hedef olabileceğini işaret etmiştir.

Anahtar Kelimeler: Yaşlanma, Metabolik Sendrom, İnsülin Direnci, Kalp Fonksiyonu, Mitokondri, Antioksidanlar

Abstract

Objectives: Overfeeding with a high carbohydrate and/or high-fat diet induces metabolic syndrome (MetS) in humans, which is characterized by insulin-resistance. Long life span leads to increases in the ratio of aged humans in populations and an important percentage of the aged humans has insulin-resistance. There is a close relationship between insulin resistance and cardiac dysfunction, at least, via uncontrolled production of reactive oxygen species, while mitochondrial dysfunction plays an important role in that relation. To explore that relation, we aimed to examine the possible cardioprotective effect of a mitochondria-targeting antioxidant by using electrophysiological and histological examinations.

Materials and Methods: We used Wistar male rats in three groups as; those that were 24-month-old (elderly group; n=7), adults fed with 32% sucrose diet (MetS-group; 6-month-old; n=7), and adults fed with standard food (Control group; 6-month-old, n=7). MetS was confirmed with high blood glucose, oral glucose tolerance test, and serum insulin levels. Cardiomyocytes either treated with an antioxidant MitoTEMPO were

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Ceylan Verda Bitirim

Ankara Üniversitesi Kök Hücre Enstitüsü, Kök Hücre ve Yenileyici Tıp Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Tel.: +90 312 583 67 15 E-posta: bitirim@ankara.edu.tr ORCID ID: orcid.org/0000-0002-7979-0679

Geliş Tarihi/Received: 04.03.2021 Kabul Tarihi/Accepted: 23.03.2021

©Telif Hakkı 2021 Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, Galenos Yayınevi tarafından yayınlanmıştır.

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

Abstract

isolated from the left ventricle by enzymatic method, and the ultrastructure and function of mitochondria as well as adenosine triphosphate (ATP)-dependent K^+ -channel currents (I_{KATP} ; patch-clamp technique) were evaluated.

Results: There were marked increases in the fragmentation of mitochondria, depolarization in the membrane potential, and the production of ROS in insulin-resistant cardiomyocytes. There were significant decreases in I_{KATP} and ATP level ($p<0.05$) in the aged-cardiomyocytes. Incubation of those insulin-resistant or aged-cardiomyocytes with a mitochondria-targeting antioxidant MitoTEMPO (0.1 μ M, 4-5 h at 37°C) provided marked reverses in those parameters.

Conclusion: Overall, the present data strongly indicate that mitochondria-targeting antioxidant application can exert cardioprotective effects in either insulin-resistant MetS or aged mammals, providing strong implications on mitochondria as a novel strategy for prevention/treatment of cardiovascular diseases.

Key Words: Ageing, Metabolic Syndrome, Insulin Resistance, Cardiac Function, Mitochondria, Antioxidants

Giriş

Yaşlanma ve metabolik sendrom (MetS) gibi fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerde mitokondriyonlarda gerçekleşen fizyopatolojik değişikliklerin, daha çok artan, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine dayalı artan oksidatif kapasite ve azalan antioksidan savunma ile ilişkili olduğu bilinmektedir (1-3). Mitokondri, adenosin trifosfatı (ATP) üreterek enerji metabolizmasında önemli bir rolü olan, hücre içi Ca^{2+} homeostazı, ROS üretimi ve temizliği, apoptotik hücre ölümünün düzenlenmesi dahil olmak üzere hücrenin temel işlevlerinden sorumlu bir organeldir (4). Bu nedenle, mitokondriyonların fonksiyon bozukluğu ile kardiyomiyopati gelişimi ve ilerlemiş kalp yetmezliği riski arasında güçlü bir şekilde ilişki mevcuttur (5,6).

Mitokondriyonların yapısında anormallikler (genişlemiş organeller, matriks düzensizliği ve krista kaybı gibi), kalp enerji metabolizmasındaki ve ATP oluşumundaki değişimler serbest radikal oluşumunun artışı ve insülin direnci kardiyomiyosit yaşlanmasının ana nedenleri olarak kabul edilmektedir (7-9). Çeşitli çalışmalarda, yaşlı ve MetS'li sıçanlarda insülin direnci geliştiği ve bu bulguların klinik verileri paralel olduğu gösterilmiştir (9-15). İnsülin direncinin görüldüğü bu gruplarda sol ventrikül (LV) hipertrofisi insidansında artış, LV diyastolik fonksiyonunda azalma, sol atriyumda genişleme, ve atriyal fibrilasyon prevalansında artış gibi patolojik durumlar kardiyovasküler hastalıklarda gözlenen en önemli bulgulardır (9,10,16,17). Bunlara ek olarak, hücre ve organ seviyesinde gözlenen bulgular arasında, insülin direnci gelişmiş yaşlı veya MetS'li sıçan kardiyomiyositlerinde elektriksel aktivitede bozulmalar gözlenmiş (aksiyon potansiyeli süresinde uzama gibi), ventrikül depolarizasyonunu temsil eden QT-intervalinde önemli seviyede uzama, voltaj kapılı K^+ -kanal akımlarından belirgin azalma ve hücre içi Ca^{2+} homeostazında önemli değişimler gözlenmiştir (9,10).

