



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**ÇİNKO-TAŞIYICILARI VE MİTOKONDİRİ
İLİŞKİSİNİN YAŞLANMAYA BAĞLI KALP
FONKSİYON BOZUKLUĞUNDAKİ ROLÜNÜN
İNCELENMESİ**

Yusuf OLĞAR

**BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. BELMA TURAN**

**ANKARA
2018**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇİNKO-TAŞIYICILARI VE MİTOKONDİRİ
İLİŞKİNİNİN YAŞLANMAYA BAĞLI KALP
FONKSİYON BOZUKLUĞUNDAKİ ROLÜNÜN
İNCELENMESİ**

Yusuf OLĞAR

**BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. BELMA TURAN**

**ANKARA
2018**

Etik Beyan

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Çinko-Taşıyıcıları ve Mitokondri İlişkisinin Yaşlanmaya Bağlı Kalp Fonksiyon Bozukluğundaki Rolünün İncelenmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Yusuf OLĞAR

Tarih:20/12/2018

İmza:

Kabul Onay



İÇİNDEKİLER

Etik beyan	ii
Kabul onay	iii
İçindekiler	iv
Simgeler ve kısaltmalar	viii
Şekiller	ix
Çizelgeler	xi
GİRİŞ	1
1.1. Kalbin Yapısı	1
1.2. Aksiyon Potansiyeli ve Uyarılma Kasılma Çiftlenimi	2
1.3. Yaşlanma ve Epidemiyolojisi	5
1.4. Kardiyovasküler Yaşlanma	6
1.5. Yaşlanmada Mitokondri Düzeyindeki Değişimler	8
1.6. Biyolojik Sistemlerde Çinko	10
1.7. Çalışmanın Amacı	13
2. GEREÇ VE YÖNTEM	16
2.1. Deney hayvanları ve sistemik parametrelerinin Gözlenmesi	16
2.1.1. Sıçanlarda İnsülin Direncinin Gözlenmesi	16
2.1.2. Sıçanlarda Periferik Kan Basıncının Kuyruktan ölçülmesi	16
2.1.3. Sistemik ve Hücre Düzeyinde Oksidatif Parametrelerin Ölçülmesi	17
2.1.4. Sıçanlarda Elektrokardiyogram (EKG) Ölçülmesi	17
2.1.5. Sıçanlarda in situ Olarak Basınç-Hacim İşinin Ölçülmesi	18
2.2. İzole Organ İncelemeleri	18
2.2.1. Sol Ventrikül İçi Basınç Değişimlerinin Ölçülmesi	18
2.2.2. Aort Örneklerinde Kasılma ve Gevşeme Yanıtlarının Ölçülmesi	19
2.3. Aort ve Kalpte Histolojik incelemeler	19
2.3.1. Işık Mikroskobu (IM) İncelemeleri	19
2.3.2. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) İncelemeleri	20
2.3.3. Yarı İnce Kesit Boyama Protokolü	21
2.3.4. İnce Kesit Boyama Protokolü	21

2.4. İzole Kardiyomiyositlerde İncelemeler	21
2.4.1. Sol Ventriküler Kardiyomiyositlerin İzolasyonu	21
2.4.2. İzole Kardiyomiyositlerde Aksiyon Potansiyeli Kaydedilmesi	22
2.4.3. K ⁺ -kanal Akımlarının Ölçülmesi	23
2.4.4. Na ⁺ -kanal Akımlarının Ölçülmesi	24
2.4.5. L-tipi Ca ⁺² -Kanal Akımlarının Ölçülmesi	24
2.4.6. ATP Duyarlı K ⁺ -kanal Akımlarının Ölçülmesi	24
2.4.7. Na ⁺ / K ⁺ -pompa Akımının Ölçülmesi	25
2.4.8. Hücre İçi Serbest Ca ⁺² Değişimlerinin Ölçülmesi	26
2.4.9. Hücre İçi Serbest Na ⁺ Değişimlerinin Ölçülmesi	26
2.4.10. Hücre İçi Serbest H ⁺ Değişimlerinin Ölçülmesi	27
2.4.11. İzole Kardiyomiyositlerde ROS ve RNS Ölçümleri	27
2.4.12. Kardiyomiyositlerde Hücre içi Serbest Zn ⁺² Ölçümü	28
2.5. Mitokondride Yapılan İncelemeler	30
2.5.1. Mitokondri Membran Potansiyelinin Ölçülmesi	30
2.5.2. Mitokondri Oksidatif Stres Seviyesinin Ölçümleri	30
2.6. Biyokimyasal İncelemeler	31
2.6.1. Protein Tiyol (SH) Oksidasyonunun Ölçülmesi	31
2.6.2. Western-blot (immuno-blot) Tekniği ile Protein Seviyesi Ölçülmesi	31
2.6.3. Toplam RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi	32
2.7. H9c2 hücre Kültürünün Üretilmesi ve Kullanılması	34
2.8. Kullanılan Kimyasallar	35
2.9. İstatistiksel Analizler	35
3. BULGULAR	36
3.1. Yaşlanmaya Bağlı Sistemik Değişimler	36
3.2. Yaşlanmanın Kalp İşine Etkisi	38
3.3. Yaşlanmada Sistemik Oksidatif Stres ile İlgili Bulgular	40
3.4. Yaşlanmaya Bağlı Değişimlerin İzole Organlarda İncelenmesi	40
3.5. Aort ve Kalp Kası ile İlgili Histolojik Bulgular	43
3.6. Yaşlanmanın Kalbin Elektriksel Aktivitesine Etkisinin İzole Kardiyomiyositlerde Gösterilmesi	44
3.6.1. Yaşlı Sıçan Kardiyomiyositlerinde Oksidasyon Seviyesi ile İlgili Bulgular	45

3.6.2. Yaşlanmanın İzole Kardiyomiyositlerde Aksiyon Potansiyeli Parametrelerine Etkileri	46
3.6.3. Yaşlı Sıçan Kardiyomiyositlerinde Voltaj-kapılı Na ⁺ -kanalları ve MitoTEMPO Uygulamasının Etkileri	49
3.6.4. Yaşlı Sıçan Kardiyomiyositlerinde Voltaj-kapılı K ⁺ -kanalları ve MitoTEMPO Uygulamasının Etkileri	50
3.6.5. Voltaj-kapılı L-tipi Ca ⁺² -kanalları ve MitoTEMPO Uygulamasının Etkileri	52
3.6.6. Yaşlanmanın Hücre içi Na ⁺ -Homeostazından Sorumlu Parametreler Üzerine Etkileri	53
3.6.7. Yaşlı Sıçan Kardiyomiyositlerinde Hücre içi H ⁺ ve Na ⁺ Değişiminin İncelenmesi	54
3.6.8. Yaşlanmada Hücresel Düzeydeki Enerjitik Süreçler ve ATP-duyarlı K ⁺ -Kanal Akımlarının (I _{KATP}) İncelenmesi	55
3.6.9. Yaşlı Sıçan Kardiyomiyositlerinde Hücre içi Global Ca ⁺² Değişimleri (Tranzient) ve MitoTEMPO Uygulamasının Etkilerinin İncelenmesi	56
3.7. Yaşlı Sıçan Kardiyomiyositlerinde Ölçülen Reaktif Oksijen ve Nitrojen Türevleri ile İlgili Bulgular	58
3.8. Yaşlı Sıçan Kardiyomiyositlerinde Mitokondri Membran Potansiyelinin İncelenmesi	60
3.9. Yaşlı Sıçan Kardiyomiyositlerinde Mitokondrial Oksidasyonun İncelenmesi	61
3.10. Yaşlı Sıçan Kardiyomiyositlerinde Hücre içi Zn ⁺² Değişimi ile İlgili Bulgular	62
3.11. Sıçan Ventrikül Hücre Hattı H9C2'lerde Yaşlanma Modelinin Oluşturulması ve Organel Seviyesinde [Zn ⁺²] Değişimleri	63
3.12. Yaşlı Sıçan Kardiyomiyositlerinde Mitokondri İnce Yapısı ve Mitokondri Fonksiyonu ile İlişkili Biyokimyasal Parametreler	65
3.13. Yaşlı Sıçan Kardiyomiyositlerinde Zn ⁺² - taşıyıcılarının Protein Ekspresyon Seviyeleri	66
3.14. Yaşlanmaya Bağlı Olarak Kardiyomiyositlerde Zn ⁺² -taşıyıcılarının Organel Düzeyinde Dağılımı	69
4. TARTIŞMA	73
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	83
ÖZET	85
SUMMARY	86
KAYNAKLAR	87
EKLER	95
ÖZGEÇMİŞ	97

ÖNSÖZ

Güncel çalışmalar, kalp yaşlanmasında mitokondri fonksiyon bozukluğunun rolünün etkili olduğunu göstermekte ve yaşlanmakta olan toplumlarda mitokondrinin yeni tedavi hedefleri arasında çok önemli bir organel olduğu, bu hususta yapılan çalışmaların yaşlanan kalp ile ilgili patolojilerin çözümünde önemli gelişmelere zemin teşkil edebileceği vurgulanmaktadır. Çeşitli organ fonksiyonlarında Zn^{+2} 'nin etkilerinin artan oksidatif stres ile ilişkili olduğu, özel olarak kalpte hücre içi serbest Zn^{+2} seviyesindeki artışın, hücre içi serbest Ca^{+2} seviyesine ve hücrenin redoks durumundaki değişikliklere aracılık ederek, kardiyomiyositlerde uyarılma-kasılma çiftlenimini bozduğu gösterilmiştir. Bu nedenle çalışmamızda Zn^{+2} -taşıyıcıları ve mitokondri ilişkisinin yaşlanmaya bağlı kalp fonksiyon bozukluğundaki rolünün incelenmesi hedeflenmiştir.

Bu tez çalışmamda danışmanlığımı üstlenen, tez çalışmamın gerçekleşmesi için her türlü olanağı sağlayan, bilgisi ve tecrübesiyle beni akademik hayata hazırlayan değerli hocam sayın Prof. Dr. Belma TURAN' a teşekkür ederim.

Tez izleme komite üyelerim, sayın Prof. Dr. Hakan GÜRDAL ve sayın Doç. Dr. H. Burak KANDİLCİ'ye de değerli katkılarından dolayı teşekkür ederim. Eğitim sürecinde önemli katkılar sunan sayın Prof. Dr. Can AKÇALI'ya, sayın Prof. Dr. Mehmet UĞUR'a ve Doç. Dr. Erkan TUNCAY'a da teşekkür ederim. Doktora çalışmalarım sırasında emekleri ve mesailerini ile her zaman yanımda olan Biyofizik Anabilim Dalı Araştırma Görevlilerine ve idari personeline ve bu zamana kadar eğitim hayatımda bana emek veren bütün hocalarıma ayrıca teşekkür ederim.

Bu süreçte her zaman yanımda olan, desteğini her an hissettiren sevgili eşim Betül ÜNVER OLGAR'a teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AP	Aksiyon potansiyeli
APS	Aksiyon potansiyeli süresi
$[Ca^{+2}]_i$	Hücre içi serbest Ca^{+2} konsantrasyonu
OGTT	Oral glukoz tolerans testi
SR	Sarkoplazmik retikulum
TAD	Total antioksidan düzeyi
TOS	Total oksidan düzeyi
KVH	Kardiyovasküler hastalık
RyR	Riyanodin reseptörü
SERCA	Sarko-endoplazmik retikulum Ca^{+2} ATPaz
SGLT _i	Sodyum glukoz ko-transporter inhibitörü
WHO	World health organization
$[Zn]_i$	Hücre içi serbest çinko
$[Zn]_{Mit}$	Mitokondri içi serbest çinko
$[Zn]_{SER}$	Sarkoplazmik retikulum içi serbest çinko

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	Kalp aksiyon potansiyelinin evreleri ve iyonik akımlar (Spinale ve ark., 1999).	2
Şekil 1.2.	Ventrikül hücrelerinde hücre içi Ca^{+2} homeostazı.	4
Şekil 1.3.	Kalp dokusunda yaşa-bağlı değişimler.	6
Şekil 1.4.	Yaşlanmada gözlenen mitokondriyal değişimler (Tocchi ve ark., 2015).	9
Şekil 1.5.	Kardiyak fizyolojide çinko düzeylerinin etkisi (Turan ve Tuncay 2017).	11
Şekil 1.6.	HücreSEL düzeyde Zn^{+2} taşınımından sorumlu proteinler.	12
Şekil 1.7.	H9c2 hücre hattında oluşturulmuş hiperglisemi ve kalp yetmezliği modellerinde lokalizasyonları belirlenen Zn^{+2} - taşıyıcıları ve ölçülen Zn^{+2} - miktarı verilmiştir.	14
Şekil 2.1.	Kardiyomiyosit izolasyonunun temel aşamaları.	22
Şekil 2.2.	Endoplazmik retikulum ve mitokondri serbest Zn^{+2} miktarlarının ölçümünde kullanılan Zn^{+2} duyarlı enhanced (eCALWY) FRET sensörleri. (Chabosseau ve ark., 2014).	28
Şekil 3.1.	Deney hayvanları ile ilgili sistemik parametrelerin değerlendirilmesi.	36
Şekil 3.2.	Deney hayvanlarına ait elektrokardiyogram (EKG) kayıtlarının değerlendirilmesi.	38
Şekil 3.3.	Yaşlanmada kalbin hemodinamik parametrelerinin değerlendirilmesi.	39
Şekil 3.4.	Yaşlı ve erişkin hayvanlara ait serumlarda incelenen toplam oksidan düzeyi (TOD) ve toplam antioksidan düzeyinin incelenmesi (TAD). Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. *P<0,05 yetişkin gruba göre.	40
Şekil 3.5.	Yaşlanmada değişen kalp-damar aktivitesine MitoTEMPO'nun etkileri.	42
Şekil 3.6.	Aort ve kalp kası ince yapısının ışık mikroskobu yöntemleriyle incelenmesi.	43
Şekil 3.7.	Aort ve kalp kası ince yapısının elektron mikroskobu yöntemleriyle incelenmesi.	44
Şekil 3.8.	Yaşlı hücrelerde oksidasyon seviyesinin incelenmesi.	45
Şekil 3.9.	Taze izole edilmiş hücrelerden elde edilmiş AP parametrelerinin değerlendirilmesi	48
Şekil 3.10.	Voltaj-kapılı Na^{+} -kanal akımlarının değerlendirilmesi	49

Şekil 3.11.	Voltaj-kapılı K ⁺ -kanal akımlarının değerlendirilmesi	51
Şekil.3.12.	Voltaj-kapılı L-tip Ca ⁺² -kanal akımlarının değerlendirilmesi.	52
Şekil.3.13.	Yaşlanma sürecinde Na ⁺ /K ⁺ -ATPaz aktivitesinin incelenmesi.	53
Şekil 3.14.	Yaşlanmada [pH] _i ve [Na ⁺] _i düzeyinin incelenmesi.	54
Şekil 3.15.	Yetişkin ve yaşlı sıçan kalbinden izole edilmiş hücrelerde I _{KATP} kanal akım yoğunluğunun değerlendirilmesi.	56
Şekil 3.16.	Yaşlı kardiyomiyositlerde hücre içi global [Ca ⁺²] _i değişimleri ve MitoTEMPO'nun olası etkilerinin değerlendirilmesi.	57
Şekil 3.17.	Hüresel düzeyde ROS ve RNS düzeyinin MitoTEMPO (MitoT) varlığında incelenmesi.	59
Şekil 3.18.	Yaşlı Sıçan kardiyomiyositlerinde mitokondri membran potansiyelinin değerlendirilmesi.	60
Şekil 3.19.	Yaşlı Sıçan kardiyomiyositlerinde mitokondriyal süperoksit düzeyinin incelenmesi.	61
Şeki 3.20.	Yaşlı sıçan kardiyomiyositlerinde [Zn ⁺²] _i miktarının incelenmesi.	62
Şekil 3.21.	Sıçan ventrikül hücrelerinden türetilen H9C2 hücre hattında yaşlanma modelinin doğrulanması ve organel düzeyinde Zn ⁺² miktarının incelenmesi.	64
Şekil 3.22.	Yaşlı sıçan kardiyomiyositlerinde mitokondriyal ince yapının incelenmesi.	65
Şekil 3.23.	Yaşlı Sıçan kardiyomiyositlerinde Zn ⁺² -taşıyıcılarının incelenmesi.	68
Şekil 3.24.	Yaşlı sıçan kalplerinde izole edilen ER ve mitokondri validasyonu. Sitoplazmik fraksiyon için GAPDH, SR fraksiyonu için SERCA ve mitokondriyal fraksiyon için COXIV kullanılmıştır.	69
Şekil 3.25.	İzole mitokondri preparatlarında Zn ⁺² -taşıyıcılarının incelenmesi.	70
Şekil 3.26.	İzole SR preparatlarında Zn ⁺² -taşıyıcılarının incelenmesi.	71

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. RT-PCR için kullanılan primerlerin ürün boyut ve dizileri.

33



GİRİŞ

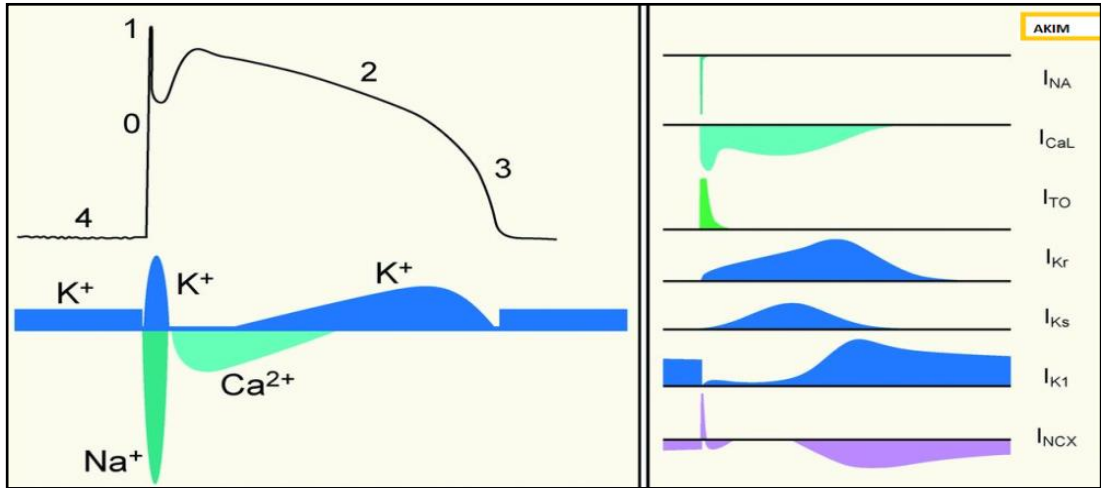
1.1. Kalbin Yapısı

Vücutun tüm doku ve organlarına kan pompalayan kalp, göğüs boşluğunda yer alan etrafı fibröz bir kılıf olan perikardiyum ile sarmalanmış, çizgili kas yapısında bir organdır. Morfolojik açıdan bakıldığında kalp yaklaşık 12 cm uzunluğunda ve 9 cm genişliğindedir. Miyokardiyum da denilen kalbin duvarları temel olarak kalp-kası hücrelerinden (kardiyomiyositler) oluşur. Kardiyomiyositler birbirine sıkıca bağlanmış tabakalar halinde düzenlenmiş olup, kanın bulunduğu odacıkları bütünüyle sarar. Bir odacığın duvarları kasıldığında sıkılmış bir yumruk gibi bir araya gelir ve çevreledikleri kana basınç uygularlar. Komşu hücreler interkale diskler denen yapılar aracılığı ile uç uca eklenirler. Bunların içinde kardiyomiyositleri bir arada tutan ve miyofibrillerin de bağlandığı desmozomlar vardır. Kalpte uyarı ileti sistemi sinoatriyal düğümden otoritmisiteyle başlar ve atriyoventriküler nod ile ventriküllere ve diğer yapılara iletilerek tüm kalbe yayılır. Uyarının iletimi gedik-kavşak (gap-junction) adı verilen hücreler arası bağlantılar yoluyla gerçekleşir. Böylece iletim çok hızlı olarak tüm kalp boyunca yayılır ve kalbin senkronize bir şekilde uyarılmasını sağlar (Loukas ve ark., 2016).

Kalp dinamik bir yapı olup, yaşam boyunca, dakikada ortalama 70 kez ritmik bir şekilde çalışarak insan yaşamını sürdürmektedir. Yaklaşık 3 milyar civarında kasılan hücrelerle bir sinsisyum şeklinde tek bir yapı gibi hatasız bir şekilde gerçekleşir. Kalpte uyarı bir noktadan başlayarak iletim sistemi aracılığı ile tüm kalbe yayılır. Uyarının iletimi gedik-kavşak (gap junction) denilen hücreler arası bağlantılar yoluyla gerçekleşir. Böylece iletim çok hızlı olarak tüm kalp boyunca yayılır ve kalbin senkronize bir şekilde uyarılmasını sağlar (Campbell ve ark., 2013; Jeong ve ark., 2012).

1.2. Aksiyon Potansiyeli ve Uyarılma Kasılma Çiftlenimi

Elektriksel uyarılabilir hücrelerde, eşik üstü elektriksel bir uyarın etkisinde hücre membranının çeşitli iyonlara olan göreceli geçirgenliği ile oluşan potansiyel değişim desenine aksiyon potansiyeli (AP) adı verilir. Membrandan iyonların geçişleri genellikle membran proteinleri adı verilen iyon kanalları aracılığıyla gerçekleşmektedir. İyon kanalları, Na^+ , K^+ , Cl^- ve Ca^{+2} gibi spesifik iyonların hızlı bir şekilde membran boyunca ilerlemesini sağlayan, membranın içi ile dışı arasında uzanan integral proteinlerdir (Roden ve George 1997). Bu kanallar saniyede yaklaşık 10^8 adet iyonun membran içi ile dışı arasında transferini sağlarlar. İyon kanallarının açılması ve kapanması voltaj-bağımlı, ligand-bağımlı ve/veya reseptör-ilişkili olabilir. Bir kanalın herhangi bir şekilde aktive olması, kanalın konformasyonunda değişime neden olacak ve kanalın açılmasını/kapanmasını sağlayacaktır. Diğer bir kanal tipi ise ligand-kapılı kanallardır (Nerbonne 2000). Bu kanallar hücre dışında nörotransmitterler veya hücre içinde Ca^{+2} veya bazı nükleotidler ile aktive olan kanallardır. Reseptör-ilişkili veya mekanik kapılı kanallar ise, gerginlik veya basınç gibi mekanik bir etkiye bağlı olarak konformasyonunu değiştiren kanallardır (Nerbonne ve Kass 2005).



Şekil 1.1. Kalp aksiyon potansiyelinin evreleri ve iyonik akımlar (Spinale ve ark., 1999).

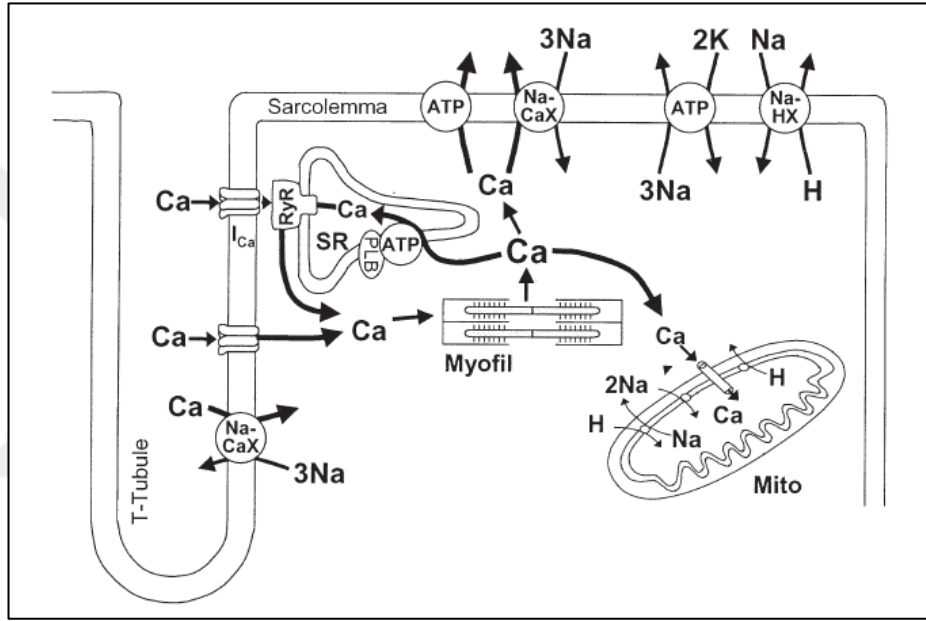
Kalpde kasılma AP ile başlar. Sarkolemmada gerçekleşen AP Na^+ , K^+ , Cl^- ve Ca^{+2} iyonlarına karışı geçirgen olan kanallarının harmonik bir düzende gerçekleştiği global potansiyel değişimdir (Fabiato ve Fabiato 1979). Şekil 1.1'de ventrikül hücrelerine ait AP'nin 5 fazı ve temel olarak her fazdan sorumlu olan iyonik akımlar görülmektedir.

Depolarizasyon ya da faz 0, AP'nin Na^+ akımlarına bağlı olan hızlı depolarizasyon evresidir. Bu akımın hızlı depolarizasyonla açılan aktivasyon ve kapanan inaktivasyon kapıları vardır. Eşik üstü bir depolarizasyonla voltaj-kapılı Na^+ kanalları açılmaya başladığında, elektrokimyasal gradyentten dolayı Na^+ hücre içine girmeye başlar. AP'nin çıkışını hemen takip eden geçici ve bağıl olarak küçük repolarizasyon evresi gerçekleşir. Büyük oranda depolarizasyonun sonlanmasına yakın, hızla ve geçici açılan K^+ kanalının geçici dışarı doğru akımına bağlıdır

Plato evresi zar potansiyelinin görece sabit olduğu süreci kapsar. Platonun nedeni içeri doğru giren Ca^{2+} iyonlarının oluşturduğu pozitif akımların dışarı doğru pozitif akımları dengelemesidir. Voltaj-kapılı L-tipi Ca^{+2} kanallarından içeri doğru Ca^{+2} girişine (I_{CaL}) karşılık, yavaş aktive olan K^+ (gecikmiş doğrultucu akım; I_{K}) kanallarından K^+ dışarı çıkar. Buna ek olarak, I_{to} da platonun erken evresine katkıda bulunmaktadır. Platoyu takip eden son repolarizasyon evresidir. İnaktivasyon nedeniyle I_{CaL} zamanla azalırken, yavaş aktive olan I_{K} artar ve baskın hale gelir. Bu akımın inaktivasyonu olmadığından uzun sürelidir.

Ventrikül hücrelerinde dördüncü faz dinlenme potansiyelidir. Zar K^+ iyonlarına yüksek geçirgenlik gösterdiğinden K^+ denge potansiyeline yakın bir değer almaktadır. Dinlenme potansiyeli büyük oranda içeri doğrultucu (I_{K1}) da denen bir tip K^+ kanal akımı tarafından belirlenmektedir. Na^+/K^+ pompa aktivitesi elektrojeniktir ve kimyasal gradyentin devamlılığını sağlayarak dinlenme durumuna katkı sağlar.

Kalpte uyarılma-kasılma çiftlenimi elektriksel uyarılmadan kardiyomiyositin kasılmasına kadar geçen olayları sürecini kapsamaktadır. Hücreler arası bağlantılar (gap junctions) sayesinde kasılma senkronize bir şekilde gerçekleşmektedir. Kalbin kasılması işlemi sinoatriyal hücrelerde başlar. Daha sonra tüm kalp hücrelerine yayılan AP kalbin kasılmasını sağlayan süreçler dizisi tetiklenmiş olur (Şekil 1.2). AP geçici depolarizasyon durumu olup intraselüler Ca^{+2} artışına neden olur. İntraselüler Ca^{+2} artışıyla birlikte Ca^{+2} troponin C'ye bağlanarak kasılma işlemi gerçekleşir.



Şekil 1.2. Ventrikül hücrelerinde hücre içi Ca^{+2} homeostazı.

NCX, Na^+/Ca^{+2} değiştokuşu; ATP, ATPaz; PLB, fosfolamban; SR, sarkoplazmik retikulum RyR, riyanodin reseptörü.

Kardiyak AP sırasında Ca^{+2} depolarizasyonla aktive olan L-tipi Ca^{+2} kanalları (LTKK) aracılığıyla hücre içine girmektedir. Ca^{+2} iyonunun hücre içine girişiyle birlikte sarkoplazmik retikulumdan (SR) riyanodin reseptörleri (RyR) aracılığıyla Ca^{+2} salınımı gerçekleşmektedir. Bu olay ilk olarak Fabiato ve arkadaşları tarafından gösterilmiş ve bu olaya Ca^{+2} indüklü Ca^{+2} salınımı denilmektedir (Fabiato ve Fabiato 1979). Ca^{+2} indüklü Ca^{+2} salınımı uyarılma-kasılma çiftlenimini düzenleyen temel mekanizmadır. Gevşeme durumunda ise Ca^{+2} geri alınımında 4 mekanizma rol oynar. (1) sarko-endoplazmik retikulum Ca^{+2} ATPaz(SERCA), (2) NCX, (3)

sarkolemmal Ca^{+2} ATPaz ve (4) mitokondriyal Ca^{+2} uniporter. Sarkolemmal Ca^{+2} ATPaz ve mitokondriyal Ca^{+2} uniporter'ların Ca^{+2} geri alınımındaki rolleri göreceli olarak azdır (Bers 2002).

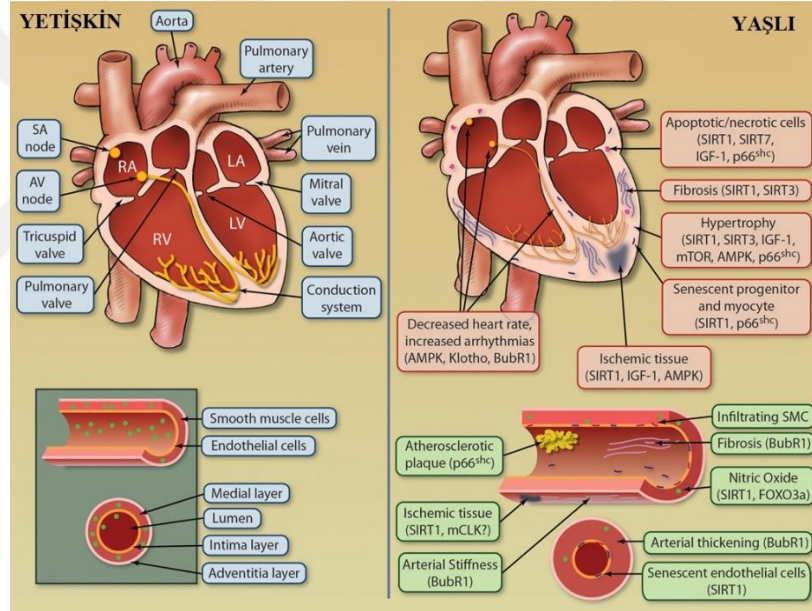
1.3. Yaşlanma ve Epidemiyolojisi

Yaşlanma organizmanın molekül, hücre, doku, organ ve sistemler düzeyinde, zamanla ortaya çıkan ve fonksiyonel değişikliklerle karakterize edilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre genel anlamda yaşlanma, çevresel faktörlere adaptasyon yetisinin zamanla giderek azalmasıdır. Yaşlanma, en geniş tanımıyla hücrelerden organlara kadar tüm yapılarda fonksiyonların giderek değiştiği/azaldığı yetersizlik ile karakterize etiyolojisi oldukça karmaşık, doğumla başlayıp yaşam süresince devam eden doğal bir süreçtir.

Dünyada sanayileşmenin hızlanmasına bağlı olarak yaşam standartlarının iyileşmesi, klinikte hastalık tanı ve tedavi süreçlerinin gelişmesiyle birlikte insan ömrünün uzadığı ve yaşlı nüfusun katlamalı bir şekilde arttığı görülmektedir. Dünya nüfusunun %10'u 65 yaş üstü yaşlı popülasyonu oluşturmakta, 2050 yılında bu oranın %17'ye yükseleceği öngörülmekte, ve toplamda yaşlı kişi sayısının 1,6 milyara ulaşacağı öngörülmektedir (Pawelec ve ark., 2014). Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verileri bize Türkiye'de 65 yaş üstü nüfusun 2016 yılında 6 milyon 651 bin 503 kişi olduğunu, bunların %43,9'unu erkek, %56,1'ini kadınların oluşturduğu, ve yaşlı nüfusun toplam nüfus içindeki oranının da beş yıl içinde %7,5'den %8,3'e yükseleceğini öngörmektedir. Nüfus projeksiyonlarına göre yaşlı nüfus oranımızın 2023 yılında %10,2'ye, 2050 yılında %20,8'e, 2075 yılında ise %27,7'ye yükseleceği tahmin edilmektedir. Bu veriler 21. yüzyılın özellikle ikinci yarısının tüm dünyadaki beklentilere paralel olarak Türkiye'de de "yaşlanan toplumların çağı" olacağını göstermektedir.

1.4. Kardiyovasküler Yaşlanma

Yaşlanma fizyolojik bir süreç olmasına karşın, kardiyovasküler hastalıklar için en önemli risk faktörlerinden birini teşkil etmekte olup yaşlılıkla beraber organlarda ve damar sisteminde meydana gelen ilerleyici yapısal ve fonksiyonel değişiklikler kardiyovasküler hastalık (KVH) gelişme riskini arttırmaktadır. The Framingham Heart Study and the Baltimore Longitudinal Study on Aging (BLSA) programındaki yaşlanma raporunda, yaşlanmanın sol ventrikül hipertrofisi prevalansını arttırdığı, diyastolik fonksiyon bozukluklarına yol açtığı, atriyal fibrillasyon insidansını arttırdığı bildirilmiştir (Ferrucci 2008; Lakatta ve Levy 2003).



Şekil 1.3. Kalp dokusunda yaşa-bağlı değişimler.

Yaşlanmaya bağlı olarak moleküler sinyal yollarında gelişen değişiklikler (North ve Sinclair 2012).

Önemli bir husus, bu sürecin hızının kişiden kişiye değişebilmesidir. Genetik faktörler yanında yaşam tarzı ve çevresel faktörler de bu hızı etkileyebilmektedir. Yaşlanmaya bağlı olarak genelde çeşitli organ fonksiyonlarında değişiklikler ve özelden ise bu organlardan kalpte gençlere göre Şekil 1.3’de özetlendiği gibi değişen faktörlere bağlı olarak fonksiyon kayıplarının gözlemlendiği bilinmektedir (North ve Sinclair 2012).

Çeşitli klinik ve deneysel çalışma sonuçları, yaşlanmada insülin direnci gelişiminin kaçınılmaz bir durum olduğunu, altında yatan birden fazla faktör bulunduğunu, vücut ağırlığına ve yağ miktarına bağlı olmaksızın da insülin direncinin gelişebildiğini, normal insülin bağlanma süreçlerine rağmen insülin direncinin gelişmesinde postreseptör bozuklukların varlığını işaret etmiştir (Escriva ve ark., 2007; Evans ve Goldfine 2013; Fink ve ark., 1983).

Kalp ve damar fizyolojisinde meydana gelen değişimler birbirini tetikleyen bir seri fizyopatolojik süreçleri beraberinde getirir. Örneğin arterlerde katılığın artması kalpte yeniden modellenme mekanizmalarını devreye sokarak fibroblast proliferasyonu ve sol ventrikül hipertrofisine yol açmaktadır. Sistem düzeyinde bu değişimler fibrotik doku artışı ve kalp çıktısının azalmasına yol açarak KVH gelişimine zemin oluşturmaktadır (Lakatta 2003; Lakatta ve Levy 2003). Özellikle hücre ölümleriyle beraber seyreden elektriksel iletim bozukluklarının atrial fibrilasyona neden olduğu rapor edilmiştir (Antelmi ve ark., 2004). Yaşlanma ile sayıları ve yapısı değişen kardiyomiyositlerin, rejenerasyon yeteneği azalır ve yerini kollajen üreten fibroblastlar alarak kalp dokusunda kollajen artışına neden olur. Bu değişiklikler, kalbin kontraktıl fonksiyonunda değişiklik oluşturmamakla birlikte, gevşeme (relaksasyon) zamanında uzama ile sonuçlanmaktadır. Böylece, kalbin diyastolik fonksiyonu (gevşemesi, kompliyansı) bozulmakta ve diyastolik disfonksiyon gelişmektedir.

Hücresele seviyede yaşa-bağlı olarak kardiyomiyosit sayısında azalma ve azalan hücre sayısının kompensasyonu olarak ise kardiyomiyositlerde büyüme (hipertrofi) gözlenmektedir (Olivetti ve ark., 1991). Ayrıca yaşlanmaya bağli olarak çeşitli sinyal mekanizmalarının bozulduğu, iyon kanallarının ve reseptörlerin fonksiyonlarının değiştiği ile ilgili çalışma sonuçları literatürde mevcuttur (Dai ve ark., 2014; Fares ve Howlett 2010; Xiao ve ark., 1994). Ayrıca artan hücre içi serbest Ca^{+2} konsantrasyonu mitokondri fonksiyonunu etkileyerek bozulmasına ve kardiyomiyosit ölümüne neden olmaktadır (Olivetti ve ark., 1991). Çalışmalarda, yaşlanmaya bağli olarak ATP duyarlı K^{+} -kanallarının (K_{ATP} -kanalları) değiştiği ve kardiyomiyositlerin elektriksel

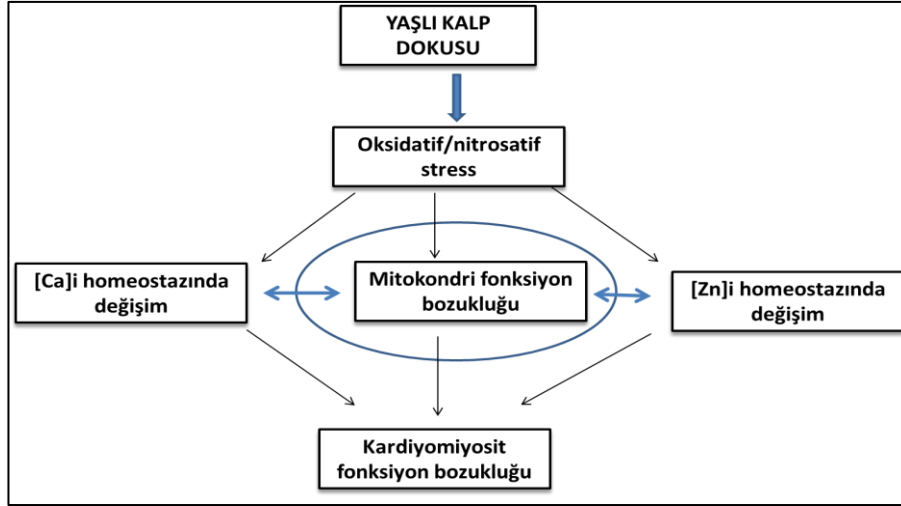
aktivitesini etkilediği gösterilmiştir (Jovanovic ve Jovanovic 2004; Ranki ve ark., 2002; Raveaud ve ark., 2009). Bilinenler toplam olarak ele alındığında, organel düzeyindeki çeşitli değişikliklerin yaşlanmaya bağlı kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde esansiyel rol oynadığını açıkça görülmektedir.

Yaşlanma ile birlikte artan kollajen ve azalan elastin içeriği nedeniyle damarlar ve özellikle aorta elastikiyetini kaybeder ve aortada sertleşme meydana gelir. Klinik olarak bu değişimlerin sistolik basıncın artmasıyla birlikte aterosklerozis, hipertansiyon ve arteriyal fibrilasyona neden olduğu ileri sürülmektedir. (Lakatta 2003). Yaşlanmaya bağlı olarak yapısal düzeyde lüminal genişleme, duvar kalınlaşması ve endotel fonksiyon bozuklukları başat rol oynamaktadır (Izzo ve Shykoff 2001; Lakatta 2003). Hücre düzeyinde ise endotelial nitrik oksit sentetaz aktivitesinin azalmasının NO üretiminin azalmasına yol açarak vazodilatasyon süreçlerini etkilediği ve özellikle bu değişimin endotel hücrelerindeki yaşlanma hızını arttırdığı rapor edilmiştir (Vasa ve ark., 2000).

1.5. Yaşlanmada Mitokondri Düzeyindeki Değişimler

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 sürülmektedir (Harman, 1991).

Yapılan çalışmalar, mitokondrilerin etkisinin yaşlanma mekanizmasında önemli bir yer tuttuğunu 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 (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Yaşlanmada gözlenen mitokondriyal değişimler (Tocchi ve ark., 2015).

Yaşlanmayla birlikte görülen mitokondriyal değişiklikler arasında mitokondri sayısında azalma, büyüklüğünde artış ve çeşitli yapısal anormallikler, mitokondri tarafından üretilen süperoksid radikali ve hidrojen peroksid (H_2O_2) miktarının zamanla artarak iç zara zarar vermesi ve yüksek seviyelerdeki bu moleküllerin diğer moleküllere bağlanarak oksidatif stresi artırması (Linnane ve ark., 1992; Schieber ve Chandel 2014), çevresel toksinlerin ya da üretilen serbest radikallerin neden olduğu mitokondriyal DNA'daki (mitDNA) mutasyonların yaşam boyunca birikimi (Arnheim ve Cortopassi 1992) ve mitokondriyal enzim sistemi döngüsündeki azalmaya bağlı olarak hücresel enerji üretiminde düşüş meydana gelmesi şeklinde ortaya çıkmaktadır (Tocchi ve ark., 2015).

Kalpte mitokondri en temel enerji üretim yeri olup dinamik bir özelliğe sahip olan bu organel ihtiyaca göre fizyolojik koşullarda enerji üretimini dengeleyebilmektedir. Herhangi bir stres durumunda veya başka patofizyolojik koşullarda mitokondride şişme ve kronik olarak depolarize durumda bulunma gibi olaylar gelişerek hücrelerde ölüme giden süreçte çok önemli rol oynamaktadır (Chan 2006; Hafner ve ark., 2010). Kardiyak yaşlanmada en önemli süreçlerden birisi mitokondriyal oksidatif strestir (Şekil 1.4.). Çünkü yaşa bağlı olarak mitokondride ROS üretimi artmaktadır. Artan ROS miktarı mitDNA ve oksidan duyarlı mitokondriyal proteinlerin yapılarını bozarak ROS miktarını arttırmaktadır (Nohl ve

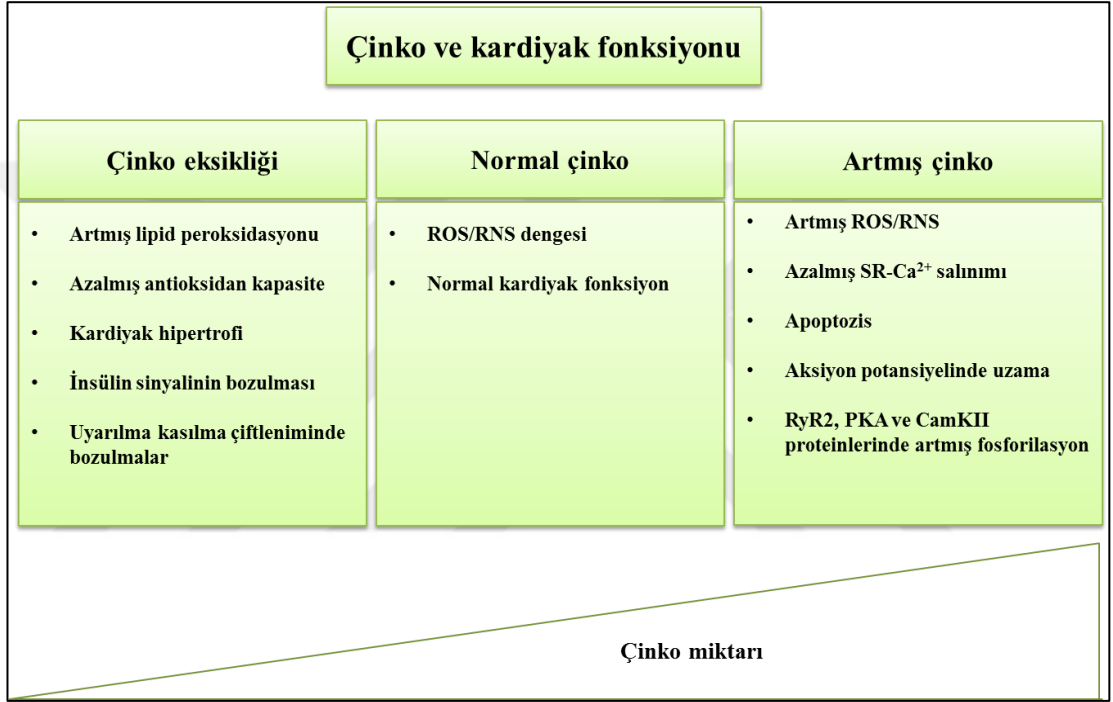
ark., 2005; Payne ve Chinnery 2015; Terzioglu ve Larsson 2007). Bu artış ATP üretimini de azaltarak sistemik etkilere yol açmaktadır (Terman ve Brunk 2004). Yapılan çalışmalar mitokondriyal ROS oluşumunun ve özellikle redoks süreçlerini kontrol eden süperoksit dismutaz, katalaz, glutaton peroksidaz gibi enzimlerdeki azalan fonksiyonların yaşlanma süreçlerini hızlandırdığını göstermektedir (Jouaville ve ark., 1999; Terzioglu ve Larsson 2007).

1.6. Biyolojik Sistemlerde Çinko

Çinko (Zn^{+2}) memeli hücrelerinde çeşitli mekanizmalarda ve hücre fonksiyonu gibi birçok noktada önemli rol oynayan artı iki değerlikli bir iyondur. Çinko günümüzde, özellikle prenatal ve postnatal gelişim ile ilgili özelliğinden dolayı esansiyel bir mineral olarak kabul görmektedir (Keen ve Hurley 1987). Literatürde Zn^{+2} eksikliğinin dünyada 2,2 milyar insanın sağlığını dolaylı veya doğrudan etkileyerek çeşitli hastalıkların gelişiminde etkili olduğu bildirilmiştir (Prasad ve ark., 1983). Çinko eksikliğinin çocuklarda gelişim bozukluğuna, cinsel olgunlaşmada gecikmeye, enfeksiyonlara ve diyareye bazı enzimlerde fonksiyonel kayıplara neden olduğu gösterilmiştir (Prasad 2013). İnsanlarda Zn^{+2} eksikliğinin gelişmesinde beslenmeyle yetersiz alınmasının, yetersiz emilmenin, atılımında artmanın veya sistem tarafından fazla kullanılmasının rol oynadığı gösterilmektedir (Roohani ve ark., 2013).

Biyokimyasal olarak önemli 300'den fazla enzimin reaktif merkezlerinde çinko atomu bulunur. Örneğin DNA stabilasyonu ve gen ifadesi gibi fonksiyonel mekanizmalarda başat role sahiptir (Brayer ve ark., 2008; Maret 2013). Bu gibi nedenlerle Zn^{+2} çeşitli biyokimyasal yollarda önemli rol oynamaktadır. Zn^{+2} sindirim sistemi, merkezi sinir sistemi ile immün, iskelet ve üreme sistemleri gibi çeşitli organ sistemlerini etkilemektedir. Değişen Zn^{+2} miktarı şekil 1.5'te gösterildiği gibi çeşitli yolları etkileyerek tüm sistemi etkileyebilmektedir (Frassinetti ve ark., 2006).

Çeşitli organ fonksiyonlarında bu iyonun etkilerinin artan oksidatif stres ile ilişkili olduğu, özel olarak kalpte hücre içi serbest Zn^{+2} seviyesindeki seviyesinin kalpte neden olduğu değişimler Şekil 1.5.'te özetlenmiştir (Turan ve Tuncay 2017). Artmış sitozolik çinkonun hücre içi Ca^{+2} seviyesine ve hücrenin redoks durumundaki değişikliklere aracılık ederek, örneğin kardiyomiyositlerde uyarılma-kasılma çiftlenimini bozduğu gösterilmiştir.

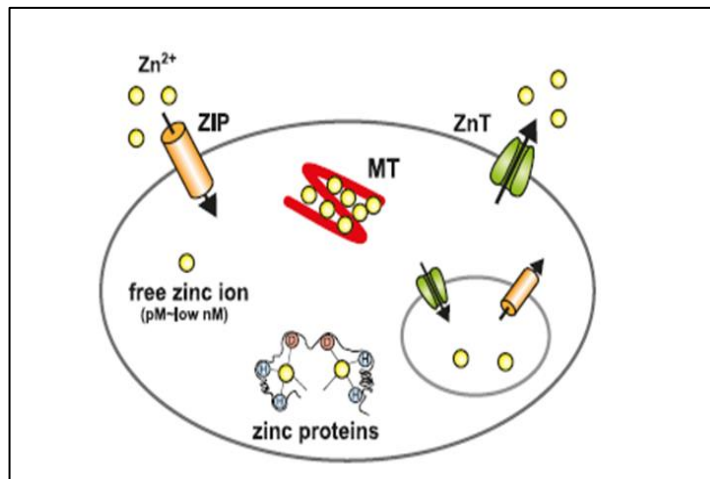


Şekil 1.5. Kardiyak fizyolojide çinko düzeylerinin etkisi (Turan ve Tuncay 2017).

Ayrıca, sistemik patolojilerde memelilerde kardiyomiyositlerde artan oksidatif strese duyarlı bir şekilde hücre içi serbest Zn^{+2} seviyesinin arttığı ve bu artışa paralel olarak kalbin mekanik ve elektrik aktivitesinin bozulduğu, hücre içi yüksek Zn^{+2} seviyesinin RyR, PKA ve CaMKII, ERK ve NF κ B'nin fosforile olmasına neden olduğu gösterilmiştir (Tuncay ve ark., 2011). Diğer yandan, kardiyomiyositlerde direk olarak hücre içi Zn^{+2} seviyesinin artırılmasının mitokondri membran potansiyelinde depolarizasyona, mitokondri ince yapısında bozulmalara neden olduğu, K_{ATP} akımlarının Zn^{+2} -konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı da gözlenmiştir (Billur ve ark., 2016; Degirmenci ve ark., 2018). Hücre

düzeyinde yapılan güncel çalışmalar kardiyomiyositlerde artan sitozolik Zn^{+2} 'nin aritmik davranışlarla seyreden AP süresinde belirgin uzamalara yol açtığı, ve K^+ -kanal akımlarını baskıladığını bildirmektedir (Degirmenci ve ark., 2018). Söz konusu değişikliklerin hücre içi artan Zn^{+2} seviyesinin oksidatif strese ve proteinlerdeki tiyol oksidasyonuna da yol açtığı rapor edilmiştir (Degirmenci ve ark., 2018). Diğer yandan, *in vitro* çalışmalarda, Zn^{+2} 'nin ATP ile stabil bir Zn-ATP kompleksi oluşturarak ATP biyoaktivitesini sınırlandırdığı/üretimini azalttığı, sitokrom C'nin mitokondri membranına bağlanmasını inhibe ederek fonksiyonunun bozulmasına neden olduğu, mitokondri membranındaki bazı iyon kanallarını inhibe ettiği (örneğin K^+ -kanalları gibi) ve böylece mitokondri fonksiyonunun bozulmasına ve reaktif oksijen ve nitrojen türleri (ROS/RNS) üretiminin artışına neden olduğu gösterilmiştir (Tuncay ve Turan 2016).

Zn^{+2} bütün organizmalar için esansiyel bir mikrobesein olup (Ackland vd., 2016), çok hücreli organizmalar için Zn^{+2} 'nin alınması, depolanması, dağılımı ve atılımı hem hücrel ve hem de organizma seviyelerinde, bu iyonun çoklu gereksinimini ve toksisitesini dengeleyebilmek amacıyla çok sıkı bir şekilde regüle edilmektedir (Hojyo ve Fukada 2016; Kimura ve Kambe 2016; Lichten ve Cousins 2009; MacDonald 2000; Wang ve ark., 2010).



Şekil 1.6. Hücresel düzeyde Zn^{+2} taşınımından sorumlu proteinler.

(ZIP; sitozole taşıyıcılar, ZnT; sitozolden taşıyıcılar, MT; Metalloproteinler (Kambe ve ark., 2015)

Biyolojik sistemlerde hem tüm sistem hem de hücre düzeyinde Zn^{+2} seviyesi metalloiyonlar yanında, Zn^{+2} -hücre içine taşıyıcılar (ZIP, 14 adet) ve Zn^{+2} -hücre dışına taşıyıcılar (ZnT, 8 adet) tarafından regüle edilmektedir (Şekil 1.6).

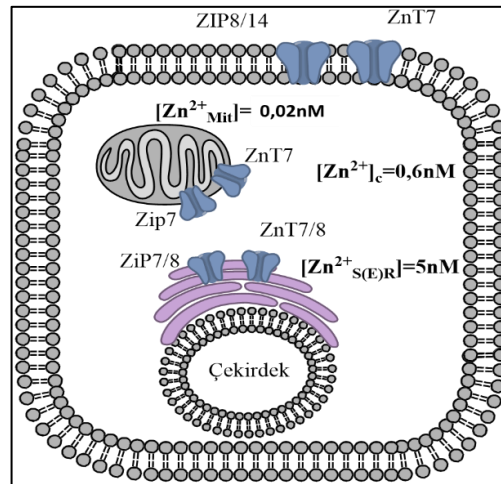
Mitokondri fonksiyonu ve Zn^{+2} arasındaki ilişki çeşitli deneysel protokoller kullanılarak (daha çok nöronlar, hepatositler ve kanser hücreleri) çalışmalar yapılmış olmasına karşın, kardiyomiyositlerle ilgili incelemeler çok sınırlıdır.

Kardiyomiyositlerde serbest Zn^{+2} 'nin nasıl ve nerede depolandığı (hangi depolar olduğu) ve hangi Zn^{+2} -taşıyıcılarının Zn^{+2} 'nin depolara giriş-çıkışında rol oynadığı henüz bilinmemekte olup literatürde çeşitli hipotetik öneriler mevcuttur (Kambe ve ark., 2015). Yapılan güncel çalışmalar kardiyomiyositlerde serbest Zn^{+2} 'nin kaynağının SER ve Mit olabileceği de gösterilmiştir (Nishikawa ve ark., 2012; Olgar ve ark., 2018; Tuncay ve ark., 2011; Tuncay ve ark., 2018; Tuncay ve ark., 2017; Tuncay ve ark., 2017; Tuncay ve ark., 2013). Kardiyomiyositlerde FRET tekniği kullanılarak yaptığımız çalışmalarda, sitozolik (~1 nM), sarko (endo) plazmik retikulum (SER; 5 nM) ve mitokondri (MitC; 100 pM) serbest Zn^{+2} seviyeleri ölçülmüş olup, sitozolle karşılaştırıldığında bu değerlerin SER'da yüksek ve MitC'de düşük olduğu gösterilmiştir (Olgar ve ark., 2018; Tuncay ve ark., 2018; Tuncay ve ark., 2017).

1.7. Çalışmanın Amacı

Yüzyılımızda toplumlar giderek yaşlanmaktadır ve yaşlanma süreçleri kardiyovasküler sistemler ve işlevler üzerinde önemli değişiklikler yapmaktadır. Kardiyomiyositlerde ($[Ca^{+2}]_i$ ve $[Zn^{+2}]_i$) düzenlenmesinde benzer sinyal süreçlerinin etkili olduğu ve uyarılma-kasılma dinamiklerinde sinerjik rol aldıkları, bu kapsamda bu hücrelerde $[Zn^{+2}]_i$ seviyesi nanomolar değerlerde iken farklı patofizyolojik koşullarda $[Zn^{+2}]_i$ seviyesinin oksidatif stres altında 30-kat ve diyabetik hastalıktan muzdarip kişilerde ise yaklaşık 2 kat artarak uyarılma-kasılma çiftlenimini ciddi düzeyde etkilediği gösterilmiştir (Ayaz ve Turan 2006; Tuncay ve ark., 2011; Tuncay ve ark., 2013; Turan ve ark., 1997).

İyonik çinko (Zn^{+2}), memeli hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak hem antioksidan hem de prooksidan etkiler göstermektedir (Adolfsson ve ark., 2015). Özellikle kritik konsantrasyonlardaki etkisi genellikle ROS/RNS üretiminde artmaya veya tersine hücrelerde ROS/RNS artışı $[Zn^{+2}]_i$ artışına neden olabilmektedir (Billur ve ark., 2016; Tuncay ve ark., 2016; Tuncay ve Turan 2016). Bu süreçler kalbin elektrik ve mekanik aktivitesini bozarak kalp yetersizliği benzeri bir sürecin gelişimine, hücrelerde hipertrofiye ve mitokondri membran potansiyelinin bozulmasına ve fusion/fission oranında gözlenen bozulmalarla ilişkili mitokondride yapısal değişimlere neden olmaktadır (Billur ve ark., 2016). Burada önemli olan bir husus bu değişimlerin çoğunluğunun yaşlanmaya bağlı kalp yetersizliğinde de gözlenmesidir (Campbell ve ark., 2013; Hoppel ve ark., 2009; Huynh ve ark., 2012; Kansal ve ark., 2015). Kardiyomiyositlerde moleküler yöntemler ko-lokalizasyon teknikleri ile yapılan ve Şekil.1.7’de özetlenmiş güncel çalışmalarımız sitozolik (~ 1 nM), SER (SER; ~ 5 nM) ve mitokondri (MitC; ~ 20 pM) serbest Zn^{+2} ($[Zn^{+2}]_{ser}$ ve $[Zn^{+2}]_{mit}$) seviyelerinin hiperglisemik ve kalp yetmezliği modellerinde değiştiğini, bu değişimden sorumlu proteinlerin ZIP7/8 ve ZnT7/8 olduklarını SER ve mitokondride de lokalize olduklarını göstermiştir (Degirmenci ve ark., 2018; Olgar ve ark., 2018; Tuncay ve ark., 2018).



Şekil 1.7. H9c2 hücre hattında oluşturulmuş hiperglisemi ve kalp yetmezliği modellerinde lokalizasyonları belirlenen Zn^{+2} -taşıyıcıları ve ölçülen Zn^{+2} - miktarı verilmiştir.

Mit: mitokondri, S(E)R: sarkoendoplazmik retikulum (Olgar ve ark., 2018; Tuncay ve ark., 2017; Turan ve Tuncay 2017).

Bu veriler göz önüne alındığında çalışmamızda, yaşlı sıçan kalbinde gözlenen fonksiyon bozukluklarında/yetersizliğinde; i) Zn^{+2} -taşıyıcılarının mitokondri fonksiyonu ile ilişkisi, ii) Mitokondri ATP, ROS ve Zn^{+2} miktarı ile iii) mitokondri hedefli antioksidan uygulamasıyla (MitoTEMPO ile) yaşlanma ve yetersiz kalp fonksiyonu ilişkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir. Çalışma sonuçlarımız, yaşlanan kalpte fonksiyon bozukluğunun altında yatan nedenlerden özellikle değişen hücresel [Zn^{+2}] ve mitokondri fonksiyonu ile olan ilişkisinin aydınlatılabilmesinde önemli rol oynayabileceğini göstermektedir.



2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Deney hayvanları ve sistemik parametrelerinin Gözlenmesi

2.1.1. Sıçanlarda İnsülin Direncinin Gözlenmesi

Bu çalışmada Wistar türü erkek sıçanlar kullanılmış ve hayvanlar Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarından temin edilmiştir. Sıçanlar 2 grup olarak planlanmış olup, yaşlı grup 24 aylık ve yetişkin grup 6 aylık olarak seçilmiştir. Deney hayvanları, her kafeste 2-3 sıçan olmak üzere su ve yem kısıtlaması olmaksızın, standart deney hayvanları barınma koşullarında Anabilim Dalımızda bulunan deney hayvanları barınma ve bakım ünitesinde deney anına kadar muhafaza edilmişlerdir.

Tüm deney hayvanlarında deney öncesi, vücut ağırlığı ve açlık kan şekeri (Accu-Chek glukoz ölçüm cihazı ile) yanında, insülin direncinin gelişip gelişmediğinin kontrolü için serum insülin değerleri (SPI-bio marka kit, A05105), oral glukoz tolerans testi (OGTT; gavaj yoluyla 1g/kg glukoz yüklemesi ardından 15., 30., 60. ve 120. dakikada kan glukoz seviyesi ölçümü yoluyla) ve klinikte kullanılan “homeostasis model assesment; HOMA” ölçümleri daha önceki çalışmalarımızda belirtildiği şekilde Anabilim Dalımızda gerçekleştirilmiştir (Durak ve ark., 2017). Deneylerimize sadece insülin direnci gelişmiş yaşlı sıçanlar dahil edilmiştir.

2.1.2. Sıçanlarda Periferik Kan Basıncının Kuyruktan Ölçülmesi

Deney hayvanlarında in situ olarak hemodinamik parametrelerden periferik kan basıncı kuyruktan hafif anestezi altında ‘tail cuff’ yöntemi ile ölçülmüştür (BIOPAC). Sakinleşen ve basınç değerleri sabitlenen sıçanların basınç değerleri

kayıt edilerek daha sonra kayıtlar üzerinden sistolik ve diyastolik basınç değerleri hesaplanmıştır. Bu kayıtlardan kalp atım hızı değişimleri de hesaplanmıştır.

2.1.3. Sistemik ve Hücre Düzeyinde Oksidatif Parametrelerin Ölçülmesi

Deney hayvanlarında toplam oksidan stres durumu, TOD ile toplam antioksidan durumu, TAD değerleri hayvanların serumlarında daha önceki çalışmalarımızda olduğu gibi (Okatan ve ark., 2015) Rel Assay Diagnostic firması tarafından üretilen RL0017 kod numaralı ve RL0024 kod numaralı kolorimetrik kitler kullanılmıştır. Kitlerin çalışma prensipleri takip edilerek, TAD ölçümleri için içerisindeki antioksidan (vitamin E analogu Trolox) deney ortamına eklediğimiz mavi-yeşil renkli ABTS⁺ radikalini renksiz formdaki ABTS molekülüne indirgemesi gözlenerek 660 nm dalga boyundaki absorbans değeri ölçülerek yapılmıştır. TOD ölçümleri ise serum örnekleri içerisindeki oksidanlar (hidrojen peroksit), deney ortamına eklediğimiz ferröz iyon çelatör kompleksini ferrik iyon haline okside etmesine dayalı olarak oluşan ferrik iyonların (renk yoğunluğu örnekteki oksidan molekülleri ile doğru orantılı) absorbans değerleri ile ölçülmüştür.

TOD ve TAD ölçümleri izole edilmiş ve dondurulmuş örneklerde benzer yol izlenerek de ölçülmüştür.

2.1.4. Sıçanlarda Elektrokardiyogram (EKG) Ölçülmesi

Sıçanlar hafif anestezi altında 2 aktif ve 1 referans elektrotlar kullanılarak (BIOPAC) toprak izolasyonu yapılmış kafese yerleştirilerek EKG kayıtları online olarak gerçekleştirilmiştir. Bu kayıtlardan ortalama arter basıncı ile yaşlı sıçanlarda oluşan aritmiler Lambeth kurallarına göre tesbit edilmiştir. Elde edilen EKG kayıtlarından, QRS kompleksinin tepe değeri, P-R, R-R ve Q-T intervalleri hesaplanmıştır.

2.1.5. Sıçanlarda in situ Olarak Basınç-Hacim İşinin Ölçülmesi

Sıçanlar hafif anestezi altında (ketamin, 10 mg/kg, i.p.) bir prob aracılığıyla vücut sıcaklığının korunarak, sağ karotid arteri belirlenip ve küçük bir kesi bölgesinden kalbin basınç-hacim işi bir kateter aracılığı ile damar içine yerleştirilmiştir. Karotid basıncının ölçülmesini takiben, kateter sol ventrikül içine yerleştirilmiş ve 10 dakika boyunca sıçanların sakinleşmeleri sağlanmış ve sonrasında basınç-hacim (P-V) döngüleri bilgisayar ortamında kaydedilmiştir. Bu P-V döngü kayıtlarında sıçanların hemodinamik parametreler (örneğin; sistol sonu basınç: ESP, diyastol sonu basınç: EDP, kalp çıktısı: Kalp çıktısı gibi) hesaplanmıştır.

2.2. İzole Organ İncelemeleri

2.2.1. Sol Ventrikül İçi Basınç Değişimlerinin Ölçülmesi

Sıçanlara heparinli pentol sodyum (30 mg/kg) ile anestezi uygulanarak, kalpleri izole edilmiş ve gazlandırılmış (%95 O₂ ve %5 CO₂ ile) Krebs-Hensleit çözeltilisi (mM olarak: NaCl 119; KCl 4,8; CaCl₂ 1,8; MgSO₄ 1,2; KH₂PO₄ 1,2; NaHCO₃ 20; glukoz 10 ve pH=7,4) içinde yıkanarak, Langendorff perfüzyon sistemine yerleştirilmiştir (Durak ve ark., 2017). İzole kalplerden atriyumlar çıkarılmış ve atriyoventriküler nod ezilmiş ve böylece kalbin spontan aktivitesi durdurulmuştur. Langendorff-perfüzyon sistemindeki kalpler elektriksel olarak uyarılmış (frekans 300 atım/dk) ve kalbin kasılması, sol ventrikül içine yerleştirilen içi su dolu viskoelastik balon ile basınç değişimleri desenleri olarak ölçülmüştür. Aynı zamanda, bu kalplerde kalp atım hızı da kaydedilmiştir. Kalplerin sol ventrikül içi basınç değişimleri bir basınç çevireci ve bir A/D dönüştürücü yardımıyla (200 Hz örnekleme hızı ile) kaydedilmiştir. Burada, balon aracılı elektriksel uyarı altında oluşan basınç değişiklikleri, intraventriküler (sol ventrikül) izovolumetrik basınç değişimlerini (SVBD) vermektedir.

2.2.2. Aort Örneklerinde Kasılma ve Gevşeme Yanıtlarının Ölçülmesi

Damar yanıtlarını değerlendirmek için torasik aort (TA) içeriği: (mM): NaCl 118, KCl 4.7, CaCl₂ 2,5, KH₂PO₄ 1,2, NaHCO₃ 25, MgSO₄ 1,2, ve glukoz 10 olan soğuk Krebs-Henseleit solüsyonu içine alınmıştır. Doku çevresindeki fazla yağ ve bağ dokusu ekarte edilip, yaklaşık 1-2 mm.'lik TA halka preparatı hazırlandıktan sonra 5 ml'lik Krebs-Henseleit solüsyonu içeren organ banyosuna yerleştirilmiştir. İki tane paslanmaz çelikten kanca TA lümenine yerleştirilmiştir. Solüsyon 37°C de %95 O₂ - %5 CO₂ ile gazlandırılmıştır. Kasılmalar izometrik olarak kuvvet transdüseri yardımıyla ölçülüp bilgisayara aktarılmıştır (Biopac Versiyon: 3.7.0). Preparata deney başlangıcında 1 g bazal gerim uygulanarak 30 dakika dinlendirilmiştir. Kasılma yanıtları için fenilefrin (10⁻⁴—10⁻⁷, 6 konsantrasyon) gevşeme yanıtları içinse asetilkolin (10⁻⁴-10⁻⁷, 6 konsantrasyon) kümülatif olarak verilmiştir.

2.3. Aort ve Kalpte Histolojik İncelemeler

2.3.1. Işık Mikroskobu (IM) İncelemeleri

Deney gruplarından alınan TA ve sol ventrikül dokusu örnekleri fosfat tamponlu formalin (%10) solüsyonunda 272 saat süreyle fikse edildikten sonra akan su altında yıkanmış ve artan alkol serilerinden geçirilerek (%70, %80, %90 ve %100) dehidratasyon işlemleri tamamlanmıştır. Dokuların şeffaflandırılması için ksilene alınan doku örnekleri şeffaflandıktan sonra 60 °C'lik etüvde sıvı parafinle 3 saat inkübe edildi ve parafin bloklara gömüldü. Sliding mikrotom (Leica RM 2125RT) ile 5 µm kalınlığında alınan kesitler ışık mikroskobu incelemesi için Mallory Azan (MA) ile boyanarak incelenmiştir.