MetS'nin, birden fazla risk faktörünün bir araya gelmesinden kaynaklandığı bilinmekle birlikte, genellikle insülin-direnci ile

karakterize edilen, kardiyovasküler sistem sorunlarıyla seyreden bir hastalıktır (11-13,18). Ayrıca, çalışmalar MetS insidansı ile ilişkili her bir faktörün diğerlerinden bağımsız olarak da kalbin yapısını ve işlevini etkileyebildiğini göstermektedir (18). Önemli bir hormon olan insülin, PI3K/PKB/Akt gibi çeşitli sinyal yollarında oynadığı çoklu rolleri aracılığıyla fizyolojik koşullarda kalp fonksiyonunda önemli roller üstlenmiştir (10). MetS'de, mitokondri fonksiyon bozulmasının ilerlemesi ile insülin direncinin artışı arasında çeşitli ilişkiler ileri sürülmektedir (19).

Deneyisel çalışmalar, daha düzensiz ve parçalanmış mitokondriyonlara paralel olarak yaşlı ve MetS'li sıçan kalbindeki mitokondriyon kaynaklı ROS üretiminin arttığını ve ATP düzeyinde önemli azalma olduğu gözlenmiştir (10,20). Bunlara ek olarak, bu grup memelilerde mitokondriyon membran potansiyelinde (MMP) depolarizasyon ve mitokondriyon dinamiklerde değişiklik ile birlikte mitokondriyal ve sitozolik Ca^{2+} -seviyelerinde aşırı artışlar gözlenmektedir (10,20,21). Bu gibi bulgular, mitokondriyon kaynaklı ROS üretiminde gözlenen yaşa bağlı artışın, mitokondriyon fonksiyon bozukluğunun altında yatan ana faktör olabileceğini ve organ fonksiyon yetersizliklerine sebep olabileceğine dair güçlü kanıtlar sağlamıştır (20,22). Bu nedenle, artmış olan mitokondriyon kaynaklı ROS üretiminin spesifik ve seçici bir şekilde engellenmesi, mitokondriyonların fonksiyonu üzerinde olumlu etkiler yapabileceği ve böylece hem yaşlanma hem de kardiyovasküler hastalıklar kapsamında umut verici bir kalbi koruyucu terapötik strateji olabileceği hipotezini kuvvetlendirmektedir (23). Hücrelerde mitokondriyon hedefli O_2^- ve H_2O_2 süpürücüsü olarak görev alan MitoTempo, mitokondriyon hedefli bir antioksidandır (24) ve MitoTEMPO-tedavisinin, yaşlı sıçan kardiyomiyositlerinde zayıflamış kalp kasılma fonksiyonunu düzelttiği, ve bu süreçte Ca^{2+} -homeostazının korunması ve kalbin ince yapısının düzelmesinin katkıları olduğu gözlenmiştir (9,20). Bu bulgular ışığında, bu çalışmamızda mitokondriyi hedefleyen bir antioksidan olan MitoTEMPO'nun *in vitro* koşullarda insülin direnci gelişmiş yaşlı veya MetS'li sıçanlarda LV'den taze olarak izole edilmiş kardiyomiyositlere etkilerinin histolojik ve elektrofizyolojik yöntemlerle incelenmesi hedeflenmiştir. Bulgularımız,

MitoTEMPO uygulamasının mitokondriyonların ince yapısını ve fonksiyonunu pozitif olarak etkileyerek, özellikle yaşlı sıçan kalbinde gözlenen mitokondriyon fonksiyon bozuklukları ve yetersizliklerini önleyebileceğini ve/veya geri döndürebileceğini işaret etmiştir.

Gereç ve Yöntem

Deney Hayvanları

Bu çalışmada kullanılan deney hayvanları Wistar türü erkek sıçanlar olup, hayvanlar Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir (Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu izni, No. 2016-18-165). Deney hayvanları olarak 3 grup kullanılmıştır. Yaşlı-grup 24 aylık sıçanlardan oluşmakta olup bunlardan insülin-direnci gelişen 7-adet sıçan deney grubu olarak kullanılmıştır (9). Bu grubun kontrolü olarak 6-aylık sıçanlar kullanılmıştır (Erişkin-grup, 7 adet). Üçüncü grup deney hayvanları, daha önceki çalışmalarımızda açıklandığı gibi yüksek karbonhidrat diyetine bağlı olarak (2-aylık sıçanlar standart yemlerine ek olarak %32 sukrozla 16-hafta beslenerek) erişkin MetS geliştirilmiş sıçanlardır (15). Tüm deney hayvanlarında insülin-direnci gelişimi, vücut ağırlığı, açlık kan şekeri ve serum-insülin seviyesi ölçümleri, insülin direnci ölçümü ve oral glukoz tolerans testi sonuçlarına göre valide edilmiştir.

Deney hayvanları, her kafeste 2-3 sıçan olmak üzere su ve yem kısıtlaması olmaksızın, standart deney hayvanları barınma koşullarında biyofizik anabilim dalında bulunan deney hayvanları barındırma ve bakım ünitesinde deneylere kadar muhafaza edilmişlerdir.