MA boyaması için; lam üzerine alınan 5 µm kalınlığında kesitler deparafinizasyon işleminden sonra dereceli alkollerden (%100, %96 ve %75) geçirilerek çeşme suyunda yıkanmıştır. Hidrasyon işlemi tamamlanan kesitler 60 °C

etüvde bir saat boyunca %0,1 Azokarmin G solüsyonu içinde bekletildi. %1 anilin alkol solüsyonu içinde farklandırma işlemi uygulanmıştır. %1 asetik alkolde durulama işlemi yapılmıştır. %5'lik fosfotungustik asitle mordanlama işlemi gerçekleştirildikten sonra kesitler suda yıkandı ve %0,25 anilin mavisi ile %1 Orange G solüsyonundan oluşan karışım ile 60 dakika boyunca boyandı. Boyama işleminden sonra çeşme suyunda yıkanan kesitler, dereceli (%75, %96 ve %100) etanol serisinden geçirilerek ksilen ile şeffaflandırdıktan sonra lamelle kapatıldı ve ışık mikroskobu ile incelemeye hazır hale getirildi. Boyanan preparatlar, ışık mikroskobuyla (model: Zeiss Axio Scope A1) incelendi.

2.3.2. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) İncelemeleri

Deney gruplarına ait TA ve sol ventrikül dokularından 1 mm³ hacmindeki parça gluteraldehit (%2,5'luk) içerisine alınarak TEM için tespit ve takip deneyleri gerçekleştirildi.

Birinci tespit (ön tespit) işlemi için 0,2 M fosfat tamponu içerisinde %2,5 gluteraldehit ve %2 paraformaldehit (pH=7,2-7,4) solüsyonunda +4°C' de 2-4 saat bekletildikten sonra birinci yıkama 0,1 M fosfat tamponunda (2x15 dakika, rotatorda) yapıldı. İkinci tespit için örnekler 0,1 M fosfat tamponunda %1 OsO₄ (rotatorda ve karanlıkta, 2 saat) bekletildikten sonra ikinci yıkama işlemi 0,1 M fosfat tamponunda (3x20 dakika) yapıldı. Sonrasında doku örnekleri distile su ile yıkandılar ve blok boyama işlemi için %70 etanolde %0,05 uranil asetat ve %1 fosfotungustik asit solüsyonunda rotatorda ve karanlıkta, 2 saat süre ile bekletildiler. Dehidratasyon için dereceli (%70, %96, %100) etanol, propilenoksit serilerinden geçirildiler. Sonrasında 1:1 oranında propilen/Araldite karışımı ile rotatorda 1 saat süre ile boyandılar. Ardından araldite alınıp 2 saat bekletildiler. Bloklama için blok kalıbı içerisine doku örnekleri yerleştirildi ve üzerine araldite eklendi. Polimerizasyon işlemi için hazırlanan bloklar 80 °C'de bir gece süre ile tutuldu, sonrasında etüv kapatıldı ve soğumaya bırakıldı.

2.3.3. Yarı İnce Kesit Boyama Protokolü

Ultramikrotom ile 700-1000 nm kalınlığında alınan kesitler kurutulduktan sonra distile su içinde Toluidin mavisi/Azur II boyası (%1 boraks, %1 Toluidin mavisi, %1 Azur II) ile boyandı (50 – 60 °C ısıtıcıda boya kuruyana kadar). Tekrar distile su ile yıkanan kesitler ısıtıcıda kurutuldu ve soğutuldu. Entelan ile kapatıldı. Boyanan preparatlar ışık mikroskopuyla (Zeiss Axio Scope A1) incelendi ve fotoğraflandı.

2.3.4. İnce Kesit Boyama Protokolü

Hazırlanan bloklardan ultramikrotom ile 70 – 90 nm kalınlığında kesitler alındı. 1-2 dakika distile su ile yıkandı. 45 dakika süresince %8'lik uranil asetatta bekletildi. Distile su ile 1-2 dakika yıkandıktan sonra 0,1 N NaOH içerisinde ikinci kez yıkandı. Sonrasında %0,7 kurşun sitrat-%0,9 sodyum sitrat solüsyonunda 20 dakika bekletildi ve önce 0,1 N NaOH içerisinde daha sonra distile su içinde 1-2 dakika yıkandı. İncelemeler LEO 906E marka TEM ile yapıldı. Görüntülemeler Sharpeye CCD ve Image SP (Germany) dijital görüntüleme sistemi programı ile gerçekleştirildi.

2.4. İzole Kardiyomiyositlerde İncelemeler

2.4.1. Sol Ventriküler Kardiyomiyositlerin İzolasyonu

Deney hayvanlarının kalpleri deney süresi sonrasında, bir önceki bölümde açıklandığı gibi hafif anestezi altında çıkarılıp, soğuk ve Ca^{+2} 'suz fizyolojik çözelti içine konularak Langendorff-perfüzyon sistemine kanüle edilmiştir. Aorttan koroner dolaşım aracılığıyla önce Ca^{+2} 'suz, HEPES solüsyonu (mM olarak: 130 NaCl; 5,4 KCl; 1,4 $MgCl_2$; 0,4 NaH_2PO_4 ; 5 HEPES; 10 Glukoz ve 20 Taurin, pH: 7,2 olan ve

%100 O₂ ile gazlandırılarak dengelenmiş) ile perfüze edilmiş (yaklaşık 5 dakika) ve bunu takiben kollajenaz (1,2 mg/mL; Worthington Collagenase CLS2) içeren çözelti ile perfüzyona 25-30 dakika devam edilmiştir (Turan ve ark., 1997).



Şekil 2.1. Kardiyomiyosit izolasyonunun temel aşamaları.

(soldan-sağa) Sıçanlardan anestezi altında (50 mg/kg Pental sodyum ile, i.p.) göğüs kafesi açılarak kalp alınmıştır. Kalp daha sonra Langerdoff sistemine bağlanarak kroner dolaşım perfüzyonu yöntemiyle perfüze edilmiştir. Enzimatik sindirim (kollajenaz) sonrası kollajenik doku ve yapılar parçalanarak kardiyomiyositler elde edilmiştir.

Perfüzyon sonrası, kalpler yine önce Ca⁺²'suz çözeltide parçalanmış ve ardından uygun filtreden geçirilerek tek hücreler elde edilmiştir (Şekil.2.1). Hücreler 37°C' de artan konsantrasyonlarda Ca⁺² içeren çözelti ile yıkanarak ölü hücrelerden arındırılmış ve normal Ca⁺² konstantrasyonu içeren çözelti içinde saklanmıştır.

2.4.2. İzole Kardiyomiyositlerde Aksiyon Potansiyeli Kaydedilmesi

Taze olarak sol ventrikülden izole edilen hücrelerde 'AP'ler patch-clamp sistemi (Axon 200B, Molecular Devices, USA) akım-kenetleme modunda kullanılarak HEPES-çözeltisi içinde (mM olarak): 137 NaCl; 4 KCl; 10 HEPES; 1 MgCl₂; 1,8 CaCl₂, pH=7,4) online olarak yapılmıştır. Kayıtlar uç direnci 1,5 - 2,5 MΩ olan cam elektrotlar (patch-elektrotu) kullanılarak 0,5 Hz'lik uyarı altında elde edilmiştir. Cam elektrot içi solusyon (mM olarak) 130 KCl; 3 MgATP; 0,4 Na₂GTP; 5 EGTA; 25 HEPES eklenmiş ve pH 7,4'e ayarlanmıştır. Hücre içine uygulanan elektriksel uyarı küçük depolarize edici elektrik-pulsları şeklindedir (5 nA'lık akım

4 ms süreli). Daha sonra excell-programı ve Clampfit programı yardımıyla AP desenlerinin zamansal ve uzaysal parametreleri hesaplanmıştır.

2.4.3. K⁺-kanal Akımlarının Ölçülmesi

İzole kardiyomiyositlerde membran akımları patch-clamp sisteminde, sistem voltaj-kenetleme modunda tüm-hücre konfigürasyonu kullanılarak kaydedilmiştir (Axon 200B, Molecular Devices, USA). Kardiyomiyositlerin, patch-elektrotlarına tam olarak yapışması ($G\Omega$ düzeyinde direnç) elde edildikten sonra, elektrik pulsu uygulanarak hücre zarı kırılmış ve voltaj-kenetlemesi ile -80 mV civarında tutularak, hücrelere 500 ms'lik pulslar 5 s'lik aralıklarla ardışık olacak şekilde (20 kez) uygulanmıştır. K⁺-kanal akımları, 3 kHz'lik filtreden geçirilmiş olup Digidata 1200 ile 5 kHz'lik örnekleme hızında (pClamp10 yazılımı: Axon Instrument, Foster City CA, USA) ile kaydedilmiştir. Akım kayıtları, 1,5 - 2,5 M Ω 'luk elektrotlar kullanılarak ve kenetleme sonrası giriş direncinin 6 M Ω ve altında olmasına özen gösterilerek gerçekleştirilmiştir. Bu akımlar için kullanılan çözeltiler daha önceki çalışmalarımızda kullanıldığı gibidir (Durak ve ark., 2017): kayıt banyo, mM olarak: 137 NaCl; 4 KCl; 1,8 CaCl₂; 1 MgCl₂; 10 Glukoz; 10 HEPES ve pH=7,4; cam elektrot içi, mM olarak: 130 KCl; 20 KCl; 3 MgATP; 0,4 NaGTP 25 K-HEPES 5 EGTA eklenmiş ve pH=7,2). Ca²⁺kanal akımlarını bloke etmek için 200 μ M CdCl₂ kullanılmıştır. Geçici dışarı doğru potasyum akımları (I_{to}), elde edilen maksimum tepe değerlerinden pulsun son kısmındaki akım değerleri (I_{ss}) çıkarılarak hesaplanmıştır. İçeri doğrultulu K⁺-Kanal akımları (I_{K1}) ise ms'lik pulsların kuyruk kısımlarının (300 ms) akım değerlerinden hesaplanmıştır.

Ölçülen akımların gruplar arası karşılaştırması yanında, hücreler arası farkları da ortadan kaldırmak için, ölçülen akımların tepe değerleri hücrelerin sığasına (hücre yüzey alanı ile orantılı) bölünerek akım yoğunluğu cinsinden verilmiştir.

2.4.4. Na⁺-kanal Akımlarının Ölçülmesi

Na⁺-kanal akımlarının ölçülmesi tüm hücre voltaj kenetleme konfigürasyonu kullanılarak yapılmıştır. Na⁺-kanal akımlar için kullanılan banyo solüsyonu (mM olarak): 77 NMDG; 40 NaCl; 20 CsCl; 1,8 CaCl₂; 1,8 MgCl₂; 10 Glukoz; 10 HEPES pH 7,4) şeklinde. Ca²⁺ akımlarını bloke etmek için 200 µM CdCl₂ kullanılmıştır. Pipet içi solüsyon ise (mM olarak): 120 CsCl₂; 5 MgATP; 0,4 NaGTP; 25 Cs-HEPES; 5 EGTA, pH 7,2 CsOH ile) olacak şekilde hazırlanmıştır. Uygulanan protokol; zar potansiyeli -80 mV düzeyinde tutulan hücrelere ön puls uygulanmış (150 ms -120 mV) -70 mV potansiyelden itibaren 5 mV'luk 150 ms'lik depolarize edici artışlarla akım voltaj karakteristiği incelenmiştir.

2.4.5. L-tipi Ca²⁺-Kanal Akımlarının Ölçülmesi

L-tipi Ca²⁺-kanal akımları (I_{CaL}) için kullanılan pipet ve banyo solüsyonları sırasıyla pipet solüsyonu (mM olarak): 110 Csaspartat; 120 CsCl; 5 MgATP; 120 L-aspartat; 10 NaCl; 10 HEPES; 0,4 GTP eklenmiş ve pH 7,2'ye ayarlanmıştır (Olgar ve ark., 2014). Akım kayıtları için. -70 mV düzeyinde kenetlenmiş hücrelere ön puls (-45 mV'luk) uygulanmış ve Na⁺ kanal akımları inhibe edilmiştir. Akım voltaj karakteristiğini belirlemek için -50 mV'tan 10 mV'luk artışlarla 14 farklı voltaj seviyesinde depolarize edici pulslar uygulanarak kayıtlar alınmıştır. Her potansiyel için elde edilen akım değeri ölçüm yapılan hücrenin büyüklüğüne oranlanarak tüm akım değerleri akım yoğunluğunun voltaja göre değişimi olarak verilmiştir.

2.4.6. ATP Duyarlı K⁺-kanal Akımlarının Ölçülmesi

Taze izole edilen hücreler içeriği (mM olarak): NaCl 137, KCl 4, HEPES 10, MgCl₂ 1, CaCl₂ 1.8, pH: 7,40) olan banyo solusyonunda bekletilmiştir. Pipet içi solusyon (mM olarak): KCl 130, MgATP 0,05, EGTA 5, HEPES 25 pH=7,2 CsOH

ile). K-ATP akımları voltaj-kenetleme konfigürasyonunda, -70 mV düzeyine kenetlenmiş hücrelere 200 ms'lik (+50 mV) test pulsı uygulanarak Na⁺ akımlarının inaktivasyonu sağlanmıştır. Daha sonra +50 mV potansiyelden -120 mV'luk potansiyele 5 saniye süren bir ramp test uygulanmıştır. K_{ATP} akımı ölçümü için, bir kanal açıcısı olan FCCP (1 µM) kullanılmış kanal inhibisyonu için hücrelere glibenklamid (40 µM) verilmiştir. FCCP yanıtının glibenklamid yanıtından çıkarılmasıyla I_{K-ATP} kanal akımı elde edilmiştir. Elde edilen akımlar hücre büyüklüğüne (pF cinsinden) bölünerek akım yoğunluğunun voltaja göre değişimi incelenmiştir.

2.4.7. Na⁺/K⁺-pompa Akımının Ölçülmesi

Na⁺/K⁺-pompa akımı (I_{Na/K}), önceki bölümlerde açıklanan patch-clamp sistemi kullanılarak ölçülmüştür. Benzer patch-elektrotları kullanılarak ve GΩ düzeyinde hücreye yapışma sağlandıktan sonra akım kayıtları gerçekleştirilmiştir. Bu akımların kayıtları tüm hücre voltaj kenetleme konfigürasyonunda 1,5 - 2,5 MΩ'luk cam-elektrotlar kullanılarak yapılmıştır. Hücreler öncelikle normal banyo çözeltisi (mM olarak): 140 NaCl; 4 KCl; 2 CaCl₂; 1 MgCl₂; 10 Glukoz; 10 HEPES; 5 NaOH ve pH=7,4) ile perfüze edilmiştir. Daha sonra Na⁺/K⁺ pompasını inhibe etmek amacıyla K⁺ içermeyen özel banyo çözeltisi kullanılmıştır (mM olarak): 0 K⁺; 136 NaCl; 2 BaCl₂; 1 MgCl₂; 10 Glukoz; 5 HEPES; 5 NiCl₂ ve 4 TrisCl). Hücreler bu banyo içinde 20 dakika kaldıktan sonra, 4 mM K⁺ içeren banyo çözeltisine geçilerek Na⁺/K⁺-pompa aktif edilmiştir (mM olarak: 4 K⁺; 136 NaCl; 2 BaCl₂; 1 MgCl₂; 10 Glukoz; 10 HEPES; 5 NiCl₂ ve 4 KCl ve pH=7,4). Böylece bu hücrelerde hem 0 K⁺ ve hem de 4 K⁺ öncesi ve sonrası oluşan akımların farkı kaydedilmiştir. Kullanılan patch-elektrot çözeltisi içeriği (mM olarak) 10 NaCl; 20 KCl; 100 K-Aspartat; 20 TEACl; 10 HEPES; 5 MgATP; 0,7 MgCl₂; 5 EGTA; ve 5 HEPES ve pH 7,4 olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu akımlar -30 mV sabit membran potansiyelinde ölçülmüştür ve akım değerleri ölçülen hücrelerin sığalarına oranlanarak sonuçlar akım yoğunluğu olarak ifade edilmiştir.

2.4.8. Hücre İçi Serbest Ca⁺² Değişimlerinin Ölçülmesi

Hücre içi iyon derişimlerinin ölçümleri için iyonlara spesifik floresans boyalar kullanılmıştır. Taze izole edilen hücreler Ca⁺² iyonuna duyarlı floresan boya olan fura-2 AM (4 µM) ile oda sıcaklığında 45 dakika inkübe edildikten sonra iki defa yıkanarak de-esterifikasyon işlemi sağlanmıştır. Fura-2 AM yüklenmiş hücreler içinden HEPES solüsyonu (mM olarak): 137 NaCl, 4 KCl, 0,5 MgCl₂, 1,8 CaCl₂, 10 Na-Hepes, 10 glukoz, pH: 7,4) geçen ve iki ucunda elektrot yerleştirilmiş kuvet içine alındı. Daha sonra AP'yi taklit etmek amacıyla 20-25 V genliğinde 0,2 Hz frekanslı pulslar oluşturularak Ca⁺² transientleri kaydedildi. Ca⁺² değişimini gösteren floresan ışımadaki değişim ise, hücreler 340 ve 380 nm'de eksite edilerek 510 nm'ye merkezlenmiş floresan oranların ölçülmesi ile hesaplandı. Elektriksel uyarıyla elde edilen kasılma traselerinden genlik, tepeye çıkış zamanı ve gevşeme sürelerinin değişimi değerlendirildi. Ayrıca 10 mM kafein uygulamasıyla SR'daki Ca⁺² seviyesi incelendi.

2.4.9. Hücre İçi Serbest Na⁺ Değişimlerinin Ölçülmesi

Hücre içi serbest Na⁺ [Na⁺]_i değişimini ölçmek için bir ratiometrik boya olan SBFI kullanıldı. İzole edilen hücreler 5 µM SBFI (Molecular Probes, Eugene, OR) ile 30 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ölçüm sırasında gozlenen [Na⁺]_i değişimine ait floresan sinyalleri PTI (photon technology international) RatioMaster mikrospektrofluorimetre ve FELIX programı kullanarak hesaplanmıştır. (Hammarstrom ve ark. 2002). Ayrıca hücrelerin dışında kalan bölgeden de (background: arka alan) gelen floresan sinyalleri kayıt edilmiştir. Deneyden sonra, ölçülen arka plandan gelen sinyaller hücreden ölçülen floresan sinyallerden çıkarılarak ((F340-F340_{arka alan})/(F380-F380_{arka alan})) gerçek [Na⁺]_i floresan şiddetleri hesaplanmıştır.

2.4.10. Hücre İçi Serbest H⁺ Değişimlerinin Ölçülmesi

Hücrelerde [pH]_i değişimi seminafarhodaflor (SNARF-1) boyasının asetometil esteri (AM) boyası kullanılarak yapıldı. Kardiyomiyositler 3 µM SNARF-1 ile 30 dk ile yüklendikten sonra He/Ne lazerle (543 nm) uyarılmıştır. SNARF-1 boyası 2 eksitasyon bölgesine sahiptir ve özellikle 690 nm yaptığı eksitasyon H⁺ iyonlarına duyarlıdır. Göreceli [pH]_i değerleri 2 eksitasyon şiddetlerinin oranı (580/690) hesaplanarak incelenmiştir.

2.4.11. İzole Kardiyomiyositlerde ROS ve RNS Ölçümleri

Kardiyomiyositlerde reaktif oksijen türleri (ROS) spesifik floresan boya (DCDFA; 10 µM) kullanılarak konfokal mikroskobunda görüntüledi. Reaktif oksijen türleri için eksitasyon ve emisyon dalga boyları: E_{ex}: 490 nm ve E_{em}: 530 nm kullanıldı. Hücrelerden bazal yanıt alındıktan sonra 100 µM H₂O₂ verilerek maksimum ROS oluşumu gözlenmesi sağlanıp miktar indirekt olarak hesaplanmıştır.

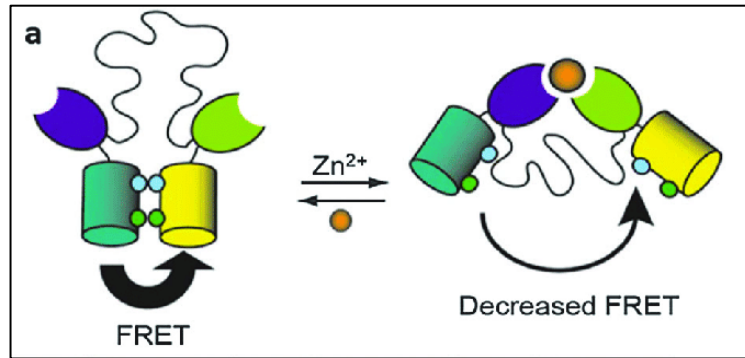
Hücrelerde reaktif nitrojen türlerinin seviyesini değerlendirmek için RNS türevlerine spesifik bir boya olan DAF-AM(3 µM) kullanılarak konfokal mikroskobunda görüntülenmesi sağlanmıştır. Hücreler 30 dakikalık DAF-AM yüklemesinden sonra bazal yanıt alınmıştır. Daha sonra özel bir NO donorü olan ZipNONO (100 µM) verilerek maksimum durum gözlenmiştir.

ROS ve RNS miktarları bazal ve donör verilerek kalibrasyon sağlanan değerler arasındaki artış miktarı kıyaslanarak ölçülmüştür.

2.4.12. Kardiyomiyositlerde Hücre içi Serbest Zn²⁺ Ölçümü

Hücre içi serbest Zn²⁺ miktarlarının belirlenmesi için hücreler, çinkoya afinitesi yüksek ($K_d=15\text{nM}$) bir boya olan ve 490 nm dalga boyunda uyarılıp, 520nm dalga boyunda emisyon veren FluoZin3-AM boyası ile ($3\ \mu\text{M}$) 30-40 dakika boyunca inkübe edildikten sonra de-esterifikasyon için 4-5 defa yıkanarak hücre içi serbest Zn²⁺ derşimi ($[\text{Zn}^{2+}]_i$) ölçümleri için hazır hale getirilmiştir. Hücrelerden 4 dakika boyunca bazal kayıt aldıktan sonra (F), sırasıyla bir Zn²⁺ iyonoforu olan 1-Hydroxypyridine-2-thione zinc salt (ZnPT; $10\ \mu\text{M}$) verilerek maksimum sinyal (F_{max}), en son olarak ise Zn²⁺ tutucusu olan Tetrakis-(2-Pyridylmethyl) ethylenediamine (TPEN; $50\ \mu\text{M}$) verilerek minimum sinyal elde edilmiştir (F_{min}). FluoZin-3'ün bilinen K_d değerinden yararlanılarak bazal çinko $[\text{Zn}^{2+}]_i = K_d \times (F - F_{\text{min}}) / (F_{\text{max}} - F)$ eşitliğinden yararlanılarak hesaplanmıştır (Tuncay vd., 2013).

Yukarıda açıklanan yöntem alternatif olarak hücrel serbest Zn²⁺ miktarını belirlemek için, genetik olarak kodlanmış Zn²⁺ duyarlı eCALWY (eCALWY:CFP-Atox1-linker-WD4-YFP; eCALWY1-6) Förster Resonance Energy Transfer (FRET) sensörleri kullanılmıştır. eCALWY FRET sensörleri metal bağlayıcı bölgeler içermektedir.



Şekil 2.2. Endoplazmik retikulum ve mitokondri serbest Zn²⁺ miktarlarının ölçümünde kullanılan Zn²⁺ duyarlı enhanced (eCALWY) FRET sensörleri. (Chabosseau ve ark., 2014).

Burada FRET sinyali, CFP'nin (cyan florescent protein) 433 nm dalga boyunda uyarılması sonucu enerji transferi yoluyla 480 nm'de emisyon yaymak yerine kendisine yakın olarak bulunan (<5 nm) YFP (yellow florescent protein; ex:480/em:535 nm) floresans proteinini uyararak YFP'nin emisyon yaymasını sağlayarak oluşur (Şekil.2.2). Zn^{+2} buradaki floresan proteinlere bağlı olduğu durumda CFP ve YFP birbirlerinden uzak duruma olacaklarından (>5nm) FRET oluşturmayacak, ancak Zn^{+2} ortamdaki uzaklaştırıldığında veya TPEN gibi Zn^{+2} 'ya karşı afinitesi 1 fM olan bir madde ile bağlandığında bu floresans proteinler yeterli uzaklığa gelerek FRET oluşturmuştur (Vinkenborg ve ark. 2009). S(ER) ve mitokondri içindeki serbest Zn^{+2} 'nu değişimleri S(ER) ve mitokondri hedefli Zn^{+2} duyarlı FRET sensörlerinin H9c2 hücre hatlarına geçici transfeksiyonu sağlanarak belirlenmiştir. FRET sensörü mitokondri matriksine, sitokrom c oksidaz altbirim 8 (Cox VIII) sinyal peptidinin füzyonu (Mit-eCALWY) ve ER'a bir sinyal peptidi olarak N terminaline preproinsulin (PPI) sekansı ve C-terminaline Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) sekansının eklenmesi ile (EReCALWY) tanıtılmıştır. Mitokondrideki serbest Zn^{+2} 'yu ölçmek için kullanılacak olan Mit-eCALWY4'ün Zn^{+2} için bağlanma afinitesi 0,063 nM, ve S(ER) içerisindeki serbest Zn^{+2} 'yu ölçmek için kullanılan EReCALWY6'nın Zn^{+2} için bağlanma afinitesi ise 2,9 nM'dir. Mitokondri ve S(ER) serbest Zn^{+2} miktarları sitozolik serbest Zn^{+2} 'da kullanılan ölçüm tekniği ile belirlenmiştir. Bunun için H9c2 hücreleri içerisinde yuvarlak cam lameller (çapı 24 mm) bulunan 6'lık platelere ekilerek bir gün boyunca inkübasyonu sağlanmıştır. Bir sonraki gün hücreler yıkanarak daha önce hazırlanmış olduğumuz ve 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe ettiğimiz lipofektamin, mitokondri veya S(ER) hedefli FRET sensörleri taşıyan plazmid (1 µg/kuyu) karışımını her bir kuyucuğa eklenmiş ve 24-48 saat inkübe edilmiştir. Transfeksiyondan 24 saat sonra hücreler yuvarlak camlara alınarak konfokal mikroskopta bazal Zn^{+2} değişimleri oransal (YFP/CFP; ratiometric) olarak izlenmiştir. ER ve mitokondri içerisindeki serbest Zn^{+2} miktarını belirlemek için, bir Zn^{+2} tutucusu olan (TPEN; 50 µM), hücre içine Zn^{+2} sokmak için, 10 ZnPT kullanılarak yapılmıştır. İlk olarak hücrelerden bazal bir sinyal ölçüldükten sonra TPEN eklenerek maksimum sinyal elde edilmiş, daha sonra ise, ZnPT eklenerek minimum sinyal toplanmıştır. Elde edilen bazal, maksimum ve

minimum sinyaller $[Zn^{+2}]_{ER/Mit} = kd^*(R_{max}-R)/(R-R_{min})$ eşitliğinde yerine konularak mitokondri veya S(E)R içerisindeki serbest Zn^{+2} miktarları hesaplanmıştır.

2.5. Mitokondride Yapılan İncelemeler

2.5.1. Mitokondri Membran Potansiyelinin Ölçülmesi

MitC membran potansiyelinin ölçülmesi için JC-1 floresans boyası kullanıldı. MitC membran potansiyeli ile ilgili floresans görüntülemesi yapmak için lazer taramalı konfokal mikroskop kullanılarak (Leica TCS SP5) ve fotobleaching etkisini azaltmak ve hızlı tarama yapabilmek için düşük çözünürlükte görüntü alınması ve lazer gücünün minimumda tutulmasına özen gösterildi. Hücreler FCCP (1 μ M) verilerek ölçülen floresan şiddet oranı değerlendirildi. Ölçülen floresans sinyali şiddet değişiminden arka plan sinyali çıkarıldıktan sonra $\Delta F = F-F_0/F_0 \times 100$ (F_0 = ölçülen bazal sinyal, F = maksimum veya minimum floresans değeri) formülü kullanılarak floresans değişimleri yüzde olarak hesaplandı.

2.5.2. Mitokondri Oksidatif Stres Seviyesinin Ölçümleri

Mitokondri oksidatif süreçlerini ölçmek için MitoSOX-Red boyası kullanılmıştır. Hücreler 3 μ M MitoSOX-Red floresan boyasıyla 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra konfokal mikroskopunda 488 nm'de uyarılan hücrelerden 5 dk kararlı bir yanıt alındıktan sonra FCCP (1 μ M) verilerek kayıtlar kalibre edilmiştir. Daha sonra ölçülen floresans sinyali şiddet değişiminden arka plan sinyali çıkarıldıktan sonra $\Delta F = F-F_0/F_0 \times 100$ (F_0 = ölçülen bazal sinyal, F = maksimum veya minimum floresans değeri) formülü kullanılarak floresans değişimleri yüzde olarak hesaplandı.

2.6. Biyokimyasal İncelemeler

2.6.1. Protein Tiyol (SH) Oksidasyonunun Ölçülmesi

İzole kardiyomiyositler önce içeriği (mM olarak): 123 NaCl, 5,4 KCl, 1,7 MgCl₂, 1,8 CaCl₂, 10 HEPES ve 10 glikoz, pH=7,4) olan HEPES tamponu ile yıkandıktan sonra %2 sodyum dodecylsulfate içeren 0,2 M Tris/HCl (pH=8,1) tamponu ile parçalanmaları sağlanmıştır. Ölçüm Ellman ayırıcı kullanılarak belirlenmiştir. Toplam protein tiyol (SH grubu) ölçümü için, 0,05 mL parçalanmış hücre solüsyonundan alınarak 0,8 mL saf su ve 0,1 mL 2 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) ile karıştırarak 20 dakika boyunca renk oluşumu için beklendi. Beklemeden dolayı oluşan süpernatantların 412 nm dalga boyunda absorbanları okunmuştur. Serbest (acid soluble) SH gruplarının miktarını belirlemek amacıyla 0,7 mL parçalanmış hücre solüsyonu ile 0,35 mL %20'lik trichloroacetic acid (TCA) ile karıştırılarak 13.000xg' de 10 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası çöken kısım %20'lik TCA ile yeniden yıkanmıştır. Daha sonra supernatant NaOH ile pH=8'e ayarlanarak 412 nm de absorbanları okunmuştur.

2.6.2. Western-blot (immuno-blot) Tekniği ile Protein Seviyesi Ölçülmesi

Western-blot için örnekler -80°C'den çıkartılarak Dokular homojenizasyon tampon çözeltisine konmuştur. Tamponun içeriği (mM olarak) 20 Tris-HCl (pH 7,4); 150 NaCl; 2 KCl; 2 EDTA; 0,5 DTT; proteaz inhibe eden çözelti 0,4 PMSF; %2 NP-40; ve %1 sodyum deoksikolat). Daha sonra 15 000xg'de 15 dakika +4°C de santrifüj edildikten sonra homojenat elde edilmiştir. Western-blot yöntemine geçmeden önce her bir örnekte bulunan protein tayini yapılmıştır (Bradford). Protein içeriği belirlendikten sonra 50 µg/ml'lik toplam proteine örnek yükleme tamponu ilave edilerek immuno-blot yöntemine geçilmiştir (Yükleme tamponu: Glycerol; SDS 10%, 0,5 M Tris HCl pH 6,8, β-mercaptoethanol ve Bromophenol 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 yürütülmüştür. Elektrik alan altında ile ağırlıklarına göre ayrılan proteinler transfer cihazı yardımıyla 30 dakika süresince PVDF membrana transfer edilmiştir. Bu aşamadan sonra membranlar TTBS (solüsyonunda (%3 oranında albumin içeren) %0,1 Tween-20, 10 mM Tris ve 150 mM NaCl) alınmış ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon aşamasının ardından %3 oranında albumin içeren TTBS solüsyonunda birincil antikorlar ile örneğin; ZIP7 (Santa Cruz, sc-83858, 1:500), ZIP8 (Protein Tech, 20459-1-AP; 1:500), ZIP14 (Thermo, PA5-21077; 1:500), ZnT7 (Santa Cruz, sc-160948; 1:500), ZnT8 (Santa Cruz, sc-98243, 1:500), Mfn-1 (sc-166644, 1:1000), Mfn-2 (sc-100560, 1:1000), Fis-1 (sc-98900, 1:1000), OPA1 (sc-393,296), PKC α (sc-8393), p PKC α (sc-377565), COXIV (ab1474), β -actin (Santa Cruz, sc-47778, 1:5000), ve GAPDH (Cell Signalling, D16H11, 1/5000) istenilen protokole göre hazırlanmış ve bir gece (+4 °C) inkübasyona bırakılmıştır. Bir gün sonra membranlar TTBS solüsyonu ile 3 defa 10' ar dakika süreyle yıkama işleminin ardından ikincil antikorlama aşamasına geçilmiştir. Daha sonra membranlar tekrar yıkanarak ECL substratı olan luminol ile ışımaya yapılması sağlanarak hassas X-ışını radyografi filmleri yardımıyla görüntüleme yapılmıştır. Elde edilen protein bant görüntüleri Biorad analiz programlarıyla dansitometrik olarak analiz edilmiştir. β -Aktin ve GAPDH, COXIV ve SERCA protein seviyeleri, deney grubunda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermediği için (%4 daha fazla) ilgilenilen protein düzeyleri bu proteinlere normalize edilerek değerlendirilmiştir.

Organeller ticari kitler (mitokondri için: abcam; ab110168 ve ER için: sigma ER0100) yardımıyla izole edilmiştir. Yöntem özetle protokollerde belirtilen farklı çöktürme hızı esasına dayanmaktadır.

2.6.3. Toplam RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Dondurulmuş dokulardan 50-100 mg olacak şekilde tartılarak PBS 1 mL RiboEx (RNAaz inhibitörü) eklenip buz üstünde parçalama işlemi yapılarak 5 dk

inkübe edilmiştir. Daha sonra ve 200 µL kloroform eklenmiş lizatlar 15 saniye boyunca çalkalanmış ve tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra (12,000×g'de 15 dakika +4°C'de) santrifüj edilmiş üst faz yeni bir tüpe aktarılmıştır.

Elde edilen üst faz 500 µL izopropanol eklenip oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. %100'lük 1mL ethanol eklenerek pellet yıkanmış ve (7,500×g'de 5 dakika) santrifüj edilerek ethanol uzaklaştırılarak toplam RNA elde edilmiştir. Elde edilen total RNA, saf su içinde çözülmüştür. RNA konsantrasyonu 230-260-280 nm'de boş örneğe karşı ölçülerek belirlenmiştir. cDNA sentezi için 1 µg RNA kullanılmıştır.

Primer Blast (NCBI) programı kullanılarak primerler oluşturulmuştur. Her bir primerin PCR ürünlerinin çoğaltılan fragman boyutu ve primerlerin spesifikliği, NCBI ve ENSEMBLE veri tabanları ile kontrol tekrar kontrol edilerek deneye başlanmıştır. Primer sekanslar Çizelge 2.1' de verilmiştir.

Çizelge 2.1. RT-PCR için kullanılan primerlerin ürün boyut ve dizileri.

Gen	Sekans Dizilimi	Boyut (bp)
Kv 4.3	Forward primer 5'TCCACCATCAAGAACCACG-3' Reverse primer 5'-AGCAGGTGGTAGTGAGGCC-3'	133
Kv 4.2	Forward primer 5'-CTTCACTATCCCCGCCAT-3' Reverse primer 5'-GTTTCCACCACATTCGCG-3'	308
Kv 1.4	Forward primer 5'-ATAGGAACCGTCCCAGCTTT-3' Reverse primer 5'-GCCCTGTCCTCCTTCTCT-3'	184
Na ⁺ /K ⁺ popması	Forward primer 5'GAAGCTCATCATCAGGCGACG-3' Reverse primer 5'-CCAGGGTAGAGTTCCGAGCTC-3'	159
Kir6.2	Forward primer 5'-TCCAACAGCCCGCTCTAC-3' Reverse primer 5'-GATGGGGACAAAACGCTG-3'	206

Gerçek zamanlı PCR reaksiyonları SYBR Green gerçek zamanlı PCR kiti (Finnzymes, Finlandiya) kullanılarak gerçekleştirildi. Tüm transkripsiyon faktörleri için sentezleme sonuçları absolute quantification (mutlak değerlerin miktarı) analiziyle PCR ürününün miktarındaki ilk önemli artış (C_T -treshold cycle, döngü eşik değeri) prensibine göre yapılmıştır. Örnekler arasındaki farklılık, örnek eğrilerinin belirli bir eşik floresan sinyal seviyesi elde etmesi için gerekli olan amplifikasyon döngü sayılarının karşılaştırılmasıyla belirlenmiştir. Tüm primerlerin verimliliği daha önceki çalışmalarımızda yapılmıştır (Değirmenci ve ark., 2018).

2.7. H9c2 hücre Kültürünün Üretilmesi ve Kullanılması

Çalışmamızda embriyonik sıçan ventriküllerinden türetilmiş H9c2 hücre hattı kullanılmıştır. Hücreler, %10 fetal dana serumu (FBS), %1 penisilin ve streptomisin, 4 mM L-glutamin ve 1 mM sodyum piruvat içeren DMEM içerisinde, standart filtreli hücre kültürü flaskları kullanılarak, 37°C sıcaklıkta ve %5 CO₂ seviyesinde olan inkübatör içerisinde tutularak büyütülmüştür. Hücrelerin ortamları 2 günde bir değiştirilmiş ve hücreler %70-80 sıklık düzeyine ulaştıklarında ise kaldırılıp 1:3 oranında flasklara tekrar ekilmiştir. Hücreleri flask tabanından kaldırırken öncelikle fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile 1 kez yıkanır daha sonra bir çeşit rekombinant hücre ayrıştırma enzimi olan TyrpLE içerisinde 2 dakika tutularak hücreler kaldırılır. Kaldırılan hücreleri içeren karışıma en az TyrpLE hacmi kadar DMEM eklenerek 250G de 5 dakika santrifüj edilir ve pelet üstü atılır, pelete DMEM eklenerek hücre karışımı elde edilir. Elde edilen bu karışımın bir kısmı 1:3 oranında yeni flasklara eklenerek hücreler büyümeye devam ettirilmiş, diğer bir kısmı ise deneyde kullanılmak üzere 6 kuyulu plakalar içine konulan ve otoklavlanarak steril hale getirilmiş lameller üzerine ekilmiştir. Kırık lamellere ekilen hücreler ekildikten sonra 5-8 gün arası deneyde kullanılmıştır. Bu çalışmada pasaj numarası 10-20 arası olan H9c2 hücreleri kullanılmıştır.

2.8. Kullanılan Kimyasallar

NaCl, KCl, MgSO₄, CaCl₂, KH₂PO₄, HEPES, glikoz, CsCl, MgCl₂, MgATP, EGTA, Na₂GTP, CdCl₂, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄ ve FCCP, Glibenclamide ve MitoTEMPO Sigma (SIGMA-ALDRICH ChemieGmbH, Taufkirchen, Germany)'dan satın alınmıştır. Kolejenaz tip-2 worthington firmasından (Worthington Biochemical Corporation, ABD), Fura-2 (AM) (Molecular probes, ABD), SBFI, DAF, DCFDA, SNARF ve FluoZin-3 (AM) (Invitrogen, ABD)'den satın alınmıştır.

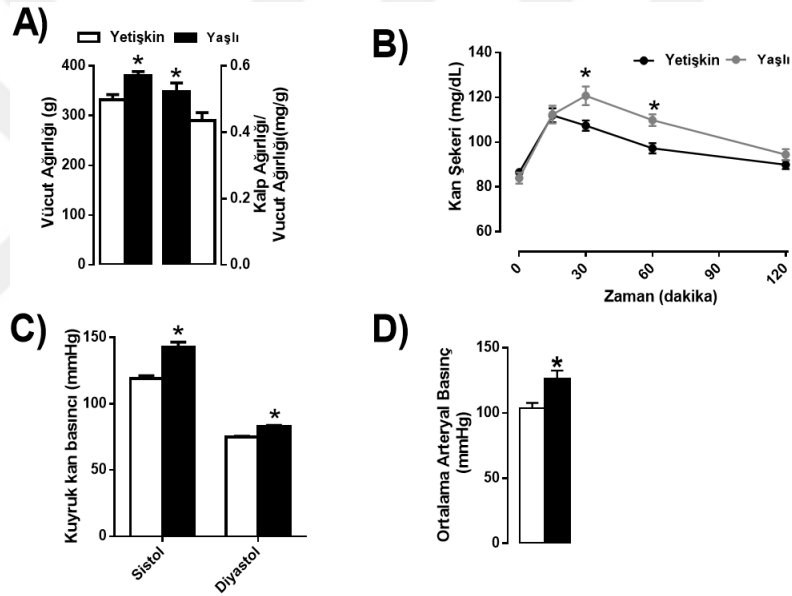
2.9. İstatistiksel Analizler

Deneysel veriler Ortalama \pm SEM (standard error of mean) olarak verilmiştir. Değerler arasındaki farkın istatistiksel olarak değeri ise ANOVA (TUKEY post-hoc) veya Student t-testi (one-tailed) kullanılarak test edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık test değeri olarak $p < 0,05$ kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Yaşlanmaya Bağlı Sistemik Değişimler

Çalışmamızda, iki grup Wistar türü erkek sıçan kullanılmış olup, birinci grup 6-aylık (yetişkin) sıçanlar ve ikinci grup ise 24-aylık (yaşlı) sıçanlardan oluşturulmuştur. Yaşlı sıçanlarda vücut ağırlığı ortalama olarak ($380,9 \pm 8,4$ g; hayvan sayısı, $n=30$) ve yetişkinlerde ise ($331,3 \pm 8,4$ g; $n=30$) olarak ölçülmüştür (Şekil 3.1.A; sol).



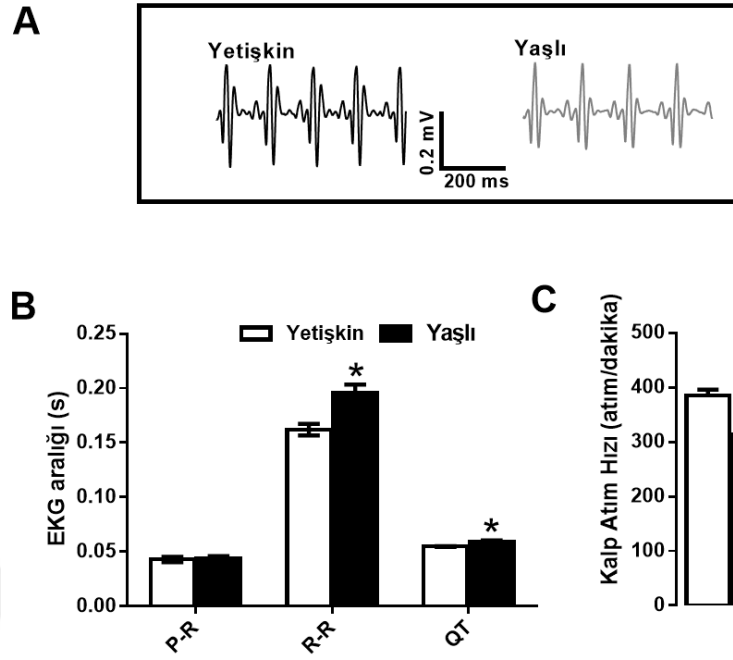
Şekil 3.1. Deney hayvanları ile ilgili sistemik parametrelerin değerlendirilmesi.

A) Gruplara ait vücut ağırlığı ve kalp ağırlığı/vücut ağırlığı ortalama (\pm SEM) değerleri verilmiştir. B) 1 g/kg şeker yüklemesini takiben gözlenen zamansal kan şekeri değerleri gösterilmiştir. C) Tail-cuff yöntemiyle elde edilen in-vivo sistolik ve diyastolik basınç değerleri ve ortalama arteriyel basınç değerleri yer almaktadır. Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. * $P<0,05$ yetişkin gruba göre.

Kalp ağırlığının vücut ağırlığına oranının (KA/VA; mg/g) yetişkinlerde ortalama $0,43 \pm 0,02$ ve yaşlılarda ise bu oran $0,52 \pm 0,02$ olup, yaşlı grupta bu oranın yetişkinlere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.1.A; sağ).

Yaşlı grupta kan şeker düzeyi yanında oral glukoz tolerans testi uygulanmış ve sonuçlarımız Şekil 3.1.B’de verilmiştir. İnsülin direnç gelişiminin göstergesi olarak kabul edilen bu test sonucuna göre, sıçanlarda glukoz (1 g/kg) yüklemesini takiben 15. dakikada kan glukoz düzeyi, yetişkin ve yaşlı gruplarda yaklaşık olarak aynı seviyeye yükselmesine karşın (Yaşlı: 112,4±3,9 mg/dL, n=15 ve Yetişkin: 112,1±3,17 mg/dL, n=15) daha uzun sürelerde (60. dakika) yaşlı grubunda (Yaşlı: 109,8±2,59 mg/dL, n=15 ve Yetişkin: 97,3±2,3 mg/dL, n=15) anlamlı olarak daha yüksek kan şekeri düzeyi ölçülmüştür. Bu gruplarda kuyruktan ölçülen sistolik (Yaşlı: 142,5±3,9 mmHg; n=15 ve Yetişkin: 119±2.20 mmHg, n=15); diastolik (Yaşlı: 82,5±1,15 mmHg; n=15 ve Yetişkin: 74,8±0,6 mmHg n=15) basınçlarda (tail-cuff yöntemi ile) yaşlı grupta anlamlı düzeyde artış gözlenmiştir (Şekil 3.1.C). Ortalama arteriyel basıncın yaşlı grupta %50 yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.1.D).

Yaşlı grupta kalbin elektriksel aktivitesini gözlemek için, vücut yüzeyinden elektrokardiyogram (EKG) ölçülmüştür. Sıçanlar hafif anestezi altında iken 2 aktif ve 1 referans elektrotlar kullanılarak (BIOPAC programı yardımıyla) EKG kayıtları yapılmıştır (Şekil 3.2.A). Bu şekilden yapılan ölçümlerde, sinoatriyal noddan atriyoventriküler noda iletimde (P-R segmenti) yaşlı grupta yetişkin grupla karşılaştırıldığında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Ancak, ventriküler depolarizasyonu temsil eden QT intervalinde (Yaşlı: 59 ±0,01 ms, n=10 ve Yetişkin: 54 ±0,05 ms, n=10) yaşlı grupta yine yetişkin grupla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı seviyede bir uzama gözlenmiştir. Bunlara ek olarak, yine yaşlı grubun R-R intervalinin yetişkin gruba göre anlamlı seviyede uzun olduğu (Yaşlı: 197 ±0,07 ms, n=10 ve Yetişkin: 162 ±0,05 ms, n=10) gözlenmiştir (Şekil 3.2.B). Bu verilere paralel olarak, yaşlı grupta kalp atım hızının yetişkinlere oranla yine anlamlı seviyede yavaş olduğu gözlenmiştir (Yaşlı: 314±13,3 atım/dakika, n=10 ve Yetişkin: 385±10,2 atım/dakika, n=10; Şekil 3.2.C).



Şekil 3.2. Deney hayvanlarına ait elektrokardiyogram (EKG) kayıtlarının değerlendirilmesi.

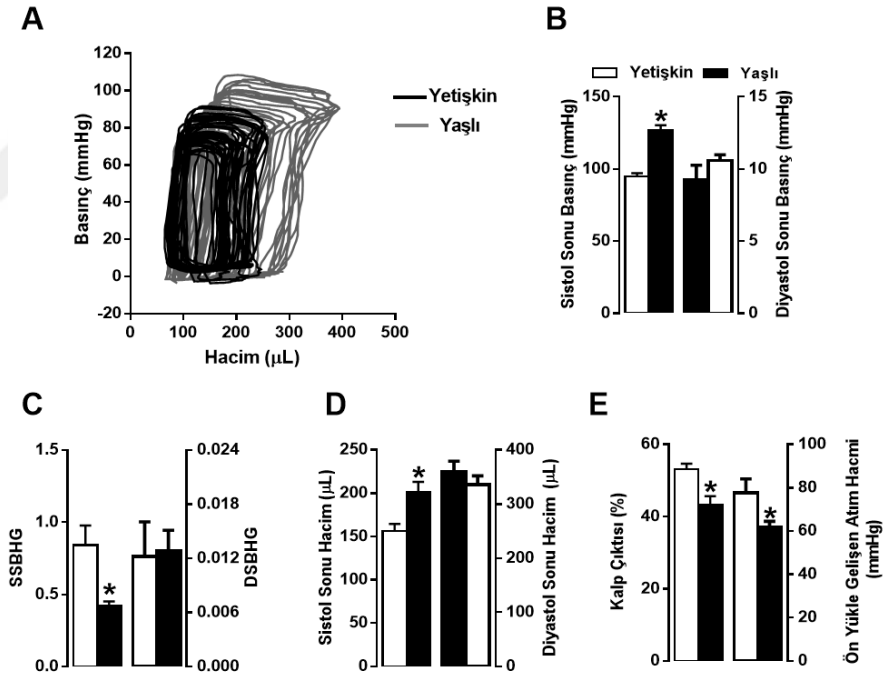
A) Yetişkin ve yaşlı sıçanlara ait EKG desenleri yer almaktadır. B) Gruplara ait EKG zaman desenleri değerlendirilerek P-R, R-R ve QT süreleri ve (C) kalp atım hızı hesaplanmıştır. Veriler ortalama±SEM olarak verilmiştir. *P<0,05 yetişkin gruba göre.

3.2. Yaşlanmanın Kalp İşine Etkisi

Yaşlanma sürecinde kalp işinin değerlendirilmesi için izofloran inhalasyonu ile uyutulan sıçanların karotid arteri ekarte edilip küçük bir kesi ile in vivo hacim-basınç (V-P) kateteri bu kesiden damarın içine dikkatlice yerleştirilmiştir. Karotid basıncı okunduktan sonra kateter yavaşça aşağı doğru itilerek sol ventrikülün içine yerleştirilmiştir. 10 dakika boyunca beklenerek yanıtların kararlı olması sağlandıktan sonra kaydedilen basınç-hacim eğrileri sisteme ait veri kayıt sisteminde analiz edilmiştir (Şekil 3.3A).

Yaşlı grupta sistol sonu basıncın yetişkin grupla karşılaştırıldığında, yaklaşık %30 arttığı (Yaşlı: 126,0 ±2,7 mmHg, n= 20 ve Yetişkin:94,6±2,46 mmHg, n= 17), diyastol sonu basıncın değişmediği (Yaşlı: 9,23 ±1,07 mmHg, n= 16 ve Yetişkin: 10,5±0,4 mmHg, n= 17) gözlenmiştir (Şekil 3.3.B). Kalpte gözlenen hacimsel

değişimlere göre, diyastolik sonu hacminin değişmediği (Yaşlı: $338,21 \pm 19,6 \mu\text{L}$, $n=20$ ve Yetişkin: $335,6 \pm 17,21 \mu\text{L}$, $n=17$) sistol sonu hacmin ise yaşlı kalplerde (Yaşlı: $200 \pm 12,1 \mu\text{L}$, $n=20$ ve Yetişkin: $156 \pm 8,7 \mu\text{L}$, $n=17$) arttığı gözlenmiştir (Şekil 3.3.D). Şekil 3.3.C’de görüldüğü gibi, yaşlanmayla birlikte diyastol sonu basınç hacim gevşemesinin değişmediği (Yaşlı: $0,012 \pm 0,002$, $n=16$ ve Yetişkin: $0,012 \pm 0,003$, $n=12$), buna karşın sistol sonu basınç hacim gevşemesinin ise anlamlı düzeyde azaldığı (Yaşlı: $0,41 \pm 0,03$, $n=16$ ve Yetişkin: $0,84 \pm 0,13$, $n=12$) görülmektedir. Yaşlanma sürecinde kalp çıktısının ($45,6 \pm 0,9$ L/dk, $n=12$) yetişkinlerle karşılaştırıldığında ($60,4 \pm 5,0$ L/dk, $n=8$) %25 oranında azaldığı, bununla birlikte ön yükte gelişen atım hacminin %26 oranında azaldığı (Yaşlı: $61,3 \pm 2,84$ mmHg, $n=20$ ve Yetişkin: $77,6 \pm 6,33$ mmHg, $n=17$) gözlenmiştir (Şekil 3.3.E).

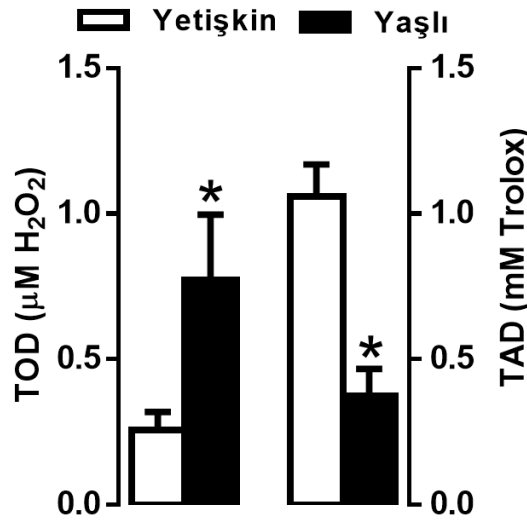


Şekil 3.3. Yaşlanmada kalbin hemodinamik parametrelerinin değerlendirilmesi.

(A) Yetişkin ve yaşlı gruba ait basınç hacim ilişkisini gösteren deneysel desenler yer almaktadır. (B) Sol ventrikül içine yerleştirilen kateter yardımıyla ölçülen gruplara ait sistol sonu basınç (solda) ve diyastol sonu basınç değerleri, (C) sistol sonu basınç hacim gevşemesi (SSBHG,solda) ve diyastol sonu basınç hacim gevşemesi değerleri (DSBHG,sağda), (D) sistol sonu hacim (solda) ve diyastol sonu hacim (sağda) değerleri yer almaktadır (E) gruplara ait kalp çıktısı değerleriyle (solda) ön yük oluşturulduktan sonra gelişen atım hacmi değerleri (sağda) gösterilmektedir. Veriler ortalama±SEM olarak verilmiştir. * $P<0,05$ yetişkin gruba göre.

3.3. Yaşlanmada Sistemik Oksidatif Stres ile İlgili Bulgular

Yaşlanmada artmış sistemik oksidatif stresin kardiyovasküler hastalıklara yakalanma olasılığını arttırdığı pek çok çalışmada bildirilmiştir. Deneylerde kullandığımız hayvanlarda sistemik düzeyde oksidasyon durumlarının ölçülmesi çalışmamıza yol göstereceğinden serum örneklerinde Toplam Oksidan Düzeyi (TOD) ve Toplam Antioksidan Düzeyi (TAD) değerleri kolorimetrik kit aracılığıyla ölçülmüştür. Şekil 3.4'te görüldüğü gibi yaşlanmada oksidan durumun ($0,77\pm 0,18 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ n=7) yetişkin grupla kıyasla ($0,25\pm 0,06 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ n=7) 3 kat arttığı total antioksidan düzeyinin ise %70 azaldığı (Yaşlı: $0,37\pm 0,09 \text{ mM Trolox}$, n=7 ve $1,05\pm 0,11 \text{ mM Trolox}$, n=7) görülmüştür.



Şekil 3.4. Yaşlı ve erişkin hayvanlara ait serumlarda incelenen toplam oksidan düzeyi (TOD) ve toplam antioksidan düzeyinin incelenmesi (TAD). Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. *P<0,05 yetişkin gruba göre.

3.4. Yaşlanmaya Bağlı Değişimlerin İzole Organlarda İncelenmesi

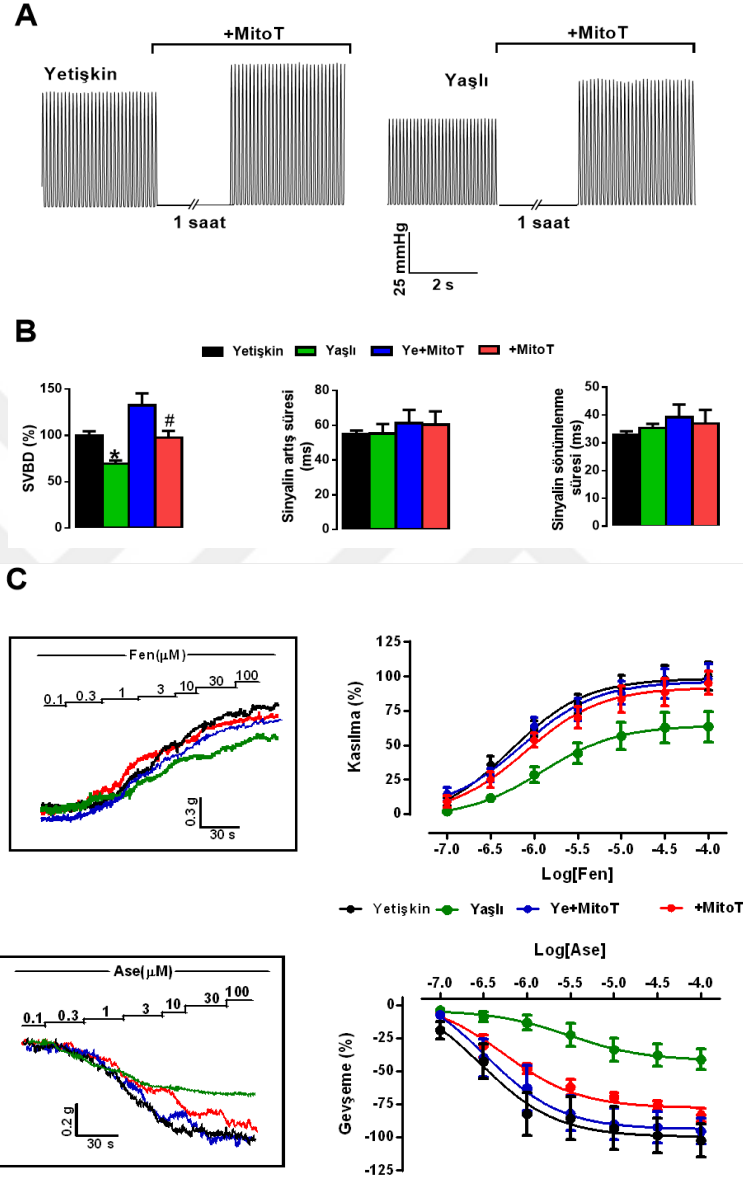
Kalpte mitokondri en temel enerji üretim yeri olup dinamik bir özelliğe sahiptir. Kardiyak yaşlanmada en önemli süreçlerden birisi mitokondriyel oksidatif strestir. Yaşlanmada değişen kalbin mekanik aktivitesine mitokondri hedefli bir

antioksidan olan MitoTEMPO (MitoT)'nun etkileri, izole kalpler Langerdorff-perfüzyon sisteminde bazal yanıtlar incelendikten sonra 1µM MitoTEMPO ile 1 saat boyunca perfüze edilerek incelenmiştir (Şekil 3.5A). Şekil 3.5B'de görüldüğü gibi yaşlanmada azalmış sol ventrikül içi basınç gelişiminin (Yaşlı; 69,4±3,4 mmHg, n= 5, Yetişkin: 100±4,5 mmHg, n= 5) MitoTEMPO uygulamasıyla anlamlı olarak (+MitoT: 97,3±7,5 mmHg, n=5) gözlenmiştir. Buna karşın, sinyalin artış süresi ve sinyalin sönümlenme sürelerinde ise gruplar arasında anlamlı farklar gözlenmemiştir.

Yaşlı grupta vasküler sistemde de değişimler gözlenmiştir. İzole damar örneklerinde yapılan incelemelerde, damar kasılma yanıtları fenilefrin (10^{-4} - 10^{-7} M) ve gevşeme yanıtları ise asetilkolin (10^{-4} - 10^{-7} M) kullanılarak gözlenmiştir. MitoTEMPO (MitoT) uygulaması, damarlar 1 saat inkübe edildikten sonra kasılma ve gevşeme yanıtları tekrar edilerek gözlenmiştir. Şekil 3.5.C'deki kümülatif fenilefrin yanıtlarına göre, yaşlı sıçanlardan elde edilen damar örneklerinde fenilefrin (100 µM) yanıtlarının (63,4±11,1 ve n=7) yetişkin grupla karşılaştırıldığında (100±10,1, n=11) %37 azaldığı, MitoTEMPO uygulamasının yaşlı damarlarda kasılma yanıtlarını anlamlı (94,9±8,5, n=7) düzeyde arttırdığı gözlenmiştir. Bununla birlikte, konsantrasyon-yanıt eğrilerinden elde edilen etkili konsantrasyon değerlerinin (EC_{50}) yaşlanmada arttığı (Yaşlı: 1,23 µM±0,23, n=7 ve Yetişkin: 0,54 µM±0,24, n=11) antioksidan uygulamasının bu değeri anlamlı düzeyde azalttığı (0,80 µM±0,18, n=7) gözlenmiştir. Buna karşın antioksidan uygulamasının yetişkin gruplarda herhangi bir etkisinin olmadığı saptanmıştır.

Endotel yanıtlarını değerlendirmek için fenilefrin ile önceden gerdirilmiş damar örneklerinde, vazodilatör (gevşetici) bir ajan olan asetilkolin yanıtları incelenmiştir. Şekil 3.6B'de görüldüğü gibi asetilkolin (100 µM) yanıtlarının yaşlanma sürecinde azaldığı (Yaşlı: 41,5 ± 7,8 %, n=6; Yetişkin: 100,0 ± 12,3 %, n=11; +MitoT: 83,9 ± 4,5%, n=5) antioksidan uygulamasının bu yanıtları düzelttiği gözlenmiştir. Gevşeme yanıtlarına ait EC_{50} değerleri karşılaştırıldığında, yaşlanma da bu değer arttı (Yaşlı: 3,03 µM ± 0,35, n=7 ve Yetişkin: 0,29 µM ± 0,40, n=11) MitoTEMPO uygulamasının ise artmış olan değeri düzelttiği (+MitoT: 0,54 µM ±

0,21, n=7) görülmüştür. Ancak antioksidan uygulamasının yetişkin gruplarda etkisinin olmadığı saptanmıştır.

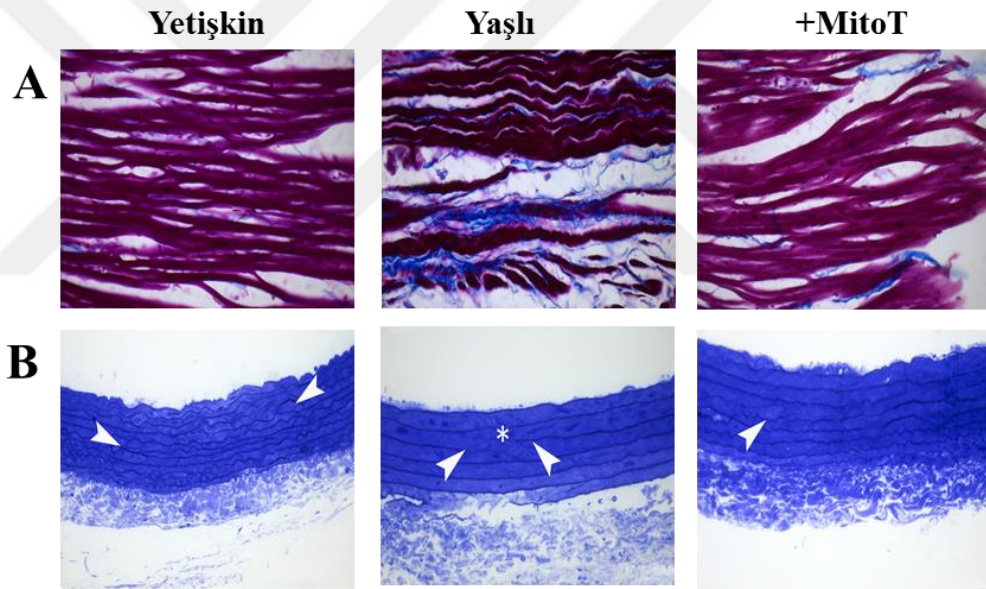


Şekil 3.5. Yaşlanmada değişen kalp-damar aktivitesine MitoTEMPO'nun etkileri.

(A) Langerdorff-perfüzyon sistemine bağlanan kalplerde MitoTEMPO uygulaması öncesi ve sonrası gözlenen SVBD (Sol Ventrikül Basınç Değişimi) değerlerine ait deneysel desenler yer almaktadır. (B) MitoTEMPO uygulamasının SVBD değerlerine (solda), sinyalin artış süresine (ortada) ve sinyalin sönmülmesine (sağda) etkisi gösterilmektedir. (C) İzole organ banyosu kullanılarak yaşlı ve yetişkin sıçanlara ait torasik aort yanıtlarının MitoTEMPO varlığında incelenmesi. *Üstte*, gruplara ait örnek fenilefrine verilen kümülatif kasılma desenleri ve elde edilen yanıtlar *Altta*, isegruplara ait asetilkoline verilen kümülatif gevşeme konsantrasyon-yanıt desenleri Kasılma ve gevşeme yanıtları kontrol yanıtlarına oranlanarak değerlendirilmiştir. Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. *P<0,05 yetişkin grubuna göre, #p<0,05 yaşlı grubuna göre.

3.5. Aort ve Kalp Kası ile İlgili Histolojik Bulgular

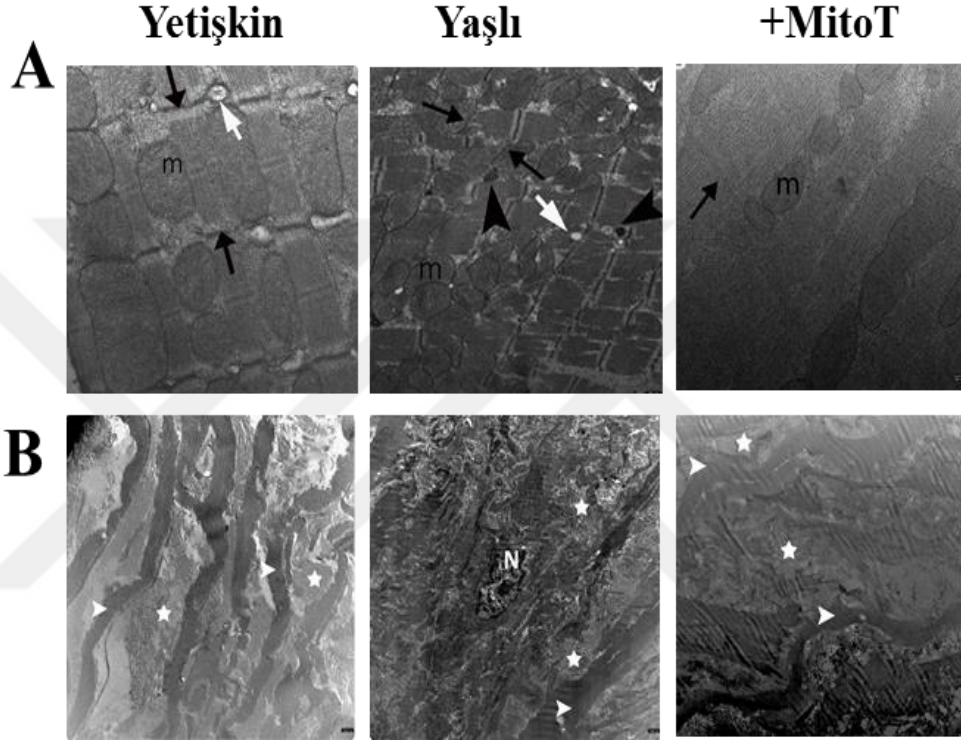
Yaşlanmada aort ve kalp kası ince yapısındaki değişimleri incelemek için ışık ve elektron mikroskobu incelemeleri yapılmıştır. Şekil 3.6'da Mallory Azan mavisisiyle yapılan boyamalar incelendiğinde yaşlanmada adipoz doku artışına bağlı olarak miyofibril bütünlüğünün bozulduğu ve hücreler arası matrikste bağ doku artışı gözlenmiştir. (Şekil 3.6) Aortik örneklerde ise elastik lamellar yapıda yassılaşımla birlikte yer yer kopmaların olduğu gözlenmektedir (Şekil 3.6.B, *ortada*). Mitokondri hedefli antioksidan uygulamasının (3 saat- 1 μ M) bu değişimleri düzelttiği gözlenmiştir (Şekil 3.6.A-B, *sağda*).



Şekil 3.6. Aort ve kalp kası ince yapısının ışık mikroskobu yöntemleriyle incelenmesi.