Taze Kardiyomiyosit İzole Edilmesi

Tüm deney gruplarına ait kalp dokusundan kardiyomiyosit izolasyonu (LV'den) önceki çalışmalarımızda verildiği gibi enzimatik yöntemle (collagenase tip-2) yapılmıştır (25). Langendorff-perfüzyon düzeneği yardımıyla kalpler vücuttan izole edildikten hemen sonra aorttan ters-perfüzyon yöntemi ile Ca^{2+} -içermeyen perfüzyon çözeltisi ile 5-dakika süreyle perfüze edildikten sonra, kollajenaz içeren çözelti ile yaklaşık 25-30 dakika perfüze edilmiştir. Perfüzyon süresi sonunda, sol ventrikül izole edilmiş ve bu bölgeden ayrılan hücreler 37°C'de ortamdaki Ca^{2+} -miktarı 0,5 mM olacak şekilde kademeli olarak Ca^{2+} arttırılarak elde edilen çözelti ile yıkanarak ölü hücrelerden arındırılmıştır. İzole kardiyomiyositler, izolasyondan 2 saat sonra, içerisinde 2 mg/mL BSA, 0,1 mM askorbik asit, 5 mM kreatine, 5 mM taurine, 1,6 mM karnitin ve %1 penisillin/streptomysin olan M199 medium ile değiştirilerek kültüre edilmiştir (26). İzole kardiyomiyositler ile deney grupları oluşturulurken, antioksidan uygulanmış gruplar ise izole kardiyomiyositler 0,1 μ M MitoTEMPO (Sigma) ile 4-5 saat 37°C'de inkübe edilerek antioksidan uygulanmış grup oluşturulmuştur.

Transmisyon Elektron Mikroskopunda (TEM) Kardiyomiyositlerin Yapısal Olarak İncelenmesi

Taze izole edilmiş LV kardiyomiyositlerinde TEM analizi önceki çalışmalarımızda açıklandığı gibi gerçekleştirilmiştir (9,20). Ultra-ince kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyandıktan sonra LEO 906 E TEM ile görüntülenmiştir (80 kV, Oberkochen, Almanya). Örnekleri fotoğraflamak için Sharpeye CCD ve Image SP (Almanya) dijital görüntüleme sistemleri kullanılmıştır.

MMP ölçülmesi

MMP ölçülmesi için JC-1 floresans boyası kullanılmış ve MMP ile ilgili floresans görüntülemesi lazer taramalı konfokal mikroskop kullanılarak (Leica TCS SP5) gerçekleştirilmiştir (9,10,20). Ölçümlerde fotobleaching etkisini azaltmak ve hızlı tarama yapabilmek için düşük çözünürlükte görüntü alınması ve lazer gücünün minimumda tutulmasına özen gösterilmiştir. Hücrelerden bazal yanıt alındıktan sonra 1 μ M FCCP verilerek MMP depolarizasyon miktarı gözlenmiştir. JC-1 boyası yeşil-kırmızı dalga boylarında ışıma veren bir boyadır. Mitokondri hiperpolarize iken uyarılan JC-1 floresan polimeri kırmızı renkte ışıma verir ve depolarizasyonla beraber sitoplazmaya dağılan boya bileşenleri yeşil renkte floresan verir. Yeşil/kırmızı floresan oranının artması membranın göreceli depolarize olduğunu göstermektedir. Hücrelerde MMP ölçümü için karbonil siyanid 4-(triflorometoksi)fenilhidrazon, FCCP (1 μ M) uygulaması altında floresan şiddetindeki değişim oranı değerlendirilerek gerçekleştirilmiştir.

İzole Kardiyomiyositlerde ROS Seviyesinin Ölçülmesi

Kardiyomiyositlerde ROS, ROS oluşumuna spesifik floresan boya (DCDFA 10 μ M) kullanılarak konfokal mikroskopunda (Leica TCS SP5) floresan şiddetinde değişim olarak görüntülenmiştir. ROS ölçümü için takip edilen işlemde ROS varlığında DCFH, hücre zarına nüfuz edemeyen güçlü bir yeşil floresan madde olan diklorofloresin (DCF) oksitlenmesi temeline dayanmaktadır. Taze izole edilmiş ventrikül hücreleri DCFDA ile yüklenmiş ve bazal ölçümler alındıktan sonra yüksek doz (100 μ M) H_2O_2 uygulanmış ve daha sonra başlangıç ve maksimum yoğunluk olan 2 noktalı ölçümlerle ROS seviyesindeki kat-artışı gözlenmiştir. ROS oluşumu için eksitasyon ve emisyon dalga boyları: E_{ex} : 490 nm ve E_{em} : 530 nm kullanılmıştır.

ATP Duyarlı K^+ -kanal Akımlarının (I_{KATP}) Kaydedilmesi

Taze izole edilen hücreler, içeriği (mM olarak): NaCl 137, KCl 4, HEPES10, $MgCl_2$ 1, $CaCl_2$ 1.8, pH: 7,40) olan banyo çözeltisinde bir süre muhafaza edilmiştir. Daha sonra patch-pipetleri içeriği (mM olarak): KCl 130, MgATP 0,05, EGTA 5, HEPES 25 pH=7,2 CsOH ile) olan çözelti ile doldurularak, K-ATP kanal akımları (I_{KATP}) voltaj-kenetleme konfigürasyonunda, -70 mV düzeyine kenetlenmiş hücrelere 200 ms'lik (+50 mV) test pulsu uygulanarak, önce Na^+ -akımlarının inaktivasyonu sağlanmıştır (+50 mV potansiyelden -120 mV'lik potansiyele 5 saniye süren bir ramp-test uygulanmıştır).

I_{KATP} ölçümü için, bir kanal açıcısı olan FCCP (1 μ M) kullanılmış ve kanal inhibisyonu için hücrelere glibenklamid (40 μ M) verilmiştir. FCCP yanıtının glibenklamid yanıtından çıkarılmasıyla I_{KATP} (pA) elde edilmiştir. Elde edilen akımlar hücre büyüklüğüne (pF cinsinden) bölünerek akım yoğunluğunun (pA/pF) voltaja göre değişimi (I-V karakteristiği) incelenmiştir.