A) Sol ventriküle ait doku örneklerinden Mallory Azan (mavi) boyamasıyla fibroz gelişimini gösteren ışık mikrografları gösterilmektedir. Boya: Mallory Azan. Büyütme x400. **B)** Torasik aortaya ait yarı ince kesitlerin ışık mikrografları izlenmektedir. Ok başı; elastik lameller, asteriks; elastik lamellerde düzleşme. Boya: Toluidin Mavisii/Azur II. Büyütme x400.

Elektron mikrograf incelemeleri yaşlanmada yetişkin dokulara kıyasla T-tübüllerinde genişleme, lizozomal artış ve mitokondri sayısında anlamlı düzeyde bir azalma olduğunu göstermektedir (Şekil 3.7.A-B). MitoTEMPO uygulamasının bu değişimleri büyük ölçüde düzelttiği gözlenmiştir (Şekil 3.7.C). Bu bulgular izole organ düzeyinde gözlenen azalmış kasılma ve gevşeme yanıtlarıyla benzerlik göstermektedir.



Şekil 3.7. Aort ve kalp kası ince yapısının elektron mikroskobu yöntemleriyle incelenmesi.

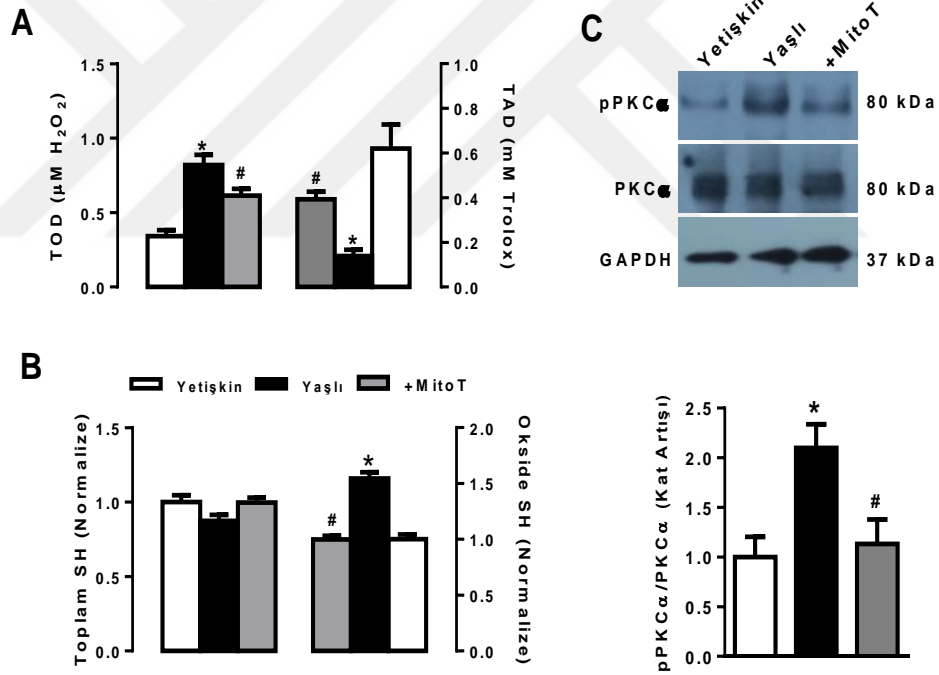
A) Sol ventriküle ait doku örneklerinden elde edilen elektron mikrograflar izlenmektedir. Ok; z çizgisi, m;mitokondriyon, beyaz ok;T tübülü, ok başı; lizozom. Büyütme: x 21560, x 7750, x 21560. B) Yetişkin ve yaşlı sıçanların torasik aorta örneklerinde elde edilen elektron mikrograflar izlenmektedir. Ok başı; elastik lameller, yıldız; kollajen lifler, N; düz kas hücre çekirdeği. Büyütme: x 21560

3.6. Yaşlanmanın Kalbin Elektriksel Aktivitesine Etkisinin İzole Kardiyomiyositlerde Gösterilmesi

Bu grup çalışmamızda yaşlanmada kalbin elektriksel aktivitesinin değerlendirilmesi için izole hücrelerde sarkolemmal iyonik akımlar ve hücre içi çeşitli iyonik mekanizmalar değerlendirilmiştir.

3.6.1. Yaşlı Sıçan Kardiyomiyositlerinde Oksidasyon Seviyesi ile İlgili Bulgular

Yaşlanmada artmış sistemik oksidatif stres hücresel düzeyde incelenmiştir. Bunun için hücrelerde TAD ve TOD seviyesi ve tiyol oksidasyon düzeyleri incelenmiştir. Şekil 3.8.A'da görüldüğü gibi yaşlı hücrelerde TOD miktarının ($0,34 \pm 0,03 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$, $n=5$) yetişkin grupla kıyasla ($0,82 \pm 0,07 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$, $n=5$) 3 kat arttığı bu değer antioksidan uygulamasıyla anlamlı düzeyde azaldığı ($0,61 \pm 0,05 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$, $n=5$) gözlenmiştir. Yaşlı hücrelerde ölçülen azalmış TAD değerlerinin (Yaşlı: $0,20 \pm 0,04 \text{ mM Trolox}$, $n=7$ ve $0,82 \pm 0,2 \text{ mM Trolox}$, $n=5$) mitoTEMPO inkübasyonu ile anlamlı düzeyde arttığı ($0,66 \pm 0,05 \text{ mM Trolox}$, $n=5$) görülmüştür.



Şekil 3.8. Yaşlı hücrelerde oksidasyon seviyesinin incelenmesi.

A) Hücre seviyesinde ölçülen gruplara ait TAD ve TOD değerleri verilmiştir. B) Yaşlı hücrelerde antioksidan uygulamasının artmış tiyol oksidasyonuna etkileri gösterilmektedir. C) pPKCα protein seviyesinin immuno-blot yöntemiyle incelenmesi. Veriler ortalama±SEM olarak verilmiştir. *P < 0,05 yetişkin grubuna göre, #p < 0,05 yaşlı grubuna göre.

Hücre seviyesinde artmış oksidan stresin proteinlerdeki tiyol düzeyine olası etkilerini incelemek için toplam ve okside tiyol ölçümleri de yapılmıştır. Toplam tiyol miktarının gruplar arasında değişmediği okside tiyol düzeyinin ise yaşlı grupta arttığı (Yaşlı; $1,55 \pm 0,05$, $n=4$, Yetişkin; $1 \pm 0,04$, $n=4$,) gözlenmiştir. Yaşlı hücrelerde artmış okside tiyol seviyesi antioksidan uygulamasıyla anlamlı düzeyde ($0,99 \pm 0,03$, $n=4$) azalmıştır (Şekil 3.8.B).

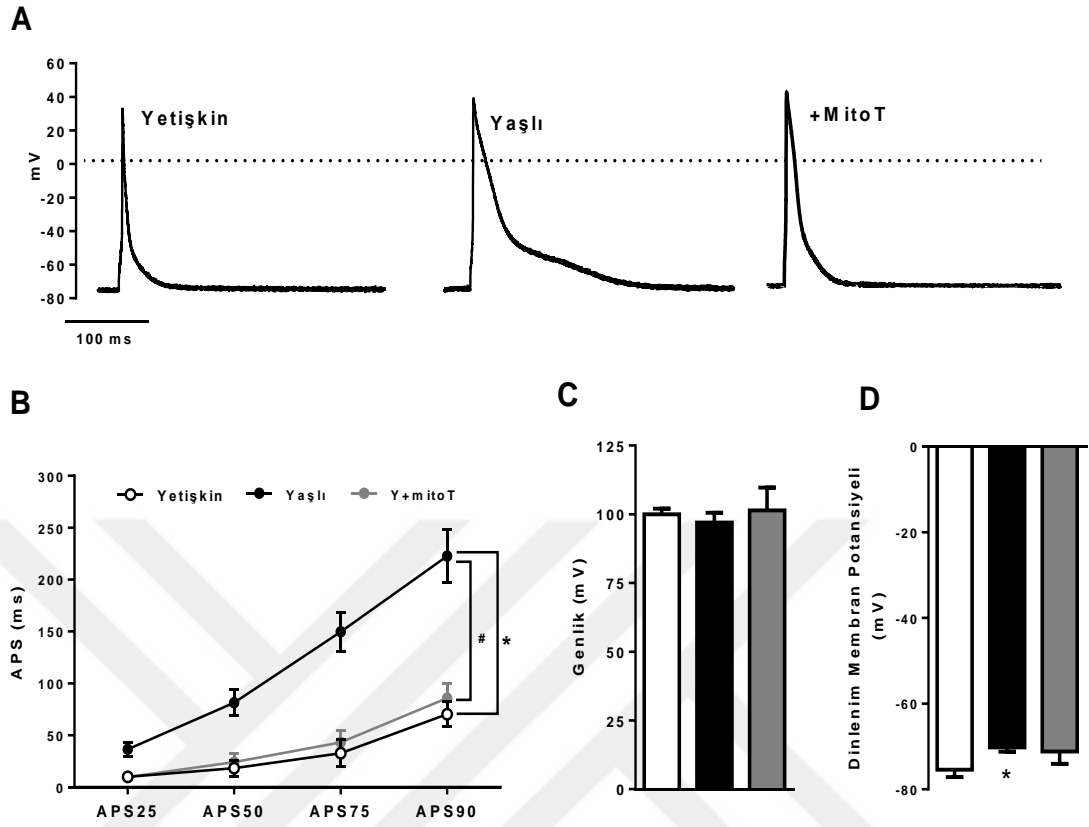
Artmış oksidan durumla yakın ilişkisi daha önceki çalışmalarımızda (insan kalp yetmezliğinde 5 kat artış) gösterilmiş pPKC α ifade düzeyi belirlenmiştir. Şekil 3.8.C' de gruplara ait immuno-blot görüntüleri ve hesaplanan değerler yer almaktadır. PKC α protein ifadesinin gruplar arasında değişmediği gözlenmiştir. Yaşlanmada pPKC α düzeyinin ise 2 kat arttığı antioksidan uygulamasının bu artışı anlamlı düzeyde baskıladığı gözlenmiştir.

3.6.2. Yaşlanmanın İzole Kardiyomiyositlerde Aksiyon Potansiyeli Parametrelerine Etkileri

Bu grup çalışmamızda, yaşlı sıçan kalp fonksiyonlarında ve özellikle QT süresindeki uzama ile ilgili değişimlerin hücre düzeyindeki incelemeleri yapılmıştır. Yaşlanmada hücre sığasının (303 ± 13 pF, $n=32$) yetişkinlere (240 ± 10 pF, $n=39$) oranla arttığı gözlenmiştir.

Öncelikle izole ventriküler kardiyomiyositlerde AP ile iyonik-akımlar incelenmiş ve yaşlı sıçanlarda hücresel düzeyde iyonik değişimlerde gözlenen değişimlere MitoTEMPO'nun etkileri incelenmiştir. Yaşlanmada hücre sığasının (303 ± 13 pF, $n=32$) yetişkinlere (240 ± 10 pF, $n=39$) oranla arttığı gözlenmiştir. Şekil 3.9.A da görüldüğü gibi, küçük depolarize edici uyarıcı etkisinde elde edilen aksiyon potansiyeli parametreleri gruplar arası karşılaştırmalarla değerlendirilmiştir.

AP desenleri incelendiğinde gruplar arasında AP genliğinin değişmediği (Yaşlı: $97 \pm 3,5$ mV, $n=22$ ve Yetişkin; $101 \pm 2,1$ mV, $n=31$). Ayrıca, MitoTEMPO uygulaması da bu parametrelerde önemli etkiler oluşturmamıştır ($101,4 \pm 3,7$ mV, $n=11$) (Şekil 3.9.C). Diğer yandan, AP repolarizasyon süresinde maksimum değerden %25'ine düşüş süresinin yaşlı grupta 4 kat uzadığı (Yaşlı: $38,1 \pm 6,1$ ms, $n=22$ ve Yetişkin; $13,0 \pm 0,3$ ms, $n=31$;) MitoTEMPO ile inkübe edilen yaşlı hücrelerde ise bu uzamanın düzeldiği ($13,9 \pm 0,9$ ms, $n=11$) gözlenmiştir (Şekil 3.9.B). Repolarizasyon fazının %50'sine düşüş süresinde, yaşlanmada görülen 4,5 katlık uzamanın (Yaşlı; $81,3 \pm 5,5$ ms, $n=22$; Yetişkin; $18,3 \pm 2,4$ ms, $n=31$) antioksidan uygulamasıyla ($24,2 \pm 4,5$ ms, $n=11$) normale döndüğü gözlenmiştir. Mitokondri hedefli antioksidan uygulamasının repolarizasyon süresinin %90'ına düşüş süresinde yaşlanma da görülen 3 katlık uzamayı (Yaşlı: $222,6 \pm 18,1$ ms, $n=22$; Yetişkin; $70,3 \pm 4,8$, $n=31$; MitoT: $85,8 \pm 7,9$ ms, $n=11$) normal değerlere yaklaştırdığı görülmüştür (Şekil 3.8B). Dinlenme membran potansiyelinin (E_m) yaşlanmada daha depolarize (Yetişkin; $-75,4 \pm 1,7$ mV, $n=31$ ve Yaşlı; $-70,2 \pm 1,0$ mV, $n=22$) değerlere kaydığı ancak MitoTEMPO uygulamasının herhangi bir etkisinin olmadığı ($-71,2 \pm 1,3$ mV, $n=11$) görülmüştür (Şekil 3.9.D). Bu bulgular bize yaşlanmada elektriksel aktivitenin hücresele seviyede de bozulduğunu ve oksidatif stresin bu süreçte başat rol oynayabileceğine işaret etmektedir.

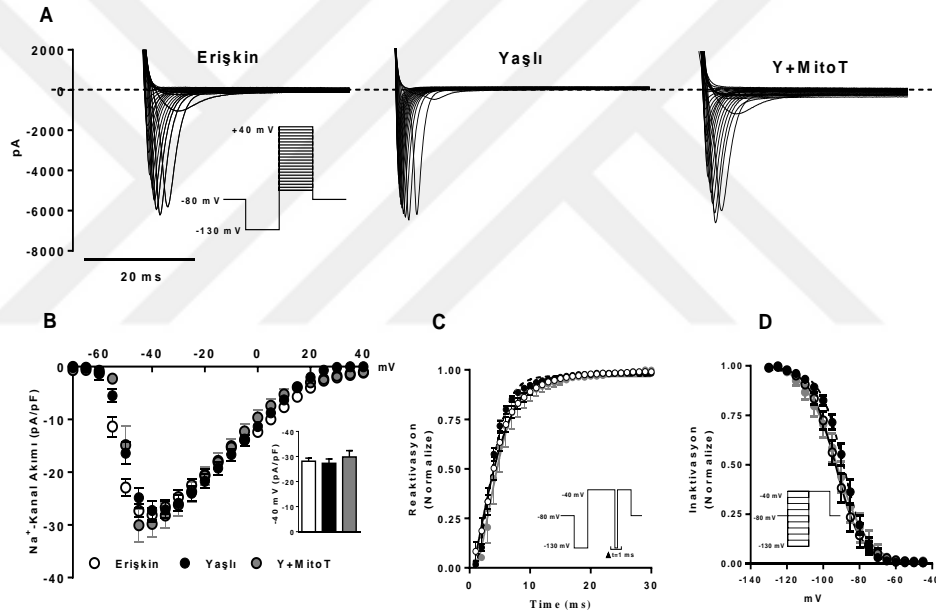


Şekil 3.9. Taze izole edilmiş hücrelerden elde edilmiş AP parametrelerinin değerlendirilmesi

(A) Gruplara ait alınmış orijinal örnek voltaj kayıtları, (B) AP repolarizasyon süresinin (APS) %25, %50, %75 ve %90'ına düşüş süreleri (APS₂₅, APS₅₀, APS₇₅ ve APS₉₀), (C) AP genliği, (D) Dinlenme membran potansiyeli, gösterilmiştir. Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. * $P < 0,05$ yetişkin gruba göre, # $p < 0,05$ yaşlı gruba göre.

3.6.3. Yaşlı Sıçan Kardiyomiyositlerinde Voltaj-kapılı Na⁺-kanalları ve MitoTEMPO Uygulamasının Etkileri

Bu grup incelememizde, AP depolarizasyon fazından sorumlu olan voltaj-kapılı (TTX Duyarlı) Na⁺ kanal akımları (I_{Na}) incelenmiştir. Şekil 3.10A'da gruplara ait örnek voltaj-kapılı Na⁺-kanal akım kayıtları ve uygulanan protokol verilmiştir. Na⁺-kanalına ait akım voltaj karakteristiğine bakıldığında antioksidan uygulamasının yaşlanmada zaten değişmemiş akımlara (+40 mV için; Yaşlı: $-27,0 \pm 1,8$ pA/pF, n=15, Yetişkin; $-28,1 \pm 1,2$ pA/pF, n=17; ve MitoT: $-29,3 \pm 2,5$ pA/pF, n=14) etkisinin olmadığı görülmüştür.



Şekil 3.10. Voltaj-kapılı Na⁺-kanal akımlarının değerlendirilmesi

(A) Gruplara ait TTX-duyarlı Na⁺-kanal akımları ve uygulanan protokol gösterilmiştir. (B) 23 farklı voltaj basamağı uygulanarak elde edilen Na⁺-kanalına ait akım-voltaj karakteristiği ve -40 mV potansiyelde elde edilen maksimum yanıtlar (inset), (C) zamana bağlı reaktivasyon ve (D) potansiyele bağlı inaktivasyon gösterilmektedir. Veriler ortalama±SEM olarak verilmiştir.

Na⁺-kanallarının biyofiziksel özellikleri olarak (depolarizasyonla birlikte hızlı açılabilen aktivasyon kapıları ve depolarizasyonla birlikte yavaş kapanan inaktivasyon kapısı gibi), yaşlanmada potansiyele bağlı inaktivasyon ve zamana bağlı reaktivasyon parametreleri incelenmiştir. Şekil 3.9D'de potansiyele bağlı

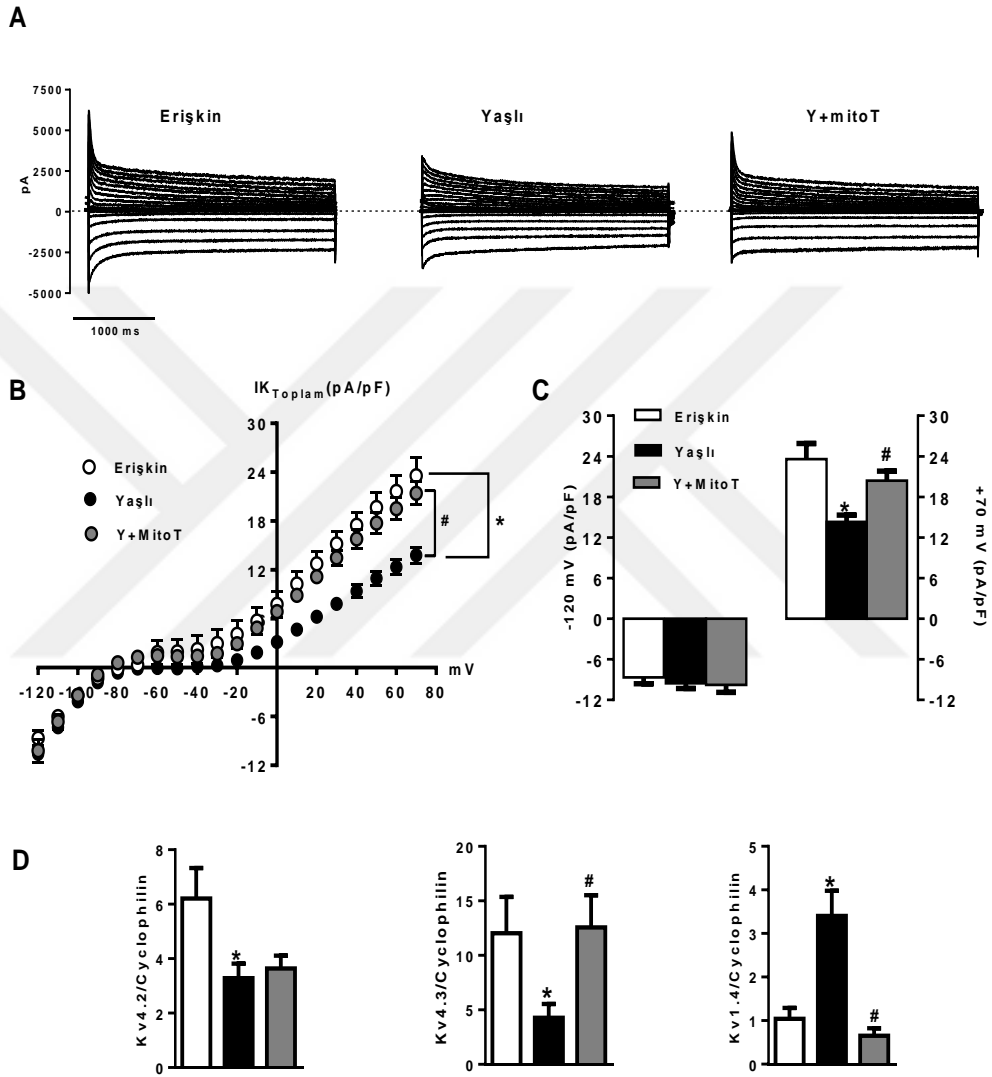
inaktivasyon parametrelerinin yaşlanmada değişmediği (Yaşlı $v_{m/2}$: $-88,6 \pm 0,5$ mV, $n=13$; Yetişkin $v_{m/2}$: $-93,4 \pm 0,7$ mV, $n=15$; MitoT $v_{m/2}$: $-92,8 \pm 1,0$ mV, $n=12$), MitoTEMPO uygulamasının da herhangi bir etkisinin olmadığı benzer şekilde zamansal parametreyi temsil eden tau (τ) zaman sabitinin de (Yaşlı τ : $6,86 \pm 0,03$ ms, $n=13$; Yetişkin τ : $6,79 \pm 0,02$ ms, $n=15$; MitoT τ : $6,72 \pm 0,02$ ms, $n=12$) gruplar arasında değişmediği görülmüştür.

3.6.4. Yaşlı Sıçan Kardiyomiyositlerinde Voltaj-kapılı K⁺-kanalları ve MitoTEMPO Uygulamasının Etkileri

Yaşlanmada organ düzeyindeki elektriksel bozulmalar (Şekil 3,2'teki QT uzaması) hücresel düzeyde AP'deki uzamayla (Şekil 3.5B, APS'lerdeki tüm fazlarda gözlenen uzamalar) uyumlu olduğu ve MitoTEMPO ile muamele edilen yaşlı izole hücrelerde bu uzamanın engellendiği görülmüştü. AP'deki bu uzamaya neden olan mekanizmalara ilişkin çeşitli varsayımlar bildirilmiş ve AP'deki uzamadan sorumlu olan membran akımlarından voltaj-kapılı K⁺-akımlarının yaşlanma ile ilgili değişiklikler incelenmiştir. Şekil 3.11A'da gruplara ait örnek K⁺-kanal akımları verilmiştir.

Ölçülen toplam K⁺-kanal akımlarından APS'nin %25'ine karşılık gelen ve hızlı inaktive olan kısmı (I_{to} ; geçici dışarı doğrultucu) incelendiğinde (Yaşlı: $14,3 \pm 1,2$ pA/pF, $n=16$; Yetişkin: $23,6 \pm 2,2$ pA/pF, $n=15$; MitoT: $20,4 \pm 1,2$ pA/pF, $n=7$) yaşlanmada bu akımların %60 azaldığı antioksidan uygulamasının ise, bu azalmayı %70 oranında düzelttiği gözlenmiştir. I_{to} kanalının alt üniteleri incelendiğinde hızlı alt birimlerinin (Kv4.2 ve 4.3) yaşlanmada azaldığı, antioksidan uygulamasının ise sadece Kv4.3 mRNA seviyesini arttırdığı tespit edilmiştir. Yavaş alt biriminin (Kv1.4) mRNA ifadesinde ise yetişkinlere oranla yaşlanmada (Yaşlı: $3,40 \pm 0,57$, $n=5$, Yetişkin: $1,00 \pm 0,24$, $n=5$) anlamlı düzeyde arttığı gözlenmiştir. MitoTEMPO uygulamasıyla Kv1.4. alt birime ait mRNA ifadesinin azaldığı ($0,70 \pm 0,18$, $n=5$) gözlenmiştir. (Şekil 3.10.D).

Öte yandan, APS'nin %90'nına karşılık gelen ve dinlenim membran potansiyelinin tesis edilmesinde katkısı olan içeri doğrultucu kararlı akımlar (I_{K1}) incelendiğinde (Yetişkin; $-8,7 \pm 1,5$ pA/pF, $n=15$; Yaşlı: $-9,5 \pm 1,2$ pA/pF, $n=16$; MitoT: $9,8 \pm 2,3$ pA/pF, $n=7$) gruplar arasında herhangi bir değişimin olmadığı görülmüştür.

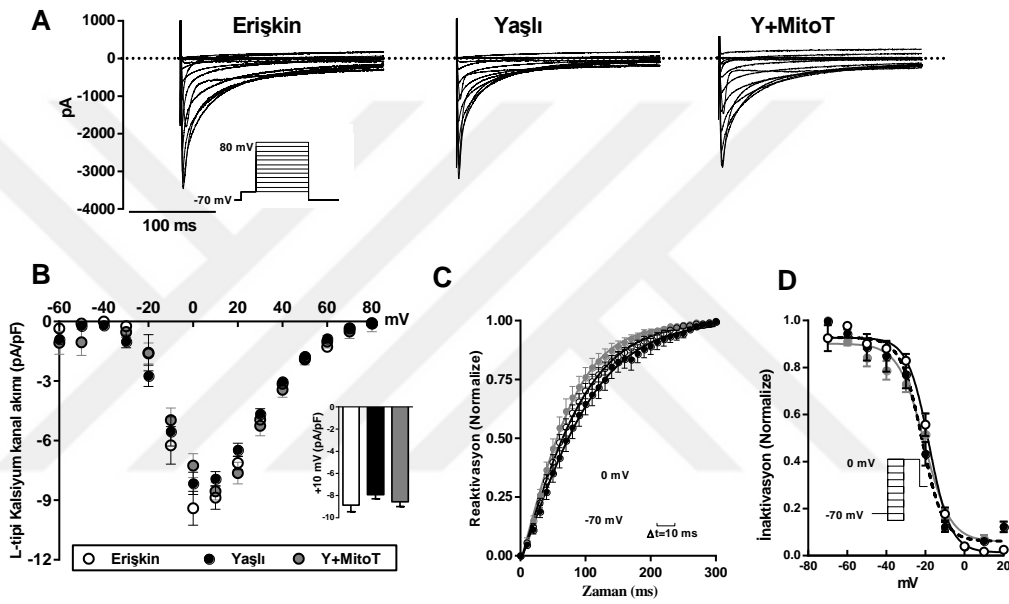


Şekil 3.11. Voltaj-kapılı K^+ -kanal akımlarının değerlendirilmesi

(A) Gruplara ait K^+ -kanal akımları ve uygulanan protokol gösterilmiştir. (B) 20 farklı voltaj basamağı uygulanarak elde edilen K^+ -kanalına ait akım-voltaj karakteristiği (I-V) ve (C) -120 mV (maksimum içeri doğru) ve +70 mV (maksimum dışarı doğru) potansiyelde elde edilen maksimum yanıtlar gösterilmektedir. (D) I_{to} kanalına ait alt birimlere (Kv4.2: hızlı, Kv4.3: hızlı ve Kv1.4: yavaş) ait mRNA seviyeleri verilmiştir. Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. * $P < 0,05$ yetişkin gruba göre, # $p < 0,05$ yaşlı gruba göre.

3.6.5. Voltaj-kapılı L-tipi Ca^{+2} -kanalları ve MitoTEMPO Uygulamasının Etkileri

L-tipi Ca^{+2} -kanalları AP'nin şeklini etkilemenin yanında SR membranında bulunan RyR2 reseptörlerinden sitozole Ca^{+2} salınımını tetikleyerek uyarılma-kasılma çiftlenimini düzenleyen temel mekanizmaların başında yer almaktadır. Şekil 3.12'de gruplara ait orijinal akım desenleri ve uygulanan akım protokolü yer almaktadır.



Şekil.3.12. Voltaj-kapılı L-tip Ca^{+2} -kanal akımlarının değerlendirilmesi.

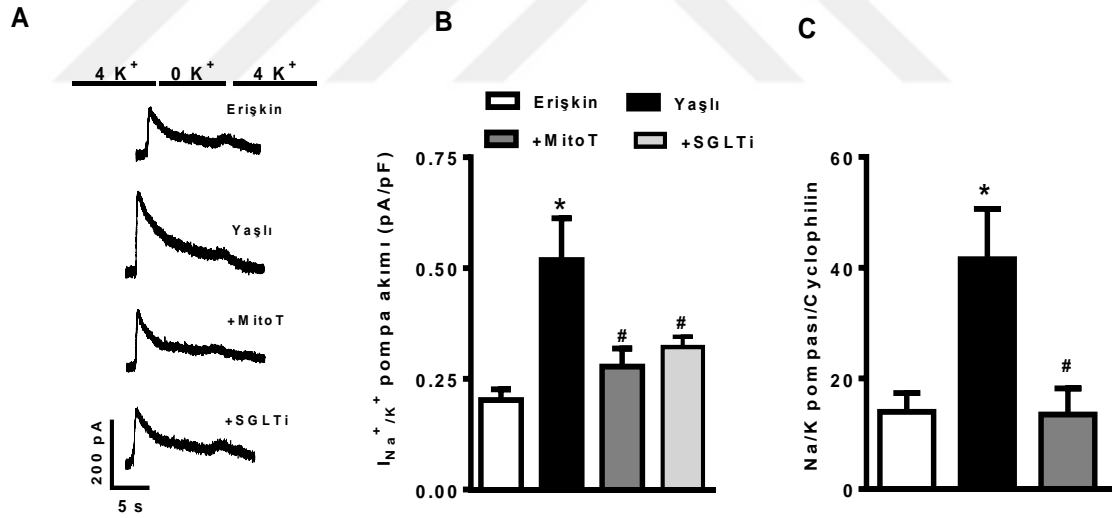
A) Gruplara ait Ca^{+2} -kanal akımları ve uygulanan protokol gösterilmiştir. B) 15 farklı voltaj basamağı uygulanarak elde edilen Ca^{+2} -kanalına ait akım-voltaj karakteristiği ve +10 mV potansiyelde elde edilen maksimum yanıtlar (inset), C) zamana bağlı reaktivasyon ve D) potansiyele bağlı inaktivasyon gösterilmektedir. Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir.

Bu Ca^{+2} -kanalına ait akım-voltaj karakteristiğine bakıldığında antioksidan uygulamasının yaşlanmada değişmemiş akımlara (Örneğin +10 mV için; Yaşlı: $-7,9\pm 0,4$ pA/pF, n=13; Yetişkin: $-8,9\pm 0,9$ pA/pF, n=13; +MitoT: $-8,6\pm 0,4$ pA/pF, n=7) etkisinin olmadığı görülmüştür. Şekil 3.12.D'de potansiyele bağlı inaktivasyon parametrelerinin yaşlanmada değişmediği (Yaşlı $v_{m/2}$: $-19,4\pm 3,2$ mV, n=6; Yetişkin $v_{m/2}$: $-22,3\pm 4,1$ mV, n=11; +MitoT $v_{m/2}$: $-21,8\pm 4,0$ mV, n=5) MitoTEMPO uygulamasının da herhangi bir etkisinin olmadığı benzer şekilde zamansal parametreyi

temsil eden tau (τ) zaman sabitinin de (Yetişkin τ : 80 ± 15 ms, n=11; Yaşlı τ : 101 ± 12 ms, n=11; +Mito τ : 93 ± 10 ms, n=5) gruplar arasında değişmediği görülmüştür.

3.6.6. Yaşlanmanın Hücre içi Na^+ -Homeostazından Sorumlu Parametreler Üzerine Etkileri

Na^+/K^+ -pompa kardiyomiyositlerde Na^+ ve K^+ iyonlarına ait iyon-gradyent devamlılığını sürdürerek AP oluşumunun sürekliliğini sağlamaktadır. Şekil 3.13.A'da iyon-gradyent değişimi sonrası elde edilen gruplara ait akım desenleri yer almaktadır. Yaşlanma sürecinde Na^+/K^+ -pompa akımlarında 2,5 kat artış (Yaşlı: $0,51 \pm 0,12$ pA/pF, n=9, ve Yetişkin: $0,20 \pm 0,05$ pA/pF, n=11) görülmüştür. MitoTEMPO ile inkübe edilen yaşlı kardiyomiyositlerde Na^+/K^+ -pompa akımının kontrol değerlerine döndüğü (+MitoT: $0,27 \pm 0,09$ pA/pF, n=6) görülmüştür.



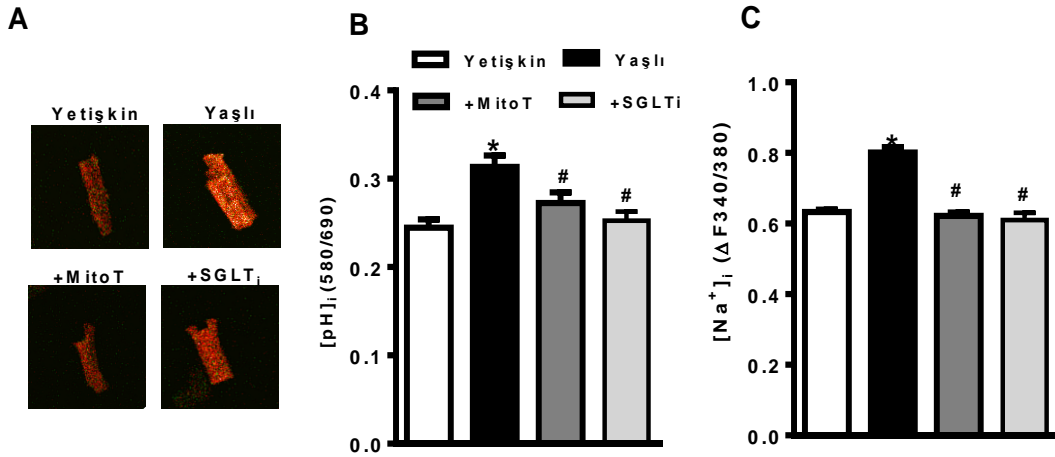
Şekil.3.13. Yaşlanma sürecinde Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesinin incelenmesi.

A) Hücre dışı solüsyondan 15 dakika boyunca 0 K^+ uzaklaştırılmış ardından tekrar 4 K^+ durumuna geçilerek Na^+/K^+ -pompa akımları desenleri elde edilmiştir. B) gruplara ait Na^+/K^+ -pompa akım genlik değerleri ve C) mRNA ifadesi verilmiştir. SGLTi: Sodyum glukoz ko-transporter2 inhibitörü. Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. * $P < 0,05$ yetişkin gruba göre, # $p < 0,05$ yaşlı gruba göre.

Bunlara ek olarak bu düzelmenin SGLT_i ile benzer şekilde olduğu gözlenmiştir (+SGLT_i: 0,32±0,04pA/pF, n=5). Bunlara paralel olarak Na⁺/K⁺-pomпасının mRNAseviyesinin yaşlanmada arttığı (Yaşlı: 41,51±9,10, n=4, ve Yetişkin: 13,94±3,39, n=4) ve MitoTEMPO inkubasyonunun bu değerleri azalttığı (13,45±4,74, n=4) gözlenmiştir (Şekil 3.13.C).

3.6.7. Yaşlı Sıçan Kardiyomiyositlerinde Hücre içi H⁺ ve Na⁺ Değişiminin İncelenmesi

Kalp kasılması, kalp hücrelerinin elektriksel olarak uyarılması ile başlar. Depolarizasyon dalgası ventrikül hücrelerine ulaştığı zaman voltaj-bağımlı Na⁺-kanalları açılır ve hücre içine Na⁺ girer. Şekil 3.14.C' de gruplara ait dinlenme durumunda bazal serbest Na⁺ seviyesi floresans şiddeti olarak ([Na⁺]_i) gösterilmiştir. Yaşlanmada [Na⁺]_i miktarında önemli bir artış görülürken (Yaşlı: 0,80±0,08, n=25; Yetişkin: 0,63±0,02, n=34; ve +MitoT: 0,62±0,05, n=34) antioksidan uygulamasının [Na⁺]_i değerlerini düzelttiği gözlenmiştir. Ayrıca, [Na⁺]_i değişimine, SGLT_i etkisi incelendiğinde, MitoTEMPO uygulamasına benzer şekilde etkili olduğu gözlenmiştir (+SGLT_i: 0,61±0,07, n=18).



Şekil 3.14. Yaşlanmada [pH]_i ve [Na⁺]_i düzeyinin incelenmesi.

A) Hücre içi H⁺ konsantrasyonuna duyarlı floresan bir boya olan Snarf-1 ile yüklenmiş hücrelere ait örnek resimler gösterilmektedir B) Antioksidan uygulaması ve SGLT2 inhibisyonunun [pH]_i ve C) bazal [Na⁺]_i düzeylerine etkisi gösterilmektedir. Veriler ortalama±SEM olarak verilmiştir. *P<0,05 yetişkin gruba göre, #p<0,05 yaşlı gruba göre.

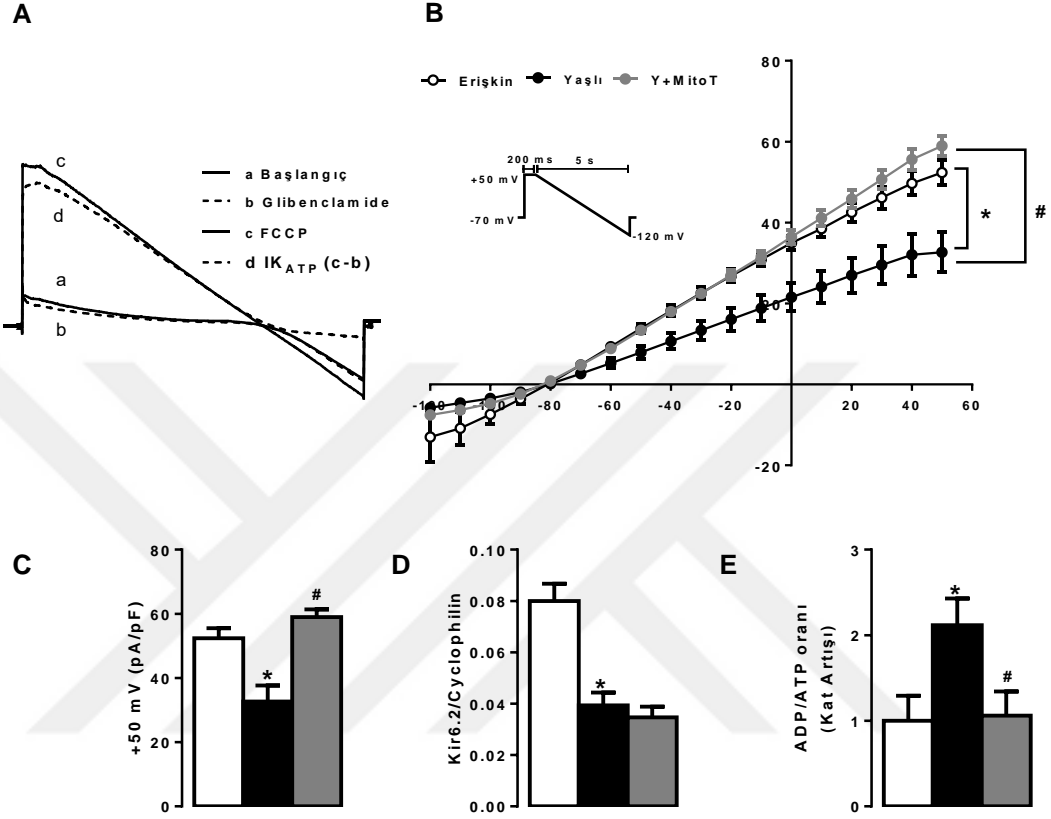
Yaşlanmada $[pH]_i$ değişimi de incelenmiştir. Yetişkin ve yaşlı kalplerden izole edilen kardiyomiyositler $[pH]_i$ 'ye duyarlı floresan bir boya olan Snarf-1 ile yüklendikten sonra He/Ne lazerle uyarılıp gruplar arasında $[pH]_i$ değişimi incelenmiştir. Şekil 3.14.A'da gruplara ait örnek hücre resimleri verilmiştir. Yaşlı hücrelerde ölçülen değerler ($0,33 \pm 0,01$, $n=29$) yetişkinliklerle kıyaslandığında ($0,24 \pm 0,01$, $n=27$) $[pH]_i$ değerlerinin asidik değerlere kaydığı görülmektedir. Gerek antioksidan uygulaması ($0,27 \pm 0,01$, $n=17$) gerekse SGLT2 inhibisyonunun ($0,25 \pm 0,01$, $n=16$) $[pH]_i$ değerlerini anlamlı derecede düzelttiği gözlenmiştir (Şekil 3.14.B). Bu bulgular $[pH]_i$ düzenlenmesinde redoks dengesi kadar kalpte ifadesi yeni belirlenen SGLT2 aktivitesinin de önemli katkıları olduğunu göstermektedir.

3.6.8. Yaşlanmada Hücresel Düzeydeki Enerjitik Süreçler ve ATP-duyarlı K^+ -Kanal Akımlarının (I_{KATP}) İncelenmesi

Hücre içi ATP miktarı fizyolojik aralıktayken, ATP'ye duyarlı K^+ -kanallarının (I_{KATP}) kapalı olduğunu, buna karşın hücre içi ATP konsantrasyonu fizyolojik değerlerinin altına düşmesi durumunda bu kanalların aktive olduğu daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir. Mitokondri fonksiyonlarında bozulmalar sitozolik ATP miktarında ve üretiminde doğrudan ilişkilidir ve ADP:ATP oranının değişebilmesine dolayısıyla ATP'ye duyarlı K^+ -kanallarının açılmasına yol açabilmektedir. Yaşlanma sürecinde I_{KATP} kanal akımları incelenerek hücresel ve organ düzeyinde gözlenen elektriksel aktiviteye bir katkısının olup olmayacağı test edilmiştir. Şekil 3.15 de ADP:ATP oranı ve I_{KATP} değişimi gösterilmektedir.

ADP:ATP oranının yaşlanmada 2 kat arttığı (Yaşlı: $2,11 \pm 0,31$, $n=4$, Yetişkin: $1,00 \pm 0,29$, $n=4$) mitokondri hedefli antioksidan uygulamasının ise bu oranı düzelttiği ($1,05 \pm 0,28$, $n=4$) gözlenmiştir (Şekil 3.15.E). I_{KATP} değişimi değerlendirildiğinde yaşlanmada bu kanal akımlarının azaldığı (Yaşlı: $32,16 \pm 4,97$ pA/pF, $n=7$; Yetişkin $52,3 \pm 3,12$ pA/pF, $n=7$; ve +MitoT: $59,1 \pm 1,98$ pA/pF, $n=7$) ve antioksidan uygulamasının bu azalmayı normal değerlere kadar arttırdığı görülmüştür.

K_{ATP} kanalının mRNA ifadesine bakıldığında yaşlanmada %50 azalma görülmüş buna karşın MitoTEMPO uygulamasının herhangi etkisi olmamıştır (Şekil 3.15.D).



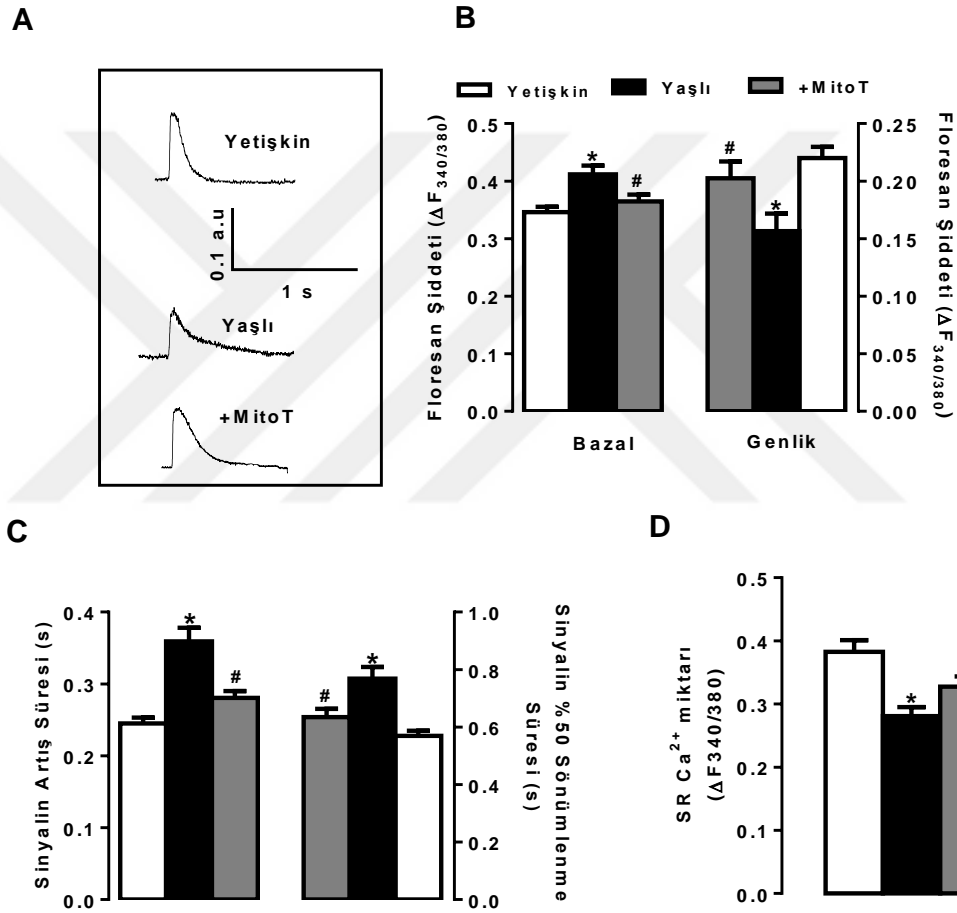
Şekil 3.15. Yetişkin ve yaşlı sıçan kalbinden izole edilmiş hücrelerde $I_{K_{ATP}}$ kanal akım yoğunluğunun değerlendirilmesi.

(A) K_{ATP} kanal akımı için kullanılan protokol gösterilmektedir. FCCP yanıtının glibenklamid yanıtından çıkarılmasıyla $I_{K_{ATP}}$ kanal akımı elde edilmiştir. (B) Antioksidan uygulamasının yaşlı hücrelerdeki $I_{K_{ATP}}$ kanalına ait I-V karakteristiğine etkisi, (C) gruplara ait +50 mV potansiyeldeki $I_{K_{ATP}}$ kanal akım yoğunluğu, (D) Kir6.2 mRNA ifadesi ve (E) ADP/ATP oranı gösterilmiştir. Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. *P<0,05 yetişkin gruba göre, #p<0,05 yaşlı gruba göre.

3.6.9. Yaşlı Sıçan Kardiyomiyositlerinde Hücre içi Global Ca^{+2} Değişimleri (Tranzient) ve MitoTEMPO Uygulamasının Etkilerinin İncelenmesi

Kalp kasında kasılma ve gevşeme hücre içi Ca^{+2} miktarındaki ($[Ca^{+2}]_i$) değişimlerle gerçekleşmektedir. Depolarizasyonla birlikte L-tipi Ca^{+2} -kanallarından

hücre içine Ca^{+2} girer ve SR üzerindeki RyR2 reseptörlerini uyarı global $[Ca^{+2}]_i$ artışına yol açar. Global $[Ca^{+2}]_i$ artışı kasılma proteinlerine bağlanarak kasılma işlemi gerçekleşir. Yaşlanmada gözlediğimiz mekanik ve elektriksel fonksiyon bozukluğunda sitozolik $[Ca^{+2}]_i$ rolünü araştırmak amacıyla izole kardiyomiyositlerde elektriksel uyarı altında hücre içi global geçici $[Ca^{+2}]_i$ değişimleri incelenmiştir. Şekil 3.16'da Fura-2 AM ile boyanmış hücrelerden kaydedilen örnek $[Ca^{+2}]_i$ tranziyentleri ve floresans desenlerine ait parametreler görülmektedir.



Şekil 3.16. Yaşlı kardiyomiyositlerde hücre içi global $[Ca^{+2}]_i$ değişimleri ve MitoTEMPO'nun olası etkilerinin değerlendirilmesi.

A) Gruplara ait kaydedilen $[Ca^{+2}]_i$ tranziyent desenleri, B) Fura-2 AM ile yüklenmiş hücrelerde dinlenme durumundaki sitozolik $[Ca^{+2}]_i$ seviyesi (solda) ve alan uyarısı altında ölçülen maksimum genlik değerleri (sağda) görülmektedir. C) Floresan sinyalin artış hızı (solda) ve sinyalin %50 sönümlenme süresi ve D) 10 mM kafein ile alınan gruplara ait SR Ca^{+2} miktarları verilmiştir. Veriler Ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. SR: Sarkoplazmik retikulum, * $p < 0,05$ Yetişkin gruba göre, # $p < 0,05$ Yaşlı gruba göre.

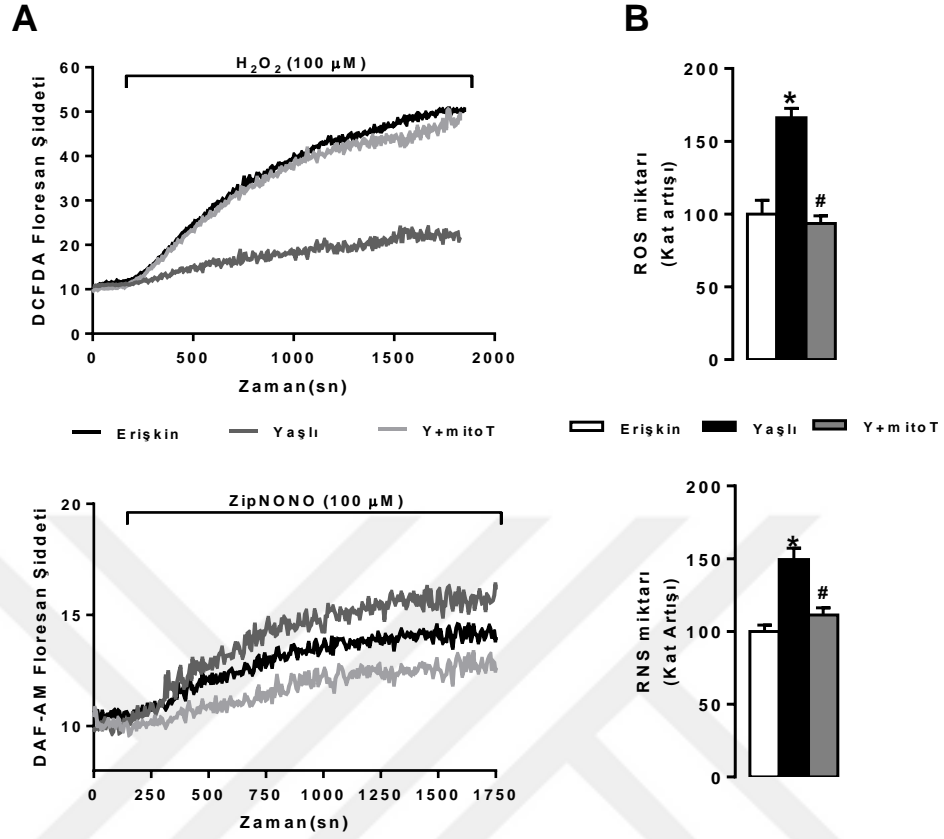
Kardiyomiyositlerin dinlenme durumu değerlendirildiğinde yaşlanmada $[Ca^{+2}]_i$ seviyesinin yetişkin grubuna göre arttığı (Yaşlı: $0,41\pm0,04$, $n=14$ ve Yetişkin: $0,34\pm0,01$ $n=24$, Yaşlı: $0,41\pm0,04$, $n=14$) antioksidan ile inkübe edilen yaşlı hücrelerde bu değer anlamlı düzeyde azaldığı (+MitoT: $0,35\pm0,03$, $n=13$) gözlenmiştir (Şekil3.16.B).

AP'yi mimik eden elektrik alan uyarısı gözlenen genlik değerlerinde yaşlanmada azalmış olan maksimum genlik değerlerinin antioksidan uygulamasıyla (Yaşlı: $0,14\pm0,04$, $n=14$; Yetişkin: $0,22\pm0,02$ $n=24$; +MitoT: $0,20\pm0,02$, $n=13$) normale döndüğü saptanmıştır. Floresan sinyalin zaman desenleri incelendiğinde sinyalin tepe noktasına ulaşma sürelerinde yaşlanmada kontrole göre anlamlı uzama tespit edilmiş, MitoTEMPO uygulamasının bu süreci anlamlı düzeyde kısalttığı (Yaşlı: $0,35\pm0,05$ s, $n=14$; Yetişkin: $0,24\pm0,01$ s $n=24$; +MitoT: $0,28\pm0,03$, $n=13$), sinyalin sönümlenmesinde yaşlanmada görülen uzamanın (Yaşlı: $0,76\pm0,05$ s, $n=14$; Yetişkin: $0,56\pm0,01$ s $n=24$; +MitoT: $0,63\pm0,03$ s, $n=13$) benzer şekilde antioksidan inkubasyonu anlamlı düzeyde kısalttığı gözlenmiştir.

Şekil 3.16.D'de kafein ile (10 mM) salınan ve SR Ca^{+2} miktarını gösteren ölçümler de yapılmıştır. Kafein ile oluşan genlik yanıtları incelendiğinde yaşlanmada ($0,28\pm0,01$, $n=17$) yetişkinlere kıyasla ($0,38\pm0,02$, $n=25$) genlik değerlerinin azaldığı ve MitoTEMPO ile inkübe edilen hücrelerde ($1\mu M-3$ saat) bu değer düzeldiği tespit edilmiştir.

3.7. Yaşlı Sıçan Kardiyomiyositlerinde Ölçülen Reaktif Oksijen ve Nitrojen Türevleri ile İlgili Bulgular

Yaşlanmayla birlikte redoks sisteminde değişim/bozulmanın olup olmayacağı ve hücrel oksidan düzeyinin MitoTEMPO varlığında değişimi incelenmiştir. DCFDA ile yüklenmiş hücrelerden bazal yanıt alındıktan sonra $100\mu M H_2O_2$ verilerek hücrenin maksimum oksidan durumu gözlenmiştir.



Şekil 3.17. Hücresel düzeyde ROS ve RNS düzeyinin MitoTEMPO (MitoT) varlığında incelenmesi.

A) Oksidan ve NO duyarlı floresan boyalar olan DCFDA ve DAF ile yüklenmiş hücrelerle yapılmış ROS ve RNS ölçümlerine ait floresan şiddet traseleri gösterilmektedir. B) Yetişkin ve yaşlı sıçanlardan taze izole edilen hücrelerden ölçülmüş ROS (üstte) ve RNS (altta) miktarı gösterilmektedir. Veriler ortalama (\pm SEM) olarak verilmiştir. (n=30-29 hücre) ve *p<0,05 Yetişkin grubuna göre, #p<0,05 Yaşlı grubuna göre.

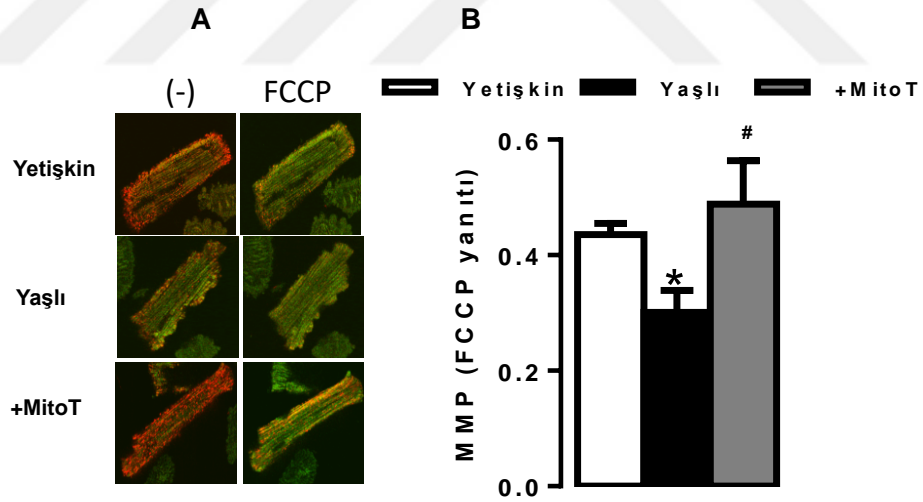
Şekil 3.17.B (üstte)'da gösterildiği gibi yaşlanmada ROS seviyesinin 2 kat arttığı (Yaşlı: $166,12 \pm 6,51$, n=30, Yetişkin: 100 ± 9) antioksidan uygulamasının ROS miktarını anlamlı düzeyde azalttığı (+MitoT: $93,51 \pm 5,17$, n=14) gözlenmiştir. Bu veriler sistemik olarak artmış oksidatif stresin hücresel düzeyde de oluştuğunu MitoTEMPO'nun bu değişimi düzelttiğini göstermektedir.

Hücrelerde reaktif nitrojen türlerinin seviyesi de değerlendirilmiştir. Hücreler RNS türevlerine spesifik bir boya olan DAF-AM ile yüklendikten sonra konfokal görüntüleme yapılmıştır. Hücrelerden bazal yanıt alındıktan sonra spesifik bir NO

donörü olan ZipNONO (100 μ M) verilerek maksimum durum gözlenmiştir. Yaşlanmada RNS seviyesinin 2 kat arttığı (Yaşlı: $149,37 \pm 7,85$, $n=17$, Yetişkin: $100 \pm 4,35$, $n=24$) bu artışın antioksidan uygulamasıyla normale döndüğü ($111,02 \pm 4,98$, $n=12$) görülmüştür (Şekil 3.16.B, *altta*). Bu bulgular MitoTEMPO'un kalp sistemde güçlü bir antioksidan olabilme potansiyelini göstermektedir.

3.8. Yaşlı Sıçan Kardiyomiyositlerinde Mitokondri Membran Potansiyelinin İncelenmesi

Yaşlanmada mitokondriyal fonksiyonları değerlendirebilmek ve mitokondri hedefli antioksidan olan MitoT'nun etkisini test etmek amacıyla mitokondriyal membran potansiyeli ölçümü yapılmıştır. Bu ölçüm için yetişkin ve yaşlı sıçanlardan taze izole edilen hücreler 3 μ M JC-1 boyasıyla inkübe edilmiştir. Aynı yanıtlar önceden MitoT ile inkübe edilmiş (1 μ M ve 3 saat) hücrelerle tekrarlanmıştır.



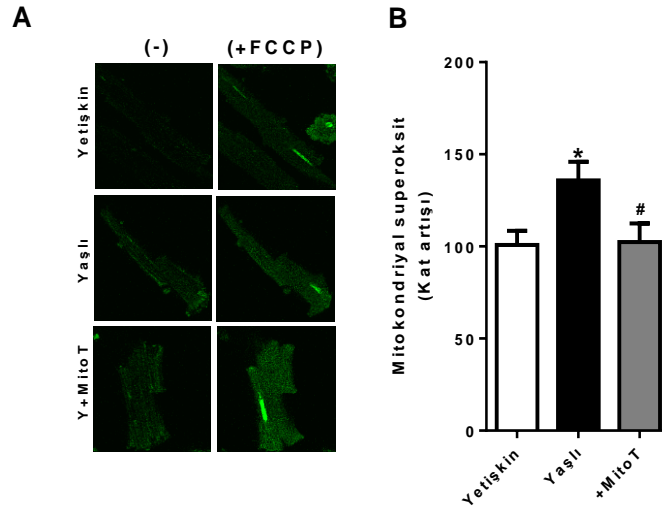
Şekil 3.18. Yaşlı Sıçan kardiyomiyositlerinde mitokondri membran potansiyelinin değerlendirilmesi.

(A) Konfokal mikroskopta JC-1 boyası ile yüklenmiş hücrelerde MMP ölçümünden alınan örnek resimler. (B) Yaşlı sıçan kardiyomiyositlerinde antioksidan uygulamasının MMP değişimine olan etkisi gösterilmektedir. Veriler Ortalama \pm SEM olarak verilmiştir, * $p<0,05$ yetişkin gruba göre, # $p<0,05$ yaşlı gruba göre.

Hücrelerden bazal yanıt alındıktan sonra 1 μ M FCCP verilerek mitokondri membran potansiyelinin depolarizasyon miktarı gözlenmiştir (Şekil 3.18). Yaşlanmayla birlikte MMP'nin depolarize olduğu (Yaşlı: 0,30 \pm 0,03, n=22; Yetişkin: 0,43 \pm 0,01, n=33; ve MitoT: 0,48 \pm 0,02, n=15) antioksidan uygulamasının mitokondri membran potansiyelini düzelttiği gözlenmiştir.

3.9. Yaşlı Sıçan Kardiyomiyositlerinde Mitokondrial Oksidasyonun İncelenmesi

Bu grup çalışmamızda mitokondriyal süperoksit ölçümü yapılmıştır. Bu ölçümler için yetişkin ve yaşlı sıçan kalplerinden izole edilen hücreler mitokondriyal süperoksite duyarlı floresan boya (MitoSOX Red) yardımıyla ölçülmüştür. Şekil 3.19'te gruplara ait örnek resimler ve mitokondriyal süperoksit miktarı görülmektedir. Yaşlı hücrelerin mitokondrialarında (135 \pm 8,9, n=10) erişkin hücrelere göre (100 \pm 4,52, n=7) mitokondriyal süperoksit miktarının arttığı mitokondri hedefli antioksidan uygulamasının süperoksit düzeyini anlamlı düzeyde azalttığı (102 \pm 10,03, n=7) gözlenmiştir (Şekil 3.19.B).

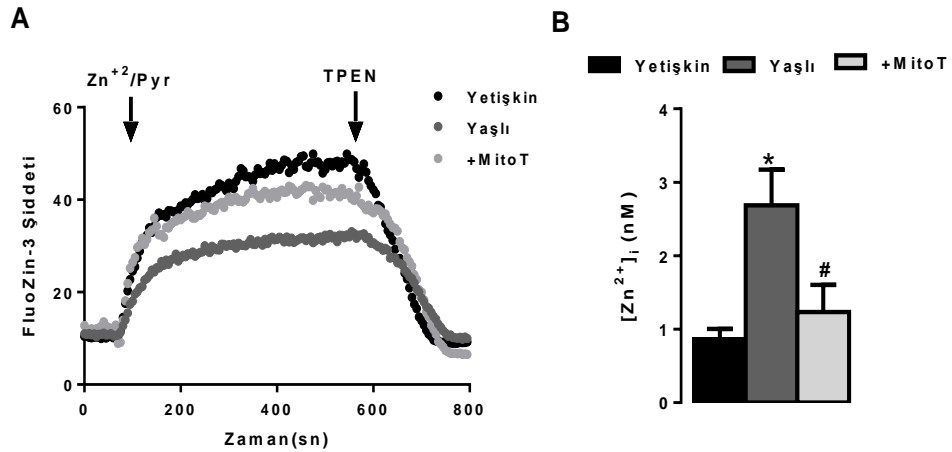


Şekil 3.19. Yaşlı Sıçan kardiyomiyositlerinde mitokondriyal süperoksit düzeyinin incelenmesi.

(A) MitoSOX Red boyası ile yüklenmiş hücrelere FCCP verilip kalibre edilmiş süperoksit ölçümüne ait örnek hücre resimleri. (B) Yaşlı sıçan kardiyomiyositlerine ait mitokondriyal süperoksit düzeyine antioksidan uygulamasının mitokondriyal süperoksit değişimine olan etkisi gösterilmektedir. Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. *P<0,05 yetişkin gruba göre, #p <0,05 yaşlı gruba göre.

3.10. Yaşlı Sıçan Kardiyomiyositlerinde Hücre İçi Zn^{+2} Değişimi ile İlgili Bulgular

Fizyolojik koşullarda kardiyomiyositlerde hücre içi serbest $[Ca^{+2}]_i$ ile karşılaştırıldığında, ($[Zn^{+2}]_i$) 100 kat daha düşük olduğu bilinmektedir (Turan ve ark., 1997). Ancak, bu miktarın diyabette %70, aldostronizmde %200'den daha fazla olduğu gösterilmiştir (Tuncay ve ark., 2017). Güncel çalışmalar, kardiyomiyositlerde artan $[Zn^{+2}]_i$ miktarının AP süresini uzattığını ve aritmilere yol açtığını göstermiştir (Degirmenci ve ark., 2018). Yaşlanmayla birlikte hücre içi iyon değişiminin global kasılma kuvvetine ve hücre içi diğer mekanizmalara nasıl aracılık ettiğini anlamak amacıyla taze izole edilen hücrelerden $[Zn^{+2}]_i$ değişimleri gözlenmiştir. $[Zn^{+2}]_i$ değerinin iyi belirlenmesi için hücreler, Zn^{+2} 'a afinitesi yüksek ($K_d= 15nM$) bir boya olan FluoZin3-AM boyası ile yüklendikten sonra konfokal mikroskobunda ölçümler yapılmıştır. Yaşlanmayla birlikte $[Zn^{+2}]_i$ değişiminin yaklaşık olarak 3,5 kat arttığı gözlenmiştir (Yaşlı: $2,68\pm 1,06$ nM, $n=22$, Yetişkin: $0,86\pm 0,15$ nM, $n=23$). Antioksidan uygulamasının $[Zn^{+2}]_i$ seviyesini azalttığı ($1,23\pm 0,30$ nM, $n=17$) gözlenmiştir (Şekil 3.20).



Şeki 3.20. Yaşlı sıçan kardiyomiyositlerinde $[Zn^{+2}]_i$ miktarının incelenmesi.

(A)FluoZinc-3 ile inkübe edilmiş hücrelerden elde edilmiş floresan şiddet traseleri. Bazal kayıt aldıktan sonra, sırasıyla bir Zn^{+2} iyonoforu olan 1-Hidroksypyridine-2-thione zinc salt (ZnPT; $10 \mu M$) verilerek maksimum sinyal (F_{max}), en son olarak ise Zn^{+2} tutucusu olan Tetrakis-(2-Pyridylmethyl)ethylenediamine (TPEN; $50 \mu M$) verilerek minimum sinyal şiddeti elde edilmiştir. (B) Antioksidan uygulamasının yaşlı hücrelerde $[Zn^{+2}]_i$ düzeylerine etkisi. Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. * $P<0,05$ Yetişkin grubuna göre, # $p<0,05$ yaşlı grubuna göre.