Hücrelerde Adenozin Difosfat (ADP)/ATP Oranının Ölçülmesi

Hücrelerde ADP/ATP oranı bir konvensiyonel ADP/ATP ratio assay kit (ab65313) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kısaca ölçümler için takip edilen yol, lusiferazın katalizleyerek dönüşüm yapması ilkesine dayanmakta olup, bir luminatör ile son ürünü ölçmeye dayanmaktadır. Burada ADP seviyesi ATP'ye dönüşme seviyesi olarak ölçülmektedir (27).

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için Student's t-test kullanılmıştır. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiş ve istatistiksel olarak anlamlılık seviyesi $p < 0,05$ kabul edilmiştir.

Bulgular

MitoTEMPO Uygulamasının MetS ve Yaşlı Sıçan Kardiyomiyositlerindeki Mitokondriyonların Yapısı Üzerine Etkileri

İnsülin direnci gelişmiş yaşlı ve MetS'li sıçanlarda LV kardiyomiyositlerinin ince yapısındaki değişimleri incelemek için TEM ile gözlemler yapılmıştır. Önceki çalışmalarımızda, her 2 gruba ait kalbin LV örneklerinin ışık mikroskobu ile incelemesinde kalp kası lifleri arasında artmış fibrozis varlığında kardiyomiyositlerde yapısal değişiklikler olduğu ve kalbin mekanik aktivitesinin deprese olduğu gözlenmiştir (9,10,15,20,22). TEM ile ventrikülden izole edilen kardiyomiyositler üzerinde yapılan incelemelerde her iki grupta da benzer olarak kardiyomiyositlerde düzensiz olarak bölünmüş ve kümelenmiş intermiyofibriler mitokondriyonlar ve lizozomlar gözlenmiştir.

Her iki grupta da mitokondriyal fragmentasyonu dikkat çekmektedir (Şekil 1A, B). Mitokondriyon hedefli antioksidan olan MitoTEMPO uygulaması (0,1 μ M ve 4-5 saat 37°C'de inkübasyon) sonrası kardiyomiyositlerde intermiyofibriler mitokondriyonlarda fragmentasyonda önemli derecede azalma gözlenmiş, mitokondriyonların sağlıklı kontrol gruplarındakine benzer biçimde sarkomer uzunluğu boyunca düzenli yerleşim sergilediği görülmüştür.

MitoTEMPO Uygulamasının Yaşlı-sıçan Kardiyomiyositlerinde Mitokondri Membran Potansiyeli ve ROS Seviyesine Etkileri

Yaşlanmayla birlikte bozulmuş mitokondriyon fonksiyonları ve redoks sisteminde MitoTEMPO'nun etkisini incelemek amacıyla MMP ile ROS ölçümü yapılmıştır. Erişkin ve yaşlı sıçanlardan taze olarak izole edilen ventrikül hücreleri (MitoTEMPO ile

inkübe edilmiş (+) ve edilmemiş (-); 0,1 μ M ve 4-5 saat 37°C'de) kullanılmıştır. Yaşlanmayla birlikte MMP'nin depolarize olduğu, bir antioksidan olan MitoTEMPO'nun uygulamasının MMP'nin düzelmesini sağladığı gözlenmiştir (Şekil 2A).

Bir başka grup incelemelerde, hücre içi ROS üretimi ve bu üretime MitoTEMPO uygulamasının etkileri gerçekleştirilmiştir. Daha önceki çalışmamızda MetS grubu hücrelerde ROS artışı gözlenmiş olduğu için bu grup çalışmamızda sadece yaşlı grubun ROS üretimi erişkin grupla karşılaştırılmıştır. Yaşlı grupta bazal ROS miktarının yüksek olduğu ve daha fazla ROS ürettiği floresan şiddetindeki farklarla gözlenmiştir. MitoTEMPO uygulaması ROS üretiminin belirgin şekilde azalmasına neden olduğu gözlenmiştir (Şekil 2B).

Bu bulgular, mitokondriyon-hedefli bir antioksidan uygulamasının ROS miktarını azaltarak ve MMP depolarizasyonunu önleyerek insülin direnci altında kalpte koruyucu etkiler oluşturabileceği hipotezini kuvvetlice desteklemektedir.

İnsülin-direnci Gelişmiş Yaşlı Sıçan Kardiyomiyositlerinde ATP-duyarlı K^{+} -kanal Akımlarına ve ADP/ATP Oranına MitoTEMPO Uygulamasının Etkileri

Bu grup incelemelerimizde, yaşlı-sıçan kardiyomiyositlerinde mitokondri-hedefli bir antioksidan MitoTEMPO uygulamasının ATP-duyarlı K^{+} -kanal akımlarına (I_{KATP}) ve ADP/ATP oranına etkileri incelenerek hücresel düzeyinde elektriksel ve energetik aktivitelere olası katkıları gösterilmiştir. I_{KATP} yama-kenetleme tekniğinin voltaj kenetleme modunda ve tüm-