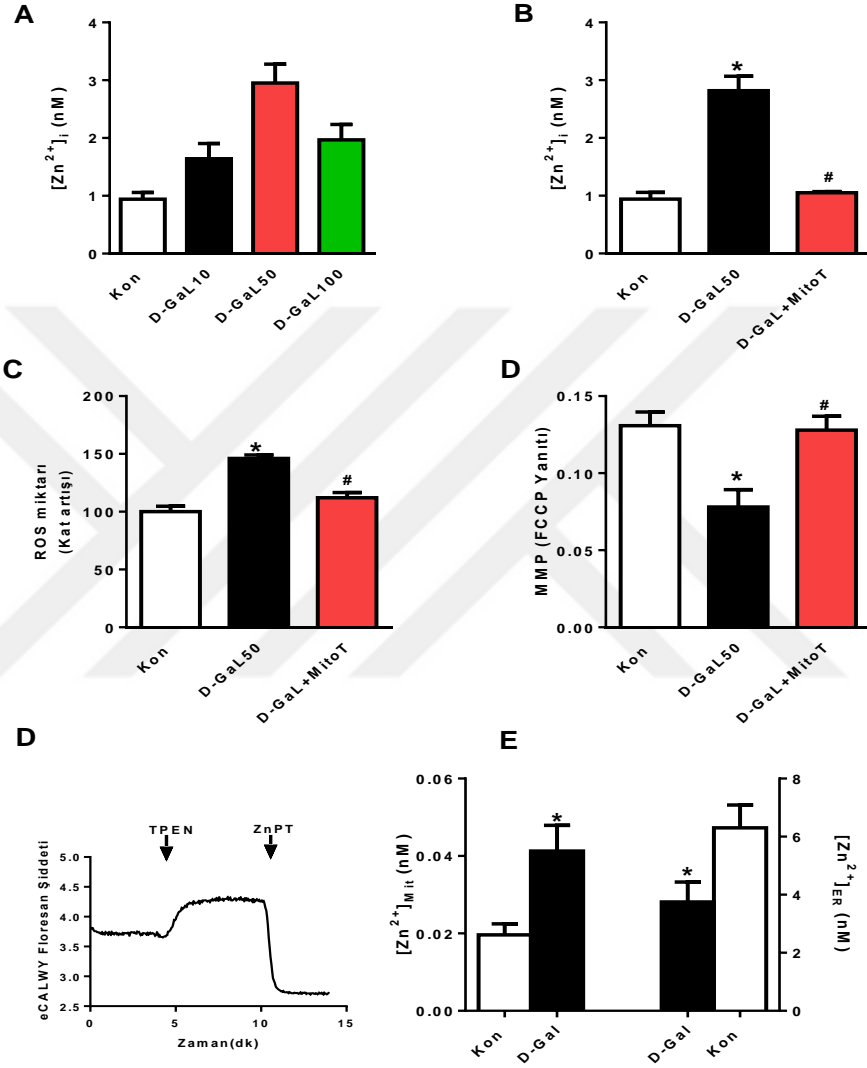
3.11. Sıçan Ventrikül Hücre Hattı H9C2'lerde Yaşlanma Modelinin Oluşturulması ve Organel Seviyesinde $[Zn^{+2}]$ Değişimleri

Güncel çalışmalar $[Zn^{+2}]_i$ artışının mitokondri ince yapısını bozduğunu, endoplazmik retikulumda değişen Zn^{+2} seviyesinin $[Zn^{+2}]_{SER}$ ER strese yol açtığı gösterilmiştir (Tuncay ve ark., 2017). Organel düzeyindeki $[Zn^{+2}]_x$ ölçümleri için embriyonik sıçan ventrikül hücrelerinden türetilen H9C2 hücre hattında D-Galaktoz (D-Gal) ile yaşlanma modeli oluşturulduktan sonra, genetik olarak kodlanmış Zn^{+2} -duyarlı metal bağlayıcı bölgeler içeren FRET özelliğine sahip eCALWY sensörleri kullanılmıştır (Vinkenborg ve ark., 2009).

H9c2 hücre hattında yaşlanma modeli için farklı konsantrasyonlarda D-Gal (10, 40, 50 ve 100 mg/L ve 48 saat inkübasyon) uygulanarak $[Zn^{+2}]_i$ değişimi, ROS ve MMP ölçümleri yapılarak incelenmiş ve sonuçlarımız taze izole edilmiş ventrikül hücrelerinin verileri ile karşılaştırılmıştır. Şekil 3.21.A'daki farklı D-Gal dozlarının $[Zn^{+2}]_i$ miktarına etkisi incelendiğinde yaşlanmada gözlenen kat artışının 48 saat 50 mg/L D-Gal inkübasyonu ile paralel olduğu (yaklaşık 3,5 kat) görülmüş artan dozların hücre ölümüne yol açtığı tespit edildiğinden bundan sonraki çalışmalarda bu konsantrasyon kullanılmıştır. 50 mg/L D-Gal ile inkübe edilmiş hücrelerde gözlenen artmış $[Zn^{+2}]_i$ seviyesininin (D-Gal: $2,81 \pm 0,21$ nM, n=22 ve Kon: $0,78 \pm 0,11$ nM, n=39) antioksidan uygulamasıyla (100 nM ve 24 saat MitoTEMPO ile inkübasyon) düzeldiği gözlenmiştir (Şekil 3.21.B). D-Gal ile inkübe edilen hücrelerde ROS miktarının %50 arttığı MMP'nin depolarize potansiyellere kaydığı görülmüştür. Antioksidan uygulamasının (100 nM ve 24 saat MitoTEMPO ile inkübasyon) ROS miktarını azalttığı, MMP değerlerini de düzelttiği gözlenmiştir. 50 mg/L D-Gal ile elde edilen bulgular yaşlanmada gözlenenlerle örtüşmekte antioksidan uygulaması da benzer şekilde etkili olmuştur.

D-Gal ile yaşlanma modeli oluşturulmuş H9C2 hücrelerinde organel düzeyinde ölçümler yapılmıştır. Mitokondri ve ER hedefli problara (Tracker) bağlı eCALWY sensörleriyle yapılan ölçümlerde $[Zn^{+2}]_{Mit}$ miktarının yaşlanmada arttığı

(D-Gal: 0,041±0,03 nM, n=13 ve Kon: 0,028±0,06 nM, n=23) buna karşın $[Zn^{+2}]_{SER}$ miktarının ise yaşlı grupta anlamlı düzeyde azaldığı (D-Gal: 6,30±0,78 nM, n=27 ve Kon: 3,74±0,68, n=15) gözlenmiştir (Şekil 3.21.C-D).

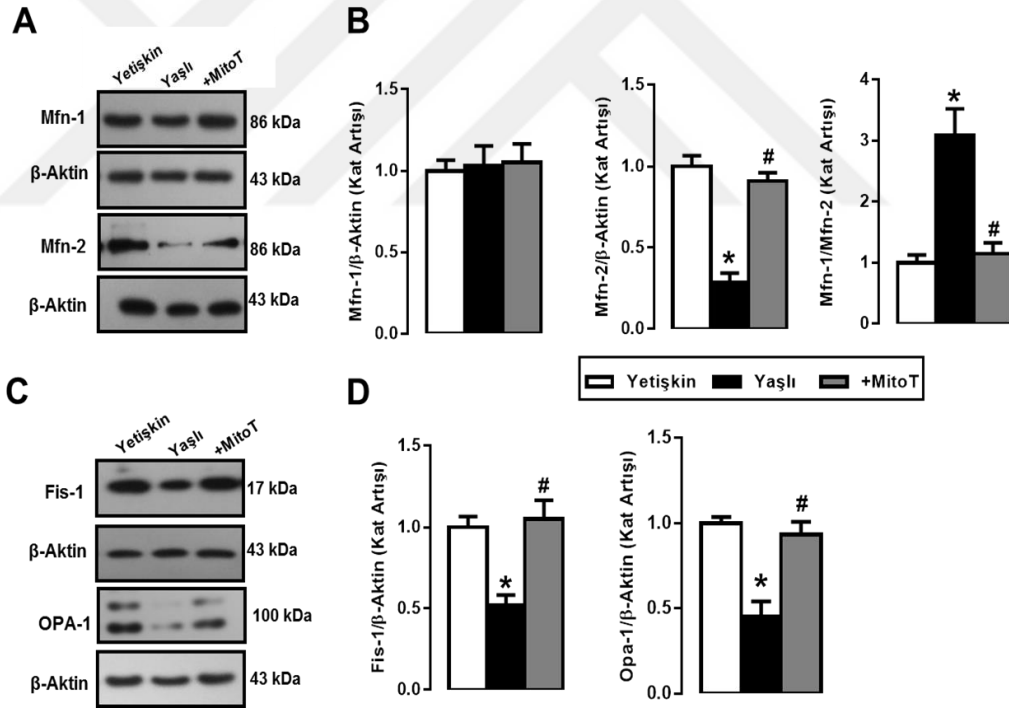


Şekil 3.21. Sıçan ventrikül hücrelerinden türetilen H9C2 hücre hattında yaşlanma modelinin doğrulanması ve organel düzeyinde Zn^{+2} miktarının incelenmesi.

A) Farklı D-Gal inkübasyonlarıyla (10, 40, 50, 100 mg/mL – 48 saat) ölçülen $[Zn^{+2}]_i$ değerleri. B) Antioksidan uygulamasının (100 nM-24 saat mitoT) 50 mg/mL D-Gal ile indüklenmiş yaşlı hücrelerde ölçülen $[Zn^{+2}]_i$ değerlerine, C) ROS miktarına ve MMP'ye etkisi gösterilmektedir. D) Mitokondri ve ER hedefli problemlara bağlı Zn^{+2} 'ye hassas eCALWY sensörüyle yapılan ölçümlere ait örnek desenler ve E) gruplara ait $[Zn^{+2}]_{ER}$ ve $[Zn^{+2}]_{Mit}$ değerleri gösterilmektedir. Veriler ortalama±SEM olarak verilmiştir. *P<0,05 kontrol grubuna göre, #p <0,05 D-Gal50 grubuna göre.

3.12. Yaşlı Sıçan Kardiyomiyositlerinde Mitokondri İnce Yapısı ve Mitokondri Fonksiyonu ile İlişkili Biyokimyasal Parametreler

Kalpте mitokondri en temel enerji üretim yeri olup dinamik bir özelliğe sahip olan bu organel ihtiyaca göre fizyolojik koşullarda enerji üretimini dengeleyebilmektedir. Her hangi bir stres durumunda veya başka patofizyolojik koşullarda mitokondride şişme ve kronik olarak depolarize durumda bulunma gibi süreçler gelişerek hücrelerde ölüme kadar uzanan bir seri olayların oluşmasına neden olmaktadır. Yaşlanmada mitokondriyal fizyolojiyi belirleyen başlıca proteinlerden olan ve biyogenezden sorumlu olan Opa-1, füzyon süreçlerini düzenleyen Mitofusion-1 (Mfn-1), Mitofusion-2 (Mfn-2) ve füzyon süreçlerinde rol oynayan Fis-1 proteinleri incelenmiştir.



Şekil 3.22. Yaşlı sıçan kardiyomiyositlerinde mitokondriyal ince yapının incelenmesi.

A) Füzyon proteinlerinden Mfn-1 ve Mfn-2'ye ait immuno-blot B) Ölçülen protein ifadeleri ve oransal değerleri (sağda) yer almaktadır. C) Fis-1 ve OPA-1 proteinlerine ait immuno-blot görüntüleri D) Fis-1 protein ifadesi ve Opa-1 protein ifadesi verilmiştir. Sonuçlar B-Aktin protein ifadesine oranlanarak hesaplanmıştır. Veriler ortalama±SEM olarak verilmiştir. *P<0,05 yetişkin grubuna göre, #p<0,05 yaşlı grubuna göre.

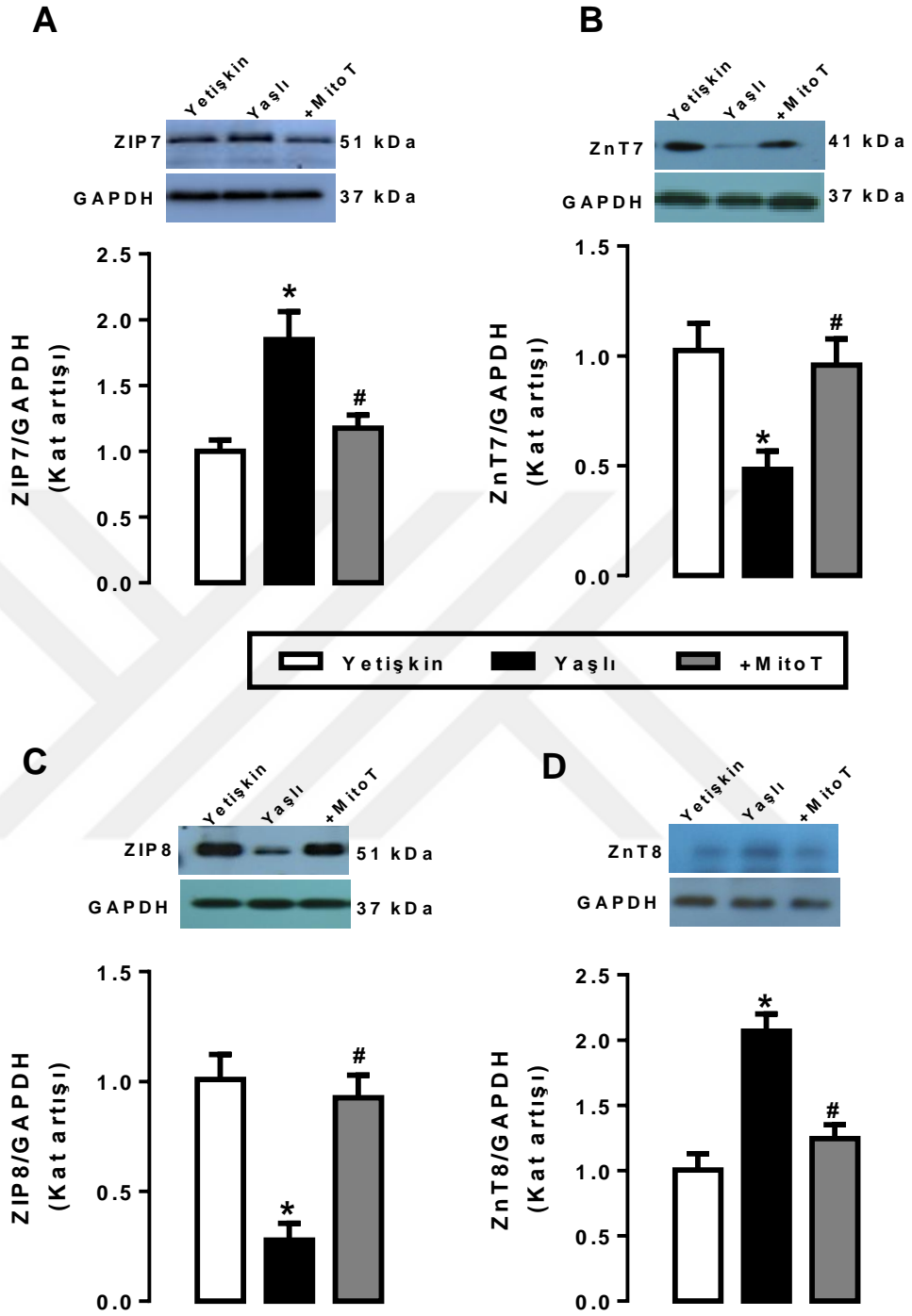
Şekil 3.22 B’de gösterilen Mfn-1 protein ifadesinde gruplar arasında anlamlı bir değişimin olmadığı ancak Mfn-2 seviyesinin yaşlanmada %70 azaldığı (Yaşlı:0,28±0,06, n=5 ve Yetişkin: 1±0,05, n=5) gözlenmiştir. Mfn-1/Mfn-2 oranının ise 3 kat arttığı gözlenmiştir. Mitokondri hedefli antioksidan uygulamasıyla (1 µM MitoTEMPO; 3 saat) Mfn-2 protein ifadesinin yaşlı gruba göre anlamlı düzeyde arttığı (0,91±0,05, n=5), buna bağlı olarak Mfn-1/Mfn-2 oranının ise düzeldiği gözlenmiştir (şekil 3.22.B). Fizyon proteinlerinden Fis-1 protein ifadesinin yaşlanmada azaldığı (Yaşlı:0,53±0,06, n=5 ve Yetişkin: 1±0,05, n=5), MitoTEMPO uygulamasının bu azalmayı düzelttiği (1,05±0,11, n=5) görülmüştür. Benzer şekilde yaşlı grupta azalmış OPA-1 ifadesinin (Yaşlı: 0,45±0,07, n=5 ve Yetişkin: 1±0,03, n=5, +MitoT: 0,93±0,07, n=5) MitoTEMPO ile arttığı gözlenmiştir (Şekil 3.22.D).

3.13. Yaşlı Sıçan Kardiyomiyositlerinde Zn⁺²- taşıyıcılarının Protein Ekspresyon Seviyeleri

Memeli beslenmesinde önemli bir mikrobesein olan Zn⁺², biyolojik sistemlerde hem tüm sistem hem de hücre düzeyinde [Zn⁺²]_i seviyesi metalloproteinler yanında, Zn⁺²-hücre içine taşıyıcılar (ZIP) ve Zn⁺²-hücre dışına taşıyıcılar (ZnT) tarafından regüle edilmektedir. Çeşitli organ fonksiyonlarında bu iyonun etkilerinin artan oksidatif stres ile ilişkili olduğu, özel olarak kalpte [Zn⁺²]_i seviyesindeki artışın, [Ca⁺²]_i seviyesine ve hücrenin redoks durumundaki değişikliklere aracılık ederek, örneğin kardiyomiyositlerde uyarılma-kasılma çiftlenimini bozduğu gösterilmiştir. Ayrıca, sistemik patolojilerde memelilerde kardiyomiyositlerde artan oksidatif strese duyarlı bir şekilde [Zn⁺²]_i seviyesinin arttığı ve bu artışa paralel olarak kalbin mekanik ve elektrik aktivitesinin bozulduğu gösterilmiştir. Çalışmamızın bu kısmında yaşlanmada artan [Zn⁺²]_i miktarının altında yatan mekanizmaların açıklanabilmesi için tüm hücre homojenatlarında ZIP7, ZnT7, ZIP8 ve ZnT8 protein seviyeleri ölçülmüştür.

Hücre içine taşıyıcıların yaşlanmada değişimine bakıldığında ZIP7 protein seviyesinin yetişkinlere kıyasla arttığı (Yaşlı; $1,84 \pm 0,21$, $n=5$ ve Yetişkin; $1 \pm 0,08$, $n=5$) ve antioksidan uygulamasının bu değişimi anlamlı düzeyde azalttığı ($1,17 \pm 0,09$, $n=5$) gözlenmiştir (Şekil 3.22A). Buna karşın ZIP8 protein seviyesi yaşlanmada anlamlı düzeyde azalmış (Yaşlı; $1 \pm 0,11$, $n=5$ ve Yetişkin; $0,27 \pm 0,07$, $n=5$) antioksidan uygulamasının bu azalmayı azalttığı ($0,92 \pm 0,10$, $n=5$) tespit edilmiştir (Şekil 3.23.C).

Hücre dışına taşıyıcıların yaşlanmada değişimi de incelenmiştir. ZnT7 protein seviyesinin yetişkinlerle ($1 \pm 0,12$, $n=5$) kıyaslandığında yaşlanmada azaldığı gözlenmiş ($0,48 \pm 0,08$, $n=5$) antioksidan uygulamasıyla bu azalmanın arttığı ($0,93 \pm 0,09$, $n=5$) gözlenmiştir (Şekil 3.23.B). Şekil 3.22.D’de görüldüğü gibi yaşlanmada 2 kat artmış (Yaşlı; $2,06 \pm 0,13$, $n=5$ ve Yetişkin; $1 \pm 0,12$, $n=5$) olan ZnT8 protein seviyesinin antioksidan uygulamasıyla azaldığı ($1,24 \pm 0,10$, $n=5$) tespit edilmiştir.

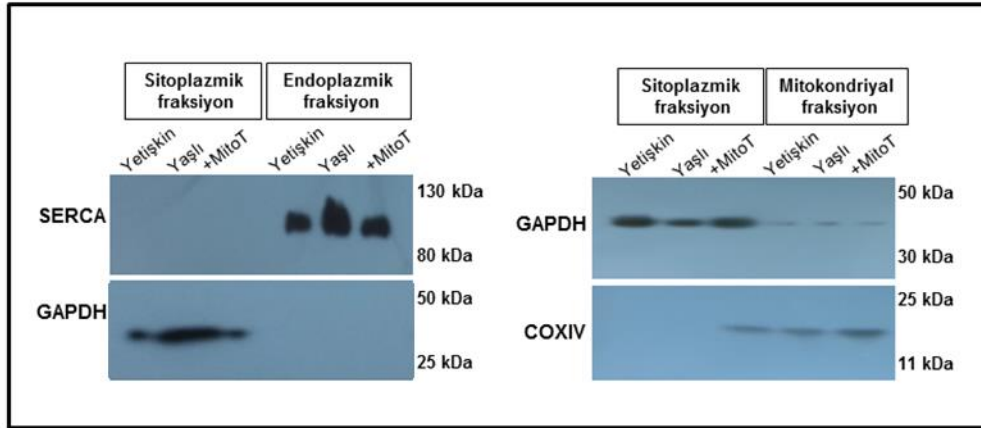


Şekil 3.23. Yaşlı Sıçan kardiyomyositlerinde Zn²⁺-taşıyıcılarının incelenmesi.

Gruplara ait immuno-blot görüntüleri (üstte) ve ölçülen protein ifadeleri (altta) yer almaktadır. A) ZIP7 protein ifadesi, B) ZnT7 protein ifadesi, C) ZIP8 protein ifadesi ve ZnT8 protein ifadesi verilmiştir. Sonuçlar GAPDH protein ifadesine oranlanarak hesaplanmıştır. Veriler ortalama±SEM olarak verilmiştir. *P<0,05 yetişkin grubuna göre, #p<0,05 yaşlı grubuna göre.

3.14. Yaşlanmaya Bağlı Olarak Kardiyomiyositlerde Zn²⁺-taşıyıcılarının Organel Düzeyinde Dağılımı

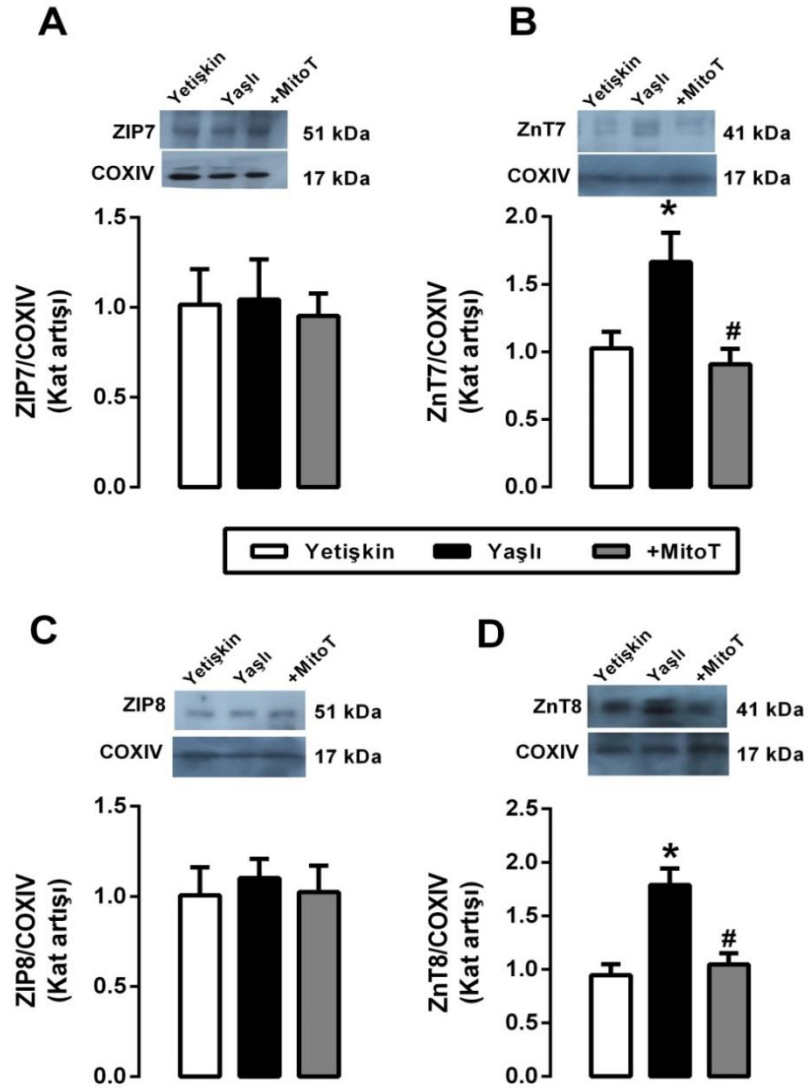
Yaşlanmada artan [Zn²⁺]_{Mit} ve azalmış [Zn²⁺]_{Mit} seviyesini detaylı olarak açıklayabilmek için kalplerden ER ve mitokondri izolasyonları yapılmıştır. Fraksiyonlara ayrılıp elde edilen ER ve mitokondri içeren lizatların doğrulanması (validasyon) için sitozolik belirteç olarak GAPDH, ER belirteci olarak Ca²⁺ taşınımından sorumlu SERCA ve mitokondri için elektron transfer sisteminde son elektron alıcısı olan COXIV kullanılmıştır. Şekil 3.23'te SR ve mitokondri validasyonunu gösteren immuno-blot görüntüleri yer almaktadır. Sitoplazmik fraksiyonlarda sadece GAPDH protein ifadesinin yer alması, ER fraksiyonunda güçlü SERCA sinyali ve mitokondriyal fraksiyonda temiz COXIV protein ifadesi ER ve mitokondri izolasyonlarının yüksek verimlilikte gerçekleştiğini göstermektedir.



Şekil 3.24. Yaşlı sıçan kalplerinde izole edilen ER ve mitokondri validasyonu. Sitoplazmik fraksiyon için GAPDH, SR fraksiyonu için SERCA ve mitokondriyal fraksiyon için COXIV kullanılmıştır.

İzole mitokondri preparatlarında mitokondri-sitozol aksında taşıma yapan Zn²⁺ taşıyıcılarından ZIP7 ve ZIP8 protein ifadesinin gruplar arasında değişmediği görülmüştür. Sitozolden-mitokondri aksından sorumlu ZnT7 protein ifadesinin yaşlanmada arttığı (Yaşlı: 1,7±0,12 n=5 ve Yetişkin:1±0,12, n=5) gözlenmiştir. Sitozolden mitokondriye Zn²⁺ taşıyan diğer bir protein olan ZnT8 protein ifadesi de yetişkin grupla (Yaşlı: 1,8±0,15 n=5 ve Yetişkin:1±0,10, n=5) kıyasla yaşlanmada

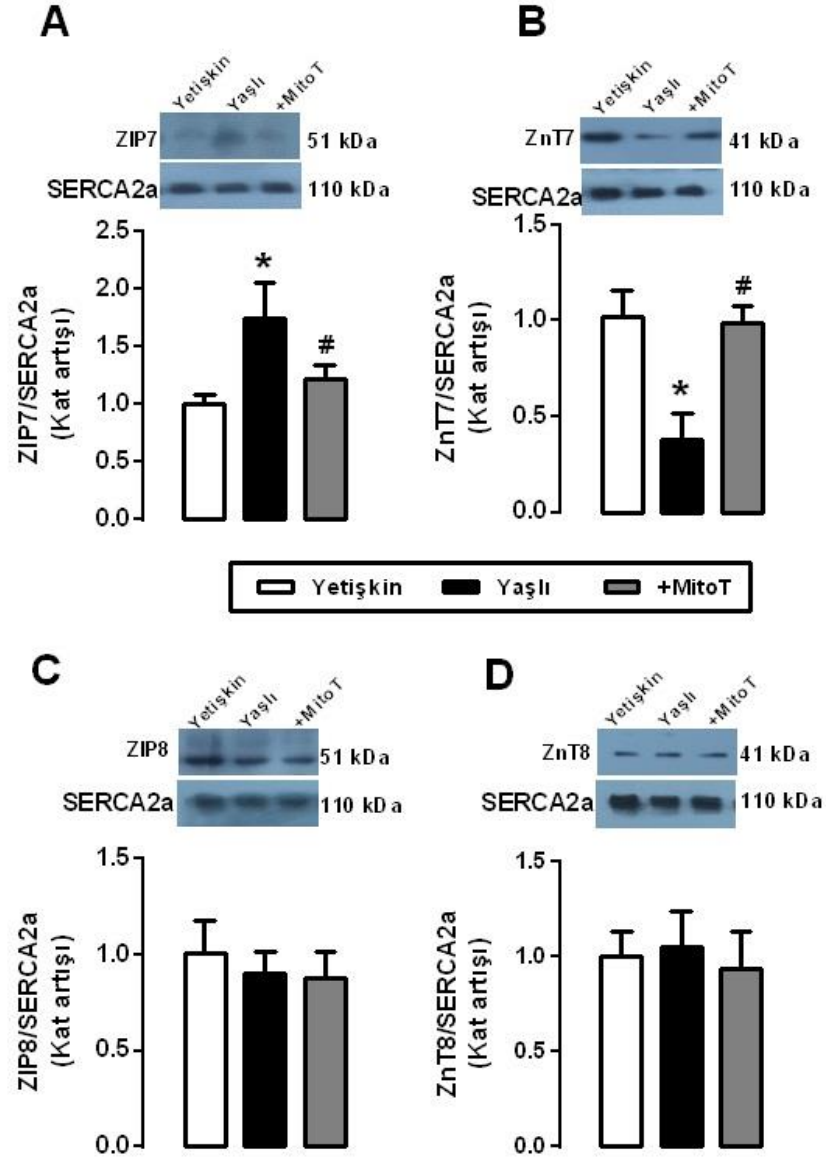
yaklaşık 2 kat artmıştır. Antioksidan uygulamasının bu proteinlerin ifade düzeylerini (ZnT7 için: $0,90 \pm 0,11$ ve ZnT8 için: $1,05 \pm 0,10$, $n=5$) anlamlı düzeyde azaltmıştır. Bu bilgiler bize yaşlanmada artan $[Zn^{+2}]_{Mit}$ seviyesinin ZnT7 ve ZnT8 aracılığıyla gerçekleştiğini göstermektedir.



Şekil 3.25. İzole mitokondri preparatlarında Zn^{+2} -taşıyıcılarının incelenmesi.

Gruplara ait immuno-blot görüntüleri (üstte) ve ölçülen protein ifadeleri (altta) yer almaktadır. A) ZIP7 protein ifadesi, B) ZnT7 protein ifadesi, C) ZIP8 protein ifadesi ve ZnT8 protein ifadesi verilmiştir. Sonuçlar COXIV protein ifadesine oranlanarak hesaplanmıştır. Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. * $P < 0,05$ yetişkin grubuna göre, # $p < 0,05$ yaşlı grubuna göre.

İzole ER preparatlarında ER-sitozol aksında taşıma yapan Zn^{+2} taşıyıcılarından ZIP7 protein ifadesinin yetişkinlerde ölçülen ($1\pm 0,08$, $n=5$) değerinde yaşlanmayla birlikte %73 artma ($1,73\pm 0,31$, $n=5$) olduğu ölçülmüş, antioksidan uygulamasının bu değeri ($1,2\pm 0,09$, $n=5$) anlamlı olarak azalttığı görülmüştür.



Şekil 3.26. İzole SR preparatlarında Zn^{+2} -taşıyıcılarının incelenmesi.

Gruplara ait immuno-blot görüntüleri (üstte) ve ölçülen protein ifadeleri (altta) yer almaktadır. A) ZIP7 protein ifadesi, B) ZnT7 protein ifadesi, C) ZIP8 protein ifadesi ve ZnT8 protein ifadesi verilmiştir. Sonuçlar SERCA2a protein ifadesine oranlanarak hesaplanmıştır. Veriler ortalama±SEM olarak verilmiştir. * $P < 0,05$ yetişkin grubuna göre, # $p < 0,05$ yaşlı grubuna göre.

Buna karşın ZIP8 protein ifadesinin gruplar arasında değişmediği tespit edilmiştir. Sitozol-ERaksında taşıma yapan ZnT7 protein ifadesinin yaşlanmada azaldığı (Yaşlı: $0,37 \pm 0,14$ n=5 ve Yetişkin: $1 \pm 0,12$, n=5) gözlenmiştir. MitoTEMPO uygulaması bu değeri anlamlı düzeyde arttırırken ($1,03 \pm 0,10$, n=5), yaşlanmada zaten değişmemiş olan ZnT8 protein ifadesine ise herhangi bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir.



4. TARTIŞMA

Yaş-a-bağlı sol ventrikül yapı ve fonksiyonunda gelişen değışikliklerin altında yatan nedenler arasında genellikle fibroz dokusunda artış olduğu ileri sürülmektedir. Buna karşın yaş-a-bağlı bu değışikliklerde kardiyomiyosit seviyesindeki bulgular, daha çok kardiyomiyosit sayısında azalma ve kardiyomisitlerde hipertrofi gelişimi gibi patolojiler üzerinde yoğunlaşmıştır (North ve Sinclair 2012; Lye ve Donnellan 2000). Bunlara ek olarak, yaşlanmaya bağli olarak hücre içi ve hücre dışı çeşitli sinyal mekanizmalarının bozulduğu, iyon kanallarının ve reseptörlerin fonksiyonlarının değıştiği, $[Ca^{+2}]_i$ 'nin arttığı ve buna bağli olarak mitokondri fonksiyonunun bozulması ile ilişkili kardiyomiyosit ölümünün gerçekleştiği ileri sürülmektedir (Dai ve ark., 2014; Fares ve Howlett 2010; Wei ve Gersh 1987). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, kalp yaşlanmasında mitokondri fonksiyon bozukluğunun rolü üzerinde durulmakta ve yaşlanmakta olan toplumlarda mitokondrinin yeni tedavi hedefleri arasında çok önemli bir organel olduğu, bu hususta yapılan çalışmaların yaşlanan kalp ile ilgili patolojilerin çözümünde önemli gelişmelere zemin teşkil edebileceği vurgulanmaktadır.

Bu hedeflere ulaşabilmek için, 6 aylık ve 24 aylık erkek sıçanlar kullanılmış ve bu sıçanlarda karşılaştırmalı olarak sistemik incelemeler (vücut ağırlığı, insulin direnci, EKG parametreleri ve izole organ yanıtları) yapılmıştır. Daha sonra izole kardiyomiyositlerde sarkolemmal akımlar incelenmiş ve EKG'de görülen sistemik değışimlerle ilişkisi ortaya konmuştur. Karşılaştırmalı olarak, özel floresans işaretleyiciler kullanılarak kardiyomiyositlerde $[Na^+]_i$, $[Ca^{+2}]_i$, $[Zn^{+2}]_i$, ve $[H^+]_i$ ile hücrelerdeki oksidan stres durumunu gösteren ROS ve RNS ölçümleri yaşlanma sürecinde değerlendirilmiştir. Biyokimyasal yöntemlerle ATP miktarı ve tiyol ölçümleri yapılmıştır. Bu değışimler mitokondri hedefli antioksidan varlığında incelenerek yaşlanmada mitokondriyal fonksiyon değışiminin katkısı etraflıca gösterilmiştir.

Çalışmamızın ikinci aşamasında ise yaşlanmada mitokondri yapı ve fonksiyonundaki değışikliklerin göstergesi olan füzyon ve fizyon proteinlerinin de

(Mfn1/2, Opa1, veya Fis1 gibi) değişimi incelenmiştir. Öte yandan, H9c2 hücre hattında yaşlanma modeli oluşturulmuş ve organel düzeyinde $[Zn^{+2}]$ ölçümleri yapılarak sonuçlarımız taze izole edilmiş ventrikül hücrelerinin verileri ile karşılaştırılmıştır. Daha sonra organel düzeyindeki lokalizasyonları önceki çalışmalarımızda belirlenmiş Zn^{+2} -taşıyıcılarının organel düzeyindeki ifade düzeyleri incelenerek yaşlanmada artan $[Zn^{+2}]_i$ seviyesinin organel düzeyindeki dağılımı detaylı olarak açıklanmıştır.