Şekil 1: Metabolik sendromlu yetişkin grupla karşılaştırmalı olarak yaşlı grup sıçan sol ventrikül kardiyomiyositlerine MitoTEMPO etkisinin elektron mikroskobu ile incelenmesi. Yaşlı (24 aylık) (A) ve metabolik sendromlu (MetS) erişkin (6 aylık) (B) grup sıçan sol ventrikül hücrelerine *in vitro* MitoTEMPO (0,1 μ M ve 4-5 saat 37 °C'de inkübasyon) uygulamasının transmisyon elektron mikroskobu (TEM) incelemesinde, uygulanmamış duruma göre (-MitoTEMPO), düzensiz olarak bölünmüş ve kümelenmiş intermiyofibriler mitokondriyonlar ve lizozomların (solda) düzeldiği ve özellikle mitokondriyon yapısındaki düzeltilmelerin (daha az mitokondriyon fragmentasyonu gibi) belirgin olduğu gözlenmiştir. Bar: 1,000 nm; Büyütme: x21560

hücre konfigürasyonunda ve bir kanal açıcısı olan FCCP (1 μ M) kullanılarak gerçekleştirilmiş olup, incelemelerimiz -120 mV ile +50 mV arasındaki depolarizasyonlarla gerçekleştirilmiştir. Kullanılan akım-kayıt protokolü ve kanalların bu potansiyeller arasında oluşturdıkları akım değerleri (akım-voltaj karakteristiği, I-V) Şekil 3'te (sol ve sağ) verilmiştir. Maksimum I_{KATP} +50 mV'de ölçülmüş olup, Yaşlı grupta ($32,2 \pm 5,0$ pA/pF) Erişkin gruba ($52,3 \pm 3,1$ pA/pF) göre anlamlı seviyede (yaklaşık 2 kat) azalırken ($p < 0,05$), MitoTEMPO uygulaması ($59,1 \pm 3,9$ pA/pF) bu azalmayı tam olarak düzelttiği gözlenmiştir (Şekil 3B).

ADP/ATP oranı Erişkin grupla ($1,00 \pm 0,29$) karşılaştırıldığında, yaşlı grupta ($2,11 \pm 0,31$) 2 kat arttığı gözlenmiştir. Mitokondriyon hedefli antioksidan MitoTEMPO uygulaması ADP/ATP oranında tam bir düzelleme ($1,05 \pm 0,28$) sağlamıştır (Şekil 3C). MitoTEMPO uygulamasının yaşlı sıçan kardiyomiyosit maksimum I_{KATP} olan etkisi ile ADP/ATP oranına olan etkisinin aynı seviyelerde olması oldukça dikkat çekici bir bulgudur.

Tartışma

Bu çalışmanın bulguları, memelilerde sistemik olarak insülin direncinin gelişmesi, kardiyometabolik bozukluklar olarak tanımlanan ve özellikle mitokondriyon fonksiyon bozukluğu ile karakterize patolojiler gelişmesine yol açtığını (ROS artışı ve ATP azalması gibi) göstermiştir. Bu kapsamda, insülin direnci gelişmiş hem MetS'li sıçan kardiyomiyositlerinde hem de yaşlı sıçan kardiyomiyositlerinde ince yapının benzer şekilde bozulduğu, mitokondriyon fragmasyonunun belirgin olarak arttığı ve MMP'nin depolarize olduğu gözlenmiştir. Bunlara ek

Şekil 2: MitoTEMPO uygulamasının JC-1 yüklü kardiyomiyositlerde mitokondriyon membran potansiyelinin (MMP) ve H2DCFDA yüklü kardiyomiyositlerde ROS üretimine etkilerinin floresan şiddeti değişimi ile ölçülmesi. (A) Yaşlı sıçanlardan alınan sol ventrikül kardiyomiyositlere in vitro MitoTEMPO (0,1 μ M ve 4-5 saat 37°C'de inkübasyon) uygulamasının mitokondriyon membran potansiyeli (MMP) depolarizasyonuna etkisi. (B) MitoTEMPO inkübasyonu ile CM-H2DCFDA'da yüklü floresan şiddeti değiştiğinde, reaktif oksijen türlerinin (ROS) (alt kısım) başlangıç değerlerine (orta kısım) oranla artmaktadır ve ROS değişimini ifade etmektedir

olarak, insülin-direnci gelişen yaşlı sıçan kardiyomiyositlerinde, I_{KATP} 'nin deprese olduğu ve MitoTEMPO uygulamasının yukarıda değişimler yanında bu akımların da belirgin şekilde normal seviyelere dönüş yaptığı (pozitif etkiler) gözlenmiştir. Özet olarak çalışma sonuçlarımız, mitokondriyon-hedefli antioksidan uygulamasının insülin-direnci gelişmiş memeli MetS veya yaşlılarda kalp fonksiyon bozukluğunda koruyucu etkiler oluşturabildiğini ve ilaç tasarımlarında mitokondriyonların yeni bir hedef olabileceğini işaret etmiştir.

Çeşitli çalışmalar, mitokondriyon fonksiyon bozukluğunun insülin direnci ilişkili kalp fonksiyon bozukluğu/yetmezliği patogeneğinde anahtar rol oynadığını göstermektedir (28). Buna ek olarak çalışmalar, genel olarak kardiyovasküler hastalıklarda, mitokondriyon fonksiyon bozukluğu, aşırı ROS üretimi, depolarize olmuş MMP ve anormal mitokondriyon ince yapısı arasındaki çapraz ilişkiyi vurgulamaktadır. Bu değişen faktörler bir sonraki aşamada, ATP sentezinin azalması ve kalpte yeniden şekillenme ile sonuçlanır (29). Bu nedenle mitokondriyon-hedefli tedavi stratejilerinin, kalp fonksiyon bozukluğu/yetmezliği ve insülin direncini düzenleyebileceğini kuvvetle işaret etmektedir (30).