4.1. Sistemik Değişimlerin Yaşlanmaya Bağlı Kalp Fonksiyon Bozukluğundaki Önemi

Kalp ve damar fizyolojisinde meydana gelen değişimler birbirini tetikleyen bir seri fizyopatolojik süreci deharekete geçirir. Örneğin arter sisteminde sertliğin artması kalpte yeniden modellenme mekanizmalarını tetikleyerek sol ventrikül hipertrofisine yol açmaktadır. Sistem düzeyinde bu değişimler fibrotik doku artışına ve kalp çıktısının azalmasına yol açarak kardiyovasküler hastalık gelişimine zemin oluşturmaktadır (Lakatta 2003; Lakatta ve Levy 2003).

Yaşlanmada aort ve kalp kası ince yapısındaki değişimleri incelemek için ışık ve elektron mikroskobu incelemeleri yapılmış ve adipoz doku artışına bağlı olarak miyofibril bütünlüğünün bozulduğu ve hücreler arası matrikste bağ dokuda artışların olduğu, aortik örneklerde ise elastik lamellar yapıda yassılaşmayla birlikte yer yer kopmaların olduğu gözlenmiştir. Hücresel düzeyde ise T-tübüllerinde genişleme ve lizzozomal artış ve mitokondri sayısında azalma görülmüştür. Bu bulgular yaşlı sıçan kalplerinde fonksiyon kayıplarının/yetersizliğinin organ ve hücre düzeyinde gerçekleştiğini göstermektedir.

Çeşitli klinik ve deneysel çalışma sonuçları, yaşlanmanın insulin direncinin gelişimi için kaçınılmaz bir durum olduğunu, altında yatan birden fazla faktör bulunduğunu, vücut ağırlığına ve yağ miktarına bağlı olmaksızın da insulin direncinin

gelişebildiğini bildirmektedir. Bulgularımız yaşlanmada insülin direncinin geliştiğini (yaşlı hayvanların %60'ı) göstermektedir. Normal insülin bağlanma süreçlerine rağmen insülin direncinin gelişimi muhtemelen postreseptör defektlerin varlığına işaret etmektedir. (Escriba ve ark., 2007; Evans ve Goldfine 2013; Fink ve ark., 1983). Hiraoka ve arkadaşları insülin reseptörlerinin kardiyomiyositlerde bulunduğunu ve pek çok sarkolemmal akımın regülasyonundan sorumlu olduğunu rapor etmişlerdir (Hiraoka 2003). Hatta insülin reseptörlerinin uyarılmasının kalpte repolarizasyona katkı sağlayan bir çeşit insüline duyarlı katyon kanalının açılmasına neden olmaktadır (Zhang ve Hancox 2003). Hücre düzeyinde yaptığımız AP ölçümlerinde repolarizasyon fazındaki uzamanın altında bu reseptörlerin uyardığı ancak yetersiz uyarılabilen insülin duyarlı katyonik akımların da olabileceğini göstermektedir.

Serum ve hücre örneklerinden ölçülen TAD ve TOD değerleri, yaşlanmada oksidan düzeylerinin arttığını, antioksidan düzeylerinin ise anlamlı düzeyde azaldığını göstermiştir. Yapılan ölçümler sonucunda oksidatif stresin hem sistem düzeyinde hem de hücre düzeyinde arttığını göstermektedir. Kardiyak yaşlanmada en önemli süreçlerden birisi mitokondriyel oksidatif strestir. Yaşlanmayla birlikte mitokondride ROS üretimi artmaktadır (Egea ve ark., 2017). Çalışmamızda mitokondri hedefli bir antioksidan olan MitoTEMPO (SOD benzeri) organ ve hücre düzeyinde uygulanmış ve yaşlanmada mitokondrinin etkisi incelenmiştir. MitoTEMPO lipofilik bir katyondur ve membranı kolayca geçebilmektedir. Sahip olduğu pozitif yükten dolayı hücre içinde elektrokimyasal gradyentten dolayı mitokondride lokalize (sitozole göre 500 kat) olduğu bildirilmiştir. Kronik MitoTEMPO verilmiş yaşlı sıçanlarda kardiyak fonksiyonun ve koroner dolaşımın düzeldiği gösterilmiştir. İlgili çalışmada MitoTEMPO'nun mitokondriyal fonksiyonu özellikle ROS seviyesini azaltarak ve ATP üretimini düzenleyerek yaşlanmada kalp fonksiyonlarını düzelttiği bildirilmiştir (Owada ve ark., 2017).

Yaşlanmada kalbin elektriksel aktivitesini değerlendirmek için, vücut yüzeyinden EKG ölçümü yapılmıştır. Sinoatriyal noddan atriyoventriküler noda iletimde (P-R segmenti) yaşlı grupta yetişkin grupla karşılaştırıldığında anlamlı bir

fark gözlenmemiş, ancak ventriküler depolarizasyonu temsil eden QT intervalinde istatistiksel olarak anlamlı seviyede bir uzama gözlenmiştir. Bu verilere paralel olarak, yaşlı grupta kalp atım hızının yetişkinlere oranla yine anlamlı seviyede yavaş olduğu gözlenmiştir. Yaşlanma ile sayıları ve yapısı değişen miyositlerin rejenerasyon yeteneği azalır ve yerini kollajen üreten fibroblastlar olarak kalp dokusunda kollajen artışına neden olur (Olivetti ve ark., 1991). Yaşlanmada gözlenen in-vivo elektriksel aktivitedeki değişimler hücre ölümlerine bağlı olarak fibroz doku artışıyla açıklanabilmektedir. Hücre düzeyinde yaptığımız çalışmalar ise QT uzamasıyla paralel şekilde AP süresinde uzamanın olduğu ve bu uzamanın altında yatan iyonik mekanizmanın yaşlanmada baskılanmış olan K⁺-kanal akımlarının olabileceğini göstermektedir.

Yaşlanmada kalbin mekanik aktivitesi değerlendirildiğinde sistol sonu basıncın azaldığı, diyastol sonu basıncın değişmediği gözlenmiştir. Kalpte gözlenen hacimsel değişimlere göre, diyastol sonu hacmin değişmediği sistol sonu hacmin ise yaşlı kalplerde arttığı gözlenmiştir. Yaşlanma sürecinde kalp çıktısının ve ön yükle gelişen atım hacminin azaldığı gözlenmiştir. Yaşlanma ile birlikte özellikle elastik arterler genişler, duvarları sertleşir ve endotel işlevleri bozular. Bunlara bağlı olarak sistolik ve diyastolik kan basıncı ise artar. Sol ventrikül önündeki basınç artışına bağlı sol ventrikül hipertrofisi gelişir (Olgar ve ark., 2018). Bulgularımız global olarak yaşlı kalplerde hipertrofinin geliştiğini sistolik ve diyastolik kan basıncının ise arttığını göstermektedir.

İzole organ düzeyinde yaptığımız çalışmaların yaşlı kalp ve damar örneklerinde, mekanik aktivitedeki azalmış kasılma ve gevşeme yanıtlarıyla da uyumlu olduğunu göstermiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda mitoTEMPO uygulamasının doksorubusin aracılı kalp yetmezliğinde tedavi edici bir ajan olduğu (Rocha ve ark., 2016), diyabetik kardiyomyopatiye mitokondriyal ROS miktarını azalttığı (Xiong ve ark., 2016) ve yaşlı farelerde kalbin hemodinamik süreçlerini düzettiği (Miura ve ark., 2017) rapor edilmiştir. Çalışmamız organ düzeyinde gerçekleşen fonksiyon kayıplarının mitokondri temelli olduğunu ve mitokondri

hedefli antioksidan uygulamasının organ düzeyindeki yetersizliğin tedavisinde önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir.

4.2. Hücre Düzeyindeki Değişimlerin Yaşlanmaya Bağlı Kalp Fonksiyon Bozukluğundaki Önemi

Hücresele seviyede yaşa-bağlı olarak kardiyomiyosit sayısında azalma ve azalan hücre sayısının kompensasyonu olarak ise kardiyomiyositlerde büyüme (hipertrofi) gözlenmektedir (Olivetti ve ark., 1991; Ozturk ve ark., 2017). Sarkolemmada yaşlanmaya bağli olarak çeşitli sinyal mekanizmalarının bozulduğu, iyon kanallarının ve reseptörlerin fonksiyonlarının değiştigi ile ilgili çalışma sonuçları literatürde mevcuttur. Yaşlanmada hücresele düzeyde ROS ve RNS miktarının arttığı gözlenmiştir (Dai ve ark., 2014; Fares ve Howlett 2010; Wei ve Gersh 1987).

Özellikle antioksidan sistemin azalması oksidan süreçleri tetikleyen ana sebeplerden biridir (Moris ve ark., 2017). Artan oksidatif stresle birlikte aktive olan pPKC α protein ifadesinin yaşli kardiyomiyositlerde arttığı gözlenmiştir. Mitokondri hedefli antioksidan uygulamasının ROS, RNS ve fosforilePKC α (pPKC α) düzeylerini azalttığı gözlenmiştir. İnsan kalp yetmezliği modelinde yapmış olduğumuz çalışmada pPKC α düzeyinin 5-kat arttığı, doksorubisin modeliyle oluşturduğumuz kalp yetmeliği modelinde ise PKC α inhibisyonunun iyonik mekanizmaları (özellikle [Zn⁺²]_i miktarını azalttığı) düzelttiğini göstermiştik (Olgar ve ark., 2018). Mekanistik olarak PKC α 'nın PLB fosforilasyonundan sorumlu olduğu ve [Ca⁺²]_i-homeostazını etkileyerek kalp yetmezliğine uzanan süreçlere aracılık ettiği bildirilmiştir (Braz ve ark., 2004).

Yaşlanmada uyarılabilirliği gözlemek amacıyla, enzimatik yöntemlerle sol ventrikülden kardiyomiyosit izolasyonu yapılmış ve sarkolemmal akımlar değerlendirilmiştir. İzole kardiyomiyositlerde yapılan incelemelerle, yaşlanmada AP

süresinin uzadığı, voltaj-kapılı Na⁺- ve Ca⁺- kanal yoğunluklarının değişmediği gözlenmiştir. AP'deki bu uzamaya neden olan mekanizmalara ilişkin çeşitli varsayımlar bildirilmiştir. Pek çok çalışmada AP'deki uzamanın voltaj-kapılı K⁺-kanal akımlarının azalmasından kaynaklandığı bildirilmektedir (Ayaz ve ark., 2004; Degirmenci ve ark., 2018; Olgar ve ark., 2014). Çalışmamızda toplam K⁺-akımları değerlendirilmiş ve erken repolarizasyon fazına katkı sağlayan I_{to} (dışarı doğru) akımlarının yaşlanmada baskılandığı gözlenmiştir. MitoTEMPO ile (3 saat- 1 µM) inkübe edilen hücrelerde aksiyon potansiyeli süresinin kısaldığı ve I_{to} akımlarının ise arttığı gözlenmiştir. ROS artışının kanal yapısında bulunan SH-SH bağlarını kırarak fonksiyon kaybına yol açtığı rapor edilmiştir (Aggarwal ve Makielski 2013). Özellikle K⁺-kanallarının oksidatif strese karşı çok hassas olduğu, fonksiyonel olarak genellikle baskılanarak repolarizasyon süreçlerinin bozulduğu rapor edilmiştir (Matsuura ve Shattock 1991).

Kardiyomiyositlerde Na⁺ ve K⁺ gradientinden sorumlu olan Na⁺-K⁺ pompa aktivitesinin yaşlanmada arttığı gözlenmiştir (Despa ve ark., 2002). Kardiyomiyositlerde [Na⁺]_i ve [H⁺]_i seviyelerinin de yaşlanmada arttığı göz önünde bulundurulduğunda, Na⁺ gradiyentini dengelemek için pompa aktivitesinin artmış olabileceğini düşündürmektedir. Diğer yandan, antioksidan uygulamasının [Na⁺]_i ve [H⁺]_i seviyeleri ve Na⁺-K⁺ pompa aktivitesini azalttığı gözlenmiştir. Kalpte ifadesi yeni belirlenen ve SGLT2 inhibisyonunun da antioksidan benzeri etkiler yaparak yaşlanmada [Na⁺]_i-homeostazının düzenlenmesinde aktif rol oynadığı görülmektedir. Güncel çalışmalar SGLT2 inhibisyonunun kalp fonksiyonlarını düzelttiğini rapor etmişlerdir (Durak ve ark., 2018; Olgar ve Turan 2018).

ATP-duyarlı K⁺-kanallarının (K-ATP) çalışması hücrenin enerji ihtiyacıyla doğrudan ilgilidir. Hipoksi, ani enerji ihtiyacı ya da mitokondri fonksiyonlarında bozulmalar gibi nedenlerle sitozolik ATP miktarında ve üretiminde azalma olursa yani ATP/ADP oranında azalma olursa K-ATP açılmaya başlar. Bu gibi bir durumda, ATP duyarlı potasyum kanallarının açılmasıyla hücre dışına büyük miktarda K⁺ çıkışı olur. AP'nin özellikle repolarizasyon evresindeki bu K⁺ çıkışı, repolarizasyonu

hızlandırır ve AP'nin kışalmasına neden olur (Faivre ve Findlay 1990). Elde ettiğimiz bulgular K-ATP kanal akım yoğunluğunun azaldığını göstermektedir. Ayrıca Kir6.2 ve SUR2a mRNA düzeylerinin de yaşlanmayla beraber azaldığı gözlenmiştir. Yaşlanma sürecinde oksidatif stresin artması ve ADP/ATP oranının artması K-ATP kanal akımlarının aktive olabileceğini düşündürmektedir. Ancak Bao ve arkadaşları yaşlanma sürecinde K-ATP kanal akım yoğunluğundaki azalmanın nükleotid sensitivitesindeki azalmayla açıklamışlardır. (Bao ve ark., 2013). Çalışmamızda antioksidan uygulamasının K-ATP kanal akım yoğunluğunu anlamlı düzeyde arttırdığını buna karşın mRNA düzeyinde ise herhangi bir etkisinin olmadığı göstermiştir. Ancak antioksidan uygulamasının nükleotid sensitivitesini değiştirerek kanal akımında gözlenen artışın nedeni olabileceğini düşündürmektedir.

Yaşlanmada gözlediğimiz mekanik ve elektriksel fonksiyon bozukluğunda sitozolik $[Ca^{+2}]_i$ rolünü araştırmak amacıyla izole kardiyomiyositlerde elektriksel uyarı altında hücre içi global geçici $[Ca^{+2}]_i$ değişimleri incelenmiştir. Yaşlanmada dinlenme durumunda $[Ca^{+2}]_i$ miktarının arttığı uyarı altında ise genlik düzeyinin azaldığı gözlenmiştir. Bununla birlikte SR- Ca^{+2} miktarının da azaldığı gözlenmiştir. Bu bulgular AP verilerimizle ve organ düzeyindeki kasılma yanıtlarımızla uyumludur. Artan $[Ca^{+2}]_i$ seviyesinin antioksidan uygulamasıyla düzeldiği gözlenmiştir. Kardiyomiyositlerde $[Ca^{+2}]_i$ seviyesinin [ROS] artışıyla arttığı literatürde bilinmektedir. Bu artış RyR oksidasyonu/fosforilasyonu ile yakından ilişkilidir. Anzai ve ark., artan oksidatif stresin RyR2 kanalının açılma/açık kalma olasılığını arttırdığını böylece SR'den Ca^{+2} sızıntılarının olduğunu, bir antioksidan olan DTT varlığında ise bu değişimin düzeldiğini göstermişlerdir (Anzai ve ark., 1998). Bu bilgiler elde ettiğimiz verilerle tam örtüşmektedir.

4.3. Yaşlanmaya Bağlı Organel Düzeyindeki Değişimlerin kalp Fonksiyon Bozukluğundaki Rolü

Yaşlanmada mitokondri membran potansiyeli (MMP) ve mitokondriyal superoksit ölçümleri yapılmıştır. Yaşlanmada MMP depolarize gözlenirken, superoksit miktarının da arttığı gözlenmiştir. SOD benzeri ve mitokondride lokalize olabilen MitoTEMPO ile inkübe edilen hücrelerde MMP düzeylerinin normal değerlere geldiği superoksit miktarının ise azaldığı gözlenmiştir. Yapılan çalışmalar MitoTEMPO'nun mitokondriyal fonksiyonu düzelttiğini ve redoks dengesini sağladığını (Miura ve ark., 2017) hücre ve organ düzeyinde görülen fonksiyon yetersizliğinin tedavisinde potansiyel bir aday olabileceğini göstermişlerdir. (Owada ve ark., 2017; Terman ve Brunk 2004).

Yaşlanmada mitokondriyal fizyolojiyi belirleyen başlıca proteinlerden olan ve biyogenezden sorumlu olan Opa-1, füzyon süreçlerini düzenleyen Mitofusion-1 (Mfn-1), Mitofusion-2 (Mfn-2) ve füzyon süreçlerinde rol oynayan Fis-1 proteinleri incelenmiştir. Yaşlanmada Opa-1 protein ifadesinde gözlenen azalma mitokondriyal biyogenezin yetersiz olduğunu göstermektedir. Elektron mikroskobu bulgularımız mitokondri ince yapısının bozulduğunu özellikle mitokondri sayısının azaldığını, lizozomal degradasyonun ise arttığını göstermektedir. Ayrıca Mfn-2 ifade miktarının azalmasının insülin direnciyle ilişkili olduğu ve mitokondriyal sistemin otofajik süreçlere girdiğini göstermektedir (Sebastian ve ark., 2012; Sebastián ve Zorzano 2016). Mitokondri hedefli antioksidan uygulamasıyla bu değişimlerin düzeldiğinin gözlenmesi yaşlanmada redoks dengesinin önemini göstermektedir.

4.4. Yaşlanmada Gözlenen Kalp Fonksiyon Bozukluğu ve Hücresel Zn⁺² İlişkisi

Çok hücreli canlıların beslenmesinde önemli bir mikrobesein olan Zn⁺² düzeyi, metallothioneinler yanında, Zn⁺²-hücre içine taşıyıcılar (ZIP) ve Zn⁺²-hücre dışına taşıyıcılar (ZnT) tarafından regüle edilmektedir. Çeşitli organ fonksiyonlarında bu iyonun etkilerinin artan oksidatif stres ile ilişkili olduğu, özel olarak kalpte hücre içi serbest Zn⁺² seviyesindeki artışın, hücre içi Ca⁺² seviyesine ve hücrenin redoks

durumundaki değişikliklere aracılık ederek, örneğin kardiyomiyositlerde uyarılma-
kasılma çiftlenimini bozduğu gösterilmiştir (Tuncay ve Turan 2016).

Yaşlanmayla birlikte hücre içi serbest $[Zn^{+2}]_i$ değişiminin yaklaşık olarak 3-
kat arttığı gözlemlenmiştir. Güncel çalışmalarımız artan $[Zn^{+2}]_i$ 'un aksiyon
potansiyeli süresini uzatarak aritmilere yol açtığını ve proteinlerde tiyol
oksidasyonuna neden olabileceğini göstermişti (Degirmenci ve ark., 2018). Başka bir
çalışmamızda ise artan $[Zn^{+2}]_i$ miktarının endoplazmik retikulum stresine yol açtığını
ve mitokondri ince yapısını bozduğu gösterilmiştir (Billur ve ark., 2016). Öte yandan
organel seviyesinde Zn^{+2} taşınımının değişen $[Zn^{+2}]_i$ miktarına katkısı olabileceği de
gösterilmiştir (Tuncay ve ark., 2017). Dolayısıyla artan $[Zn^{+2}]_i$ 'nun yaşlanma
sürecinde mitokondriyal süreçleri bozabileceğini göstermektedir.

Yaşlanmada 3,5-kat artmış $[Zn^{+2}]_i$ miktarının organel düzeyindeki dağılımı
incelenmiştir. Zn^{+2} duyarlı probler yardımıyla elde edilen ölçümlerde $[Zn^{+2}]_{Mit}$
düzeyinin arttığı, buna karşın $[Zn^{+2}]_{ER}$ düzeyinin ise anlamlı düzeyde azaldığı
gözlenmiştir. Bulgularımız ER'dan taşınan Zn^{+2} 'nin sitozolde biriktiği, hatta
mitokondriye taşındığını göstermektedir. Mitokondride artan $[Zn^{+2}]_{Mit}$ oksidatif
strese yol açtığı, MMP'ni depolarize ettiği daha önceki çalışmalarımızda mevcuttur.
(Billur ve ark., 2016; Tuncay ve ark., 2017; Tuncay ve Turan 2016).

Daha önceki çalışmalarımızda ZIP7/ZnT7 ve ZIP8/ZnT8 Zn^{+2} -taşıyıcılarının
ER ve mitokondride lokalize olduklarını ve ifade düzeylerindeki değişikliğin organel
içi $[Zn^{+2}]_{ER-Mit}$ seviyeleriyle doğrudan bağlantılı olduğunu göstermiştir (olgar 2018,
tuncay 2018). Bu hususta ER ve mitokondri izolasyonları yapılarak bu proteinlerin
ifade düzeyleri incelenmiştir. İzole mitokondri homojenatlarında yaptığımız
incelemelerde ZnT7/8 taşıyıcılarının arttığı, ZIP7/8 taşıyıcılarının ise değişmediği
görülmüştür. ER homojenatlarında ise ZIP7 protein ifadesinin artmış, ZnT7 protein
ifadesinin ise azaldığı görülmüştür. Bu sonuçlar yaşlanma sürecinde hücre içi serbest
 $[Zn^{+2}]_i$ miktarının hücre dışı ortamdaki ziyade organel düzeyinde gerçekleşen
değişimlerin katkısıyla artabileceğini ve ER-sarkoplazma-mitokondri aksında bir

Zn^{+2} taşınımının olduğuna işaret etmektedir. Bu bulgular bize yaşlanma sürecinde $[Zn^{+2}]_i$ 'nin organeller arası ya da sitozol organel aksındaki taşınımında herhangi bir aksamanın kalpte organ ve hücre düzeyinde fonksiyon bozukluklarına yol açabileceğine işaret etmektedir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda Zn^{+2} -taşıyıcıları ve mitokondri ilişkisinin yaşlanmaya bağlı kalp fonksiyon bozukluğundaki rolünün incelenmesi hedeflenmiştir. Bu hususta sistem, organ, hücre ve organel düzeyinde elektrofizyolojik, biyokimyasal ve moleküler biyolojik teknikler kullanılarak konu etraflıca aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Yaşlanmada doku ve hücre düzeyindeki histolojik incelemelerde adipoz doku artışına bağlı olarak miyofibril bütünlüğünün bozulduğu ve hücreler arası matrikste bağ dokuda artışların olduğu, aortik örneklerde ise elastik lamellar yapıda yassılaşmayla birlikte yer yer kopmaların olduğu gözlenmiştir. Hücresel düzeyde ise T-tübüllerinde genişleme ve lizozomal artış ve mitokondri sayısında azalma görülmüştür. Bu bulgular yaşlı sıçan kalplerinde fonksiyon kayıplarının/yetersizliğinin organ ve hücre düzeyinde gerçekleştiğini göstermektedir.

Serum ve hücre örneklerinde oksidan düzeylerin arttığını, antioksidan düzeylerin ise anlamlı düzeyde azaldığını göstermiştir. Bu sonuçlar oksidatif stresin hem sistem düzeyinde hem de hücre düzeyinde arttığını göstermektedir. Oksidatif stresle aktive olan kinazlardan PKC α ifade düzeylerinin yaşlanmada arttığı, hücre içi iyon konsantrasyonlarına katkısı tartışılmıştır. Ancak antioksidan uygulamasının sistem düzeyinde etkileri incelenememiştir. Çalışmamız bu yönüyle eksiktir. Ancak kronik antioksidan uygulaması sonraki çalışmalarımız için planlanmıştır.

Yaşlanmada organ ve hücre düzeyinde elektriksel aktivite incelenmiştir. Bulgularımız kalplerde QT uzamasına paralel hücre düzeyinde de AP sürelerinin değiştiğini göstermektedir. Bu değişimin altında yatan iyonik akımlarından dışarı doğru K $^{+}$ -kanal akımlarında gözlenen baskılanmanın olduğu sonucuna varılmıştır.

ATP duyarı K $^{+}$ -kanal akımlarının yaşlanma sürecinde azaldığı gözlenmiştir. Yaşlanmada enerjistik süreçler bozulmasına karşın bu akımlarda gözlenen azalmalar

nükleotid sensitivitesinden ileri geldiği düşünülmektedir. Bu konunun etraflıca aydınlatılması için farklı hücre içi ATP konsantrasyonlarında bu akımların tekrar incelenip sensitivite değişiminin altında yatan moleküler mekanizmalar açıklanabilir.

Yaşlanmada hücre içi çeşitli iyon konsantrasyonlarında ($[Ca^{2+}]$, $[Na^+]$ ve $[H^+]$) artış gözlenmiştir. Bu artışın artan oksidatif stresle değişebileceği ya da sarkolemmal yapılarda (kanallar, reseptörler gibi) gözlenen fonksiyonel değişimlerin olabileceği sonucuna varılmıştır.

Yaşlanmada $[Zn^{2+}]_i$ miktarının arttığı gözlenmiştir. Artan $[Zn^{2+}]_i$ düzeylerinin organeller arası dağılımı incelenmiş, organel düzeyindeki Zn^{2+} değişiminin (ER'de azalmış ve Mitokondride artmış) katkısının olduğu sonucuna varılmıştır. Biyokimyasal analizlerimiz Zn^{2+} taşıyıcılarının organel düzeyindeki ifade değerlerinin bu değişime aracılık ettiği sonucuna varılmıştır. Ancak Zn^{2+} kaynağı olabilecek diğer organellerde (golgi gibi) Zn^{2+} düzeyleri incelenmemiştir. Çalışmamızda mitokondri ve ER izolasyonu için ticari kitler kullanılmıştır. Organel düzeyindeki izolasyonların ultrasantrifüj kullanılarak da yapılmasının ve böylece kit ile yapılan ölçümlerin valide edilmesinin gerekli olduğu hususu bu çalışmanın önerileri arasındadır.

Yaşlı kardiyomiyositlerde artan $[Zn^{2+}]_i$ düzeylerinin mitokondri ince yapısından sorumlu proteinlere etkisi incelenmiş, mitokondriyal biyogenez süreçlerinin aksadığı, otofajik süreçlerin devreye girdiği ve bu süreçlerde bozulmuş redoks dengesinin önemi gösterilmiştir.

ÖZET

Çinko- taşıyıcıları ve mitokondri ilişkisinin yaşlanmaya bağlı kalp fonksiyon bozukluğundaki rolünün incelenmesi.

Güncel çalışmalar, kalp yaşlanmasında mitokondri fonksiyon bozukluğunun rolünün etkili olduğunu göstermekte ve yaşlanmakta olan toplumlarda mitokondrinin yeni tedavi hedefleri arasında çok önemli bir organel olduğu, bu hususta yapılan çalışmaların yaşlanan kalp ile ilgili patolojilerin çözümünde önemli gelişmelere zemin teşkil edebileceği vurgulanmaktadır. Çeşitli organ fonksiyonlarında Zn^{+2} iyonunun etkilerinin artan oksidatif stres ile ilişkili olduğu, özel olarak kalpte hücre içi serbest Zn^{+2} seviyesindeki artışın, hücre içi Ca^{+2} seviyesine ve hücrenin redoks durumundaki değişikliklere aracılık ederek, kardiyomiyositlerde uyarılma-kasılma çiftlenimini bozduğu gösterilmiştir. Bu nedenle çalışmamızda çinko-taşıyıcıları ve mitokondri ilişkisinin yaşlanmaya bağlı kalp fonksiyon bozukluğundaki rolünün incelenmesi hedeflenmiştir.

Yaşlanmada insülin direncinin gözlemlendiği, serum ve hücre düzeylerinde oksidatif stresin arttığı tespit edilmiştir. Yaşlı kalplerde QT uzamasına paralel hücre düzeyinde de AP sürelerinin değiştiğini göstermektedir. İzole organ yanıtları incelenmiş ve kalp ve damar fonksiyonlarının bozulduğu, antioksidan uygulamasının bu değişimleri düzelttiği gösterilmiştir. Sarkolemmal akımlarda voltaj duyarlı K^{+} -kanal akımlarının azaldığı, voltaj duyarlı Na^{+} - ve Ca^{2+} - kanal akımlarında ise herhangi bir değişimin olmadığı gözlenmiştir. ADP/ATP oranında artış gözlenmiş, K-ATP kanal akımlarında ise azalma tespit edilmiştir. Yaşlanmada hücre içi iyon konsantrasyonlarında (Ca^{2+} , Na^{+} ve H^{+}) artış olduğu bu artışın antioksidan uygulamasıyla önlenmediği gözlenmiştir. Yaşlanmada $[Zn^{2+}]_i$ miktarının arttığı, organel düzeyinde ise azalmış $[Zn^{2+}]_{SER}$ ve artmış $[Zn^{2+}]_{Mit}$ olduğu gözlenmiştir. Biyokimyasal analizler Zn^{2+} taşıyıcılarının organel düzeyindeki ifade değerlerinin bu değişime aracılık ettiği izole ER'de artmış ZIP7 ve azalmış ZnT7 protein ifadeleri gözlenirken, izole mitokondride ise Znt7 ve Znt8 protein ifadelerinde artış olduğu tespit edilmiştir. Yaşlı kardiyomiyositlerde artan $[Zn^{2+}]_i$ düzeyleriyle ilişkili olarak mitokondriyal biyogenez süreçlerinin aksadığı, otofajik süreçlerin devreye girdiği, bu süreçlerde bozulmuş redoks dengesinin önemi gösterilmiştir.

Bu çalışma sonuçları, yaşlı kalp fonksiyonunda hücre içi Zn^{2+} düzeylerinin Zn^{2+} -taşıyıcılarının ifade düzeyleriyle ilişkili olduğu, yaşlanan kalpte fonksiyon bozukluğunun altında yatan nedenlerden özellikle mitokondri fonksiyonu ile olan ilişkinin önemi vurgulanmıştır. Yaşlanan kalpte yeni farmakolojik tedavi hedeflerinin gösterilmesi, yaşlanan toplumlarda yaşam kalitesinin yükselmesi ile ilişkili olduğu göz önüne alındığında, yaşlanmayla ilişkili patolojik değişikliklerin altında yatan mekanizmaların iyi anlaşılmasının yaşlı yaşam kalitesinde önemli bir hedef olduğu açıktır.

Anahtar sözcükler: Çinko, Çinko-Taşıyıcıları, Mitokondri, Yaşlanma.

SUMMARY

An investigation of the role of the interplay between zinc-transporters and mitochondria on aging-associated cardiac dysfunction

Aging in humans represents downhill processes in cardioprotective systems and mitochondria plays pivotal role due to the higher energy demanding during senescence. Zinc is an important micro-nutrient for mammals, a vital component of various proteins and plays important roles in many endogenous signaling pathways in particular, affects the cellular levels of Ca^{2+} and dysregulates the excitation/contraction coupling via changes in the redox state of the cell. Therefore we aimed to investigate the role of the interplay between Zn^{2+} -transporters and mitochondria on aging-associated cardiac dysfunction.

We determined significantly increased systemic oxidative stress with decreased antioxidant capacity, clear insulin resistance and hypertrophy in aged rats. ECG recordings exhibit longer QT compatible with prolonged APD in aged cardiomyocytes. We shown depressed contraction and relaxation activity in aortic rings which recovered following mitochondrial targeted antioxidant treatment. Our patch-clamp measurements demonstrated that the prolongation in AP are mostly due to alterations in K^+ -channel currents. Particularly, Our results exert that both repolarizing voltage gated K^+ -channel and K-ATPchannel density reduced remarkably in senescent myocytes and improved with antioxidant treatment. Confocal imaging findings demonstrated that ($[\text{Zn}^{2+}]_i$) was increased, at least, due to the expression level of ZIP7 and decreased level of ZnT7 while there were marked decrease in the level of ZIP8 and increase in ZnT8 in aged-cardiomyocytes. Furthermore, the $[\text{Zn}^{2+}]_{\text{Mit}}$ was increased while the $[\text{Zn}^{2+}]_{\text{SER}}$ was decreased in aged-cardiomyocytes. Moreover, the re-distribution of these Zn^{2+} -transporters were markedly changed such as increased levels of ZnT7 and ZnT8 with unchanged ZIP7 and ZIP8 levels in isolated Mit, whereas the ZIP7 level was increased and the ZnT7 was decreased with no change in ZIP8 and ZnT8 levels in isolated S(E)R. Elevated $[\text{Zn}^{2+}]_{\text{Mit}}$ disrupts mitochondrial fine structure by harboring biogenesis and induces otophagic signalling in aged myocardium.

These results reveal the underlying mechanisms of heart dysfunction associated with ageing, especially in relation with elevated $[\text{Zn}^{2+}]_i$ and mitochondrial function. As identifying novel pharmacological therapy targets in ageing heart is closely related to improving life quality in ageing societies, it is crucial to understand the mechanism underlying pathological changes associated with ageing.

Key words: Zinc, Zinc-transporters, Mitochondria, Aging.

KAYNAKLAR

- ADOLFSSON, P.I., B. BLOTH, S. HAGG, AND S.P. SVENSSON. (2015). "Zinc induces a bell-shaped proliferative dose-response effect in cultured smooth muscle cells from benign prostatic hyperplasia", *Urology*, **853**, 704.e15-9.
- AGGARWAL, N.T. AND J.C. MAKIELSKI. (2013). "Redox control of cardiac excitability", *Antioxid Redox Signal*, **184**, 432-68.
- ANTEMI, I., R.S. DE PAULA, A.R. SHINZATO, C.A. PERES, A.J. MANSUR, AND C.J. GRUPI. (2004). "Influence of age, gender, body mass index, and functional capacity on heart rate variability in a cohort of subjects without heart disease", *Am J Cardiol*, **933**, 381-5.
- ANZAI, K., K. OGAWA, A. KUNYASU, T. OZAWA, H. YAMAMOTO, AND H. NAKAYAMA. (1998). "Effects of hydroxyl radical and sulfhydryl reagents on the open probability of the purified cardiac