Şekil 3: Erişkin ve yaşlı sıçan sol ventrikülünden izole edilmiş hücrelerde MitoTEMPO uygulamasının K-ATP kanal akımı (I_{KATP}) yoğunluğuna ve ADP/ATP oranına etkisi. (A) I_{KATP} ölçümü için kullanılan protokol (sol taraf) ve FCCP yanıtının glibenklamid yanıtından çıkarılmasıyla elde edilen I_{KATP} yoğunluğunun (I_{KATP} 'leri hücre sığasına oranlanarak hesaplanmıştır) uyarı potansiyellerine göre değişim karakteristiği (I-V değişimi). (B) Antioksidan (MitoTEMPO; 0,1 μ M ve 4-5 saat 37°C'de inkübasyon) uygulamasının Yaşlı sıçan sol ventrikül hücrelerindeki K-ATP kanalına ait I-V (Akım-voltaj) karakteristiğine etkisi gösterilmiştir. (C) I_{KATP} 'lerinin 450 mV'de ölçülen maksimum değerleri. (D) Taze izole edilmiş Yaşlı-sıçan kardiyomiyositlerinde metabolik enerji tüketimi (ADP/ATP oranı) analizi ve MitoTEMPO uygulamasının bu orana etkisi. Grafiklerdeki değerler ortalama ($\pm$ SEM) olarak verilmiştir. Her bir ölçüm için hücre sayısı en az n=7-8 olup, * $p < 0,05$ erişkin grup, * $p < 0,05$ yaşlı grup

ADP/ATP: Adenozin difosfat/adenozin trifosfat, SEM: Standart hata

Son on yılda yapılan çalışmalar, farmakolojik stratejiler ve mitokondriyon-hedefli yaklaşımların temel olarak mitokondriyon fonksiyon bozukluğu ve oksidatif stresi azaltmaya ve MetS'lerde mitokondriyon kalitesini korumaya odaklanmış olduğunu göstermektedir (14). Hücrel ve hayvan modellerinde yapılan tüm bu çalışmalar, mitokondriyon kaynaklı ROS üretiminin azaltılmasının, mitokondriyonların fonksiyonu üzerindeki olumlu etkileri nedeniyle hem yaşlanma hem de kardiyovasküler hastalıklar kapsamında umut verici bir kalbi koruyucu strateji olabileceğini (31) ve bu stratejinin mitokondri hedefli antioksidant tedaviler olabileceğini öne sürmektedir. Bu çalışmamızda, mitokondriyon-hedefli bir antioksidant olan MitoTEMPO'nun insülin-direnci gelişmiş hem MetS'li ve hem de yaşlı memeli kalp fonksiyon bozukluğunda koruyucu etkileri olduğunu ve bu böylece mitokondriyonların kalp fonksiyon bozukluğunda ümit verici bir terapötik hedef olabileceği gösterilmiştir. Çalışmamızı destekleyen başka çalışmalarda, MitoTEMPO'nun doksorubisine bağlı kardiyotoksisteye ve diyabetik kardiyomiopatinin komplikasyonlarına karşı koruyucu etkisi olduğu, MetS ve yaşlanmada görülen aşırı mitokondriyon kaynaklı ROS üretimini azalttığı, yaşlı farelerde vasküler fonksiyon bozukluğunun düzenlenmesinde etkili olduğu gösterilmiştir (32,33). Daha önceki çalışmamızda, MitoTEMPO uygulamasının yaşlı sıçan kardiyomyositlerindeki mitokondriyonlarda gözlenen aşırı parçalanmayı (fragmentasyon), ve mitokondriyonlardaki füzyon ve fizyon süreçlerinde rolü olan OPA-1 ve FIS-1 proteinlerinin ifadesini arttırarak önemli ölçüde baskıladığı gösterilmiştir (20). Bu çalışmada histolojik bulgularımız insülin direnci gelişmiş yaşlı ve MetS'li sıçanlarda kalp fonksiyon yetersizliğine sebep olan mitokondriyonların bütünlüğünde bozulma ve mitokondriyonlarda fragmentasyon, MitoTEMPO uygulamasının ardından dikkat çekici şekilde düzeldiği ve mitokondriyonların düzenlenmesini indüklediği gözlenmiştir. Bu bulgular, mitokondriyon-hedefli antioksidan tedavisinin yapısal hasarları düzelterek mitokondriyon fonksiyonunu ve böylece kalbin kontraktilesini etkileyebileceğini göstermektedir. Önceki çalışmalarda bizim bulgumuzla uyumlu olarak, mitokondriyonlarda aşırı fragmentasyon ile doğrudan ilişkili olan hücre içi Ca^{2+} homeostazının yaşlı kardiyomyositlerde MitoTEMPO tedavisi ile düzenlendiği rapor edilmiştir (34,20).

İnsülin direnci gelişmiş yaşlı sıçan kalbinde aşırı fragmentasyon gelişmiş mitokondriyonların yapısı ile birlikte mitokondriyon kaynaklı ROS üretiminin arttığını, MMP'nin depolarize olduğu gösterilmiştir (35). Diğer yandan, oksidatif stresin yaşlanma, kanser ve yaşa bağlı metabolik bozukluklar ve nörodejeneratif hastalıkları içeren çeşitli patofizyolojik durumlarla ilişkili olduğu bilinmektedir (36,37). Daha önceki bulgularımızda yaşlı sıçanlarda organ düzeyinde elektriksel aktivitenin bozulduğunu, hücrel düzeyde ise aksiyon potansiyeli repolarizasyon süresinin uzadığı ve volta-kapılı K^{+} -kanal akım yoğunluğunun azaldığı gösterilmiştir (9,20). Bu çalışmada,

literatürde ilk kez olmak üzere, yaşlı sıçan LV kardiyomyositlerinde ATP-duyarlı K^{+} -kanal akım yoğunluğunun azaldığını, antioksidan MitoTEMPO uygulaması ile bu akımda önemli derecede düzelme gerçekleştiği gösterilmiştir. Mitokondriyonların fonksiyonunda bozulmalar, hücrelerin ATP üretiminde azalmaya ve böylece ATP seviyelerinde yetersizliğe neden olur. Hücrelerde ATP/ADP oranının değişmesi (ADP seviyesinin yükselmesi) ise mitokondriyon K-ATP kanalının aktivasyonuna yol açar. Diğer yandan, yaşlanma veya MetS gibi metabolik bozukluklar sonunda bozulan iyonik mekanizmaların ayrıca bu grup patolojilerde artan oksidatif stres ile de indüklendiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (38). Bu tip kanalların hücrenin redoks süreçlerinden etkilenebileceğini ya da artmış oksidatif stresin ADP/ATP oranını bozabileceğini işaret eden çalışmalar da mevcuttur. Örneğin, Bao ve ark. (39) yaşlanma sürecinde K-ATP kanal akım yoğunluğundaki azalmanın kanalın nükleotid duyarlılığındaki azalmaya bağlı olduğunu rapor etmişlerdir. Bu bulgu ile paralel olan sonuçlarımıza göre, yaşlanma ile azalan ATP üretimi, antioksidan MitoTEMPO uygulaması ile artarak, ADP/ATP oranı erişkin kardiyomyosit ile aynı seviyeye gelmesini sağlamıştır. Hücrel, elektriksel ve mekanik işlev bozukluğunda önemli bir rolü olan ROS artışının MitoTEMPO tedavisi ile baskılanması ve beraberinde mitokondriyon membran depolarizasyonunun düzelmesi yaşanan memeli kardiyovasküler sisteminde mitokondriyon-hedefli antioksidan tedavisinin kalbi koruyucu bir ajan olarak kullanılabilirliğini ve yaşlanmaya bağlı hasarları hafifletebileceğini işaret etmektedir.

Sonuç

Sonuç olarak, tüm bulgular, yaşlı veya MetS'li kardiyomyositlerde gözlenen mitokondriyon fonksiyon bozukluğu, insülin direncinin ve buna bağlı komplikasyonların merkezi bir nedeni olabileceğini kuvvetle desteklemektedir. Mitokondriyon fonksiyon bozukluğunun, mitokondriyon-hedefli tedavi stratejileri ile düzeltilmeye çalışılması, özellikle yaşlanma ve MetS ile gelişen kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde/ tedavisinde önemli gelişmelere zemin olabileceğini işaret etmektedir.

Etik Kurul Onayı: Etik onayı Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Karar no: 2016-18-165, tarih: 21.09.2016).

Hasta Onayı: Bu çalışmada bir hayvan deneyi çalışması olduğundan hasta onayı alınmamıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulunun dışından olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

Yazarlık Katkıları

Konsept: B.T., K.C.A., Dizayn: B.T., Veri Toplama veya İşleme: C.V.B., Y.O., D.B., Analiz veya Yorumlama: C.V.B., Y.O., D.B., B.T., K.C.A., Literatür Arama: C.V.B., Y.O., Yazan: B.T.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansal Destek: Bu çalışmanın finansal desteği, TÜBİTAK SBAG-216S979 nolu projeden sağlanmıştır.

Kaynaklar

- Durak A, Bitirim CV, Turan B. Titin and CK2 α are New Intracellular Targets in Acute Insulin Application-Associated Benefits on Electrophysiological Parameters of Left Ventricular Cardiomyocytes From Insulin-Resistant Metabolic Syndrome Rats. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2020;34:487-501.
- Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003;552:335-344.
- Nickel A, Kohlhaas M, Maack C. Mitochondrial reactive oxygen species production and elimination. *J Mol Cell Cardiol.* 2014;73:26-33.
- Lesnefsky EJ, Chen Q, Hoppel CL. Mitochondrial Metabolism in Aging Heart. *Circ Res.* 2016;118:1593-1611.
- Murphy MP. Understanding and preventing mitochondrial oxidative damage. *Biochem Soc Trans.* 2016;44:1219-1226.
- Nguyen BY, Ruiz-Velasco A, Bui T, et al. Mitochondrial function in the heart: the insight into mechanisms and therapeutic potentials. *Br J Pharmacol.* 2019;176:4302-4318.
- Bhashyam S, Parikh P, Bolukoglu H, et al. Aging is associated with myocardial insulin resistance and mitochondrial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293:3063-3071.
- McMillin JB, Taffet GE, Taegtmeyer H, et al. Mitochondrial metabolism and substrate competition in the aging Fischer rat heart. *Cardiovasc Res.* 1993;27:2222-2228.
- Olgar Y, Degirmenci S, Durak A, et al. Aging related functional and structural changes in the heart and aorta: MitoTEMPO improves aged-cardiovascular performance. *Exp Gerontol.* 2018;110:172-181.
- Durak A, Olgar Y, Degirmenci S, et al. A SGLT2 inhibitor dapagliflozin suppresses prolonged ventricular-repolarization through augmentation of mitochondrial function in insulin-resistant metabolic syndrome rats. *Cardiovasc Diabetol.* 2018;17:144.
- Das RR, Mangaraj M, Panigrahi SK, et al. Metabolic Syndrome and Insulin Resistance in School children From a Developing Country. *Front Nutr.* 2020;7:31.
- Belhayara MI, Mellouk Z, Hamdaoui MS, et al. The Metabolic Syndrome: Emerging Novel Insights Regarding the Relationship between the Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance and other Key Predictive Markers in Young Adults of Western Algeria. *Nutrients.* 2020;12:727.
- Shou J, Chen PJ, Xiao WH. Mechanism of increased risk of insulin resistance in aging skeletal muscle. *Diabetol Metab Syndr.* 2020;12:14.
- Bhatti JS, Bhatti GK, Reddy PH. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders - A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2017;1863:1066-1077.
- Durak A, Olgar Y, Tuncay E, et al. Onset of decreased heart work is correlated with increased heart rate and shortened QT interval in high-carbohydrate fed overweight rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2017;95:1335-1342.
- Lakatta EG, Levy D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part II: the aging heart in health: links to heart disease. *Circulation.* 2003;107:346-354.
- Triposkiadis F, Xanthopoulos A, Butler J. Cardiovascular Aging and Heart Failure: JACC Review Topic of the Week. *J Am Coll Cardiol.* 2019;74:804-813.
- Okatan EN, Tuncay E, Hafez G, et al. Profiling of cardiac β -adrenoceptor subtypes in the cardiac left ventricle of rats with metabolic syndrome: Comparison with streptozotocin-induced diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2015;93:517-525.
- Mitchell T, Darley-USmar V. Metabolic syndrome and mitochondrial dysfunction: insights from pre-clinical studies with a mitochondrially targeted antioxidant. *Free Radic Biol Med.* 2012;52:838-840.
- Olgar Y, Billur D, Tuncay E, et al. MitoTEMPO provides an antiarrhythmic effect in aged-rats through attenuation of mitochondrial reactive oxygen species. *Exp Gerontol.* 2020;136:110961.
- Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:10771-10778.
- Olgar Y, Tuncay E, Degirmenci S, et al. Ageing-associated increase in SGLT2 disrupts mitochondrial/sarcoplasmicreticulum Ca^{2+} homeostasis and promotes cardiac dysfunction. *J Cell Mol Med.* 2020;24:8567-8578.
- Ernster L, Forsmark P, Nordenbrand K. The mode of action of lipid-soluble antioxidants in biological membranes: relationship between the effects of ubiquinol and vitamin E as inhibitors of lipid peroxidation in submitochondrial particles. *Biofactors.* 1992;3:241-248.
- Trnka J, Blaikie FH, Smith RA, et al. A mitochondria-targeted nitroxide is reduced to its hydroxylamine by ubiquinol in mitochondria. *Free Radic Biol Med.* 2008;44:1406-1419.
- Turan B, Fliss H, Désilets M. Oxidants increase intracellular free Zn^{2+} concentration in rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol.* 1997;272:2095-2106.
- Pfeiffer ER, Wright AT, Edwards AG, et al. Caveolae in ventricular myocytes are required for stretch-dependent conduction slowing. *J Mol Cell Cardiol.* 2014;76:265-274.
- Degirmenci S, Olgar Y, Durak A, et al. Cytosolic increased labile Zn^{2+} contributes to arrhythmogenic action potentials in left ventricular cardiomyocytes through protein thiol oxidation and cellular ATP depletion. *J Trace Elem Med Biol.* 2018;48:202-212.
- Kumar AA, Kelly DP, Chirinos JA. Mitochondrial Dysfunction in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Circulation.* 2019;139:1435-1450.
- Neubauer S. The failing heart--an engine out of fuel. *N Engl J Med.* 2007;356:1140-1151.
- Saotome M, Ikoma T, Hasan P, et al. Cardiac Insulin Resistance in Heart Failure : The Role of Mitochondrial Dynamics. *Int J Mol Sci.* 2019;20:3552.
- Senoner T, Dichtl W. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: Still a Therapeutic Target? *Nutrients.* 2019;11:2090.
- Ma J, Wang Y, Zheng D, et al. Rac1 signalling mediates doxorubicin-induced cardiotoxicity through both reactive oxygen species-dependent and -independent pathways. *Cardiovasc Res.* 2013;97:77-87.
- Vendrov AE, Vendrov KC, Smith A, et al. NOX4 NADPH Oxidase-Dependent Mitochondrial Oxidative Stress in Aging-Associated Cardiovascular Disease. *Antioxid Redox Signal.* 2015;23:1389-1409.
- Frieden M, James D, Castelbou C, et al. Ca^{2+} homeostasis during mitochondrial fragmentation and perinuclear clustering induced by hFis1. *J Biol Chem.* 2004;279:22704-22714.
- Galloway CA, Yoon Y. Mitochondrial dynamics in diabetic cardiomyopathy. *Antioxid Redox Signal.* 2015;22:1545-1562.
- Ruiz-Meana M, Bou-Teen D, Ferdinandy P, et al. Cardiomyocyte ageing and cardioprotection: consensus document from the ESC working groups cell biology of the heart and myocardial function. *Cardiovasc Res.* 2020;116:1835-1849.
- Strait JB, Lakatta EG. Aging-associated cardiovascular changes and their relationship to heart failure. *Heart Fail Clin.* 2012;8:143-164.
- Rochlani Y, Pothineni NV, Kovelamudi S, et al. Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2017;11:215-225.
- Bao L, Taskin E, Foster M, et al. Alterations in ventricular K(ATP) channel properties during aging. *Aging Cell.* 2013;12:167-176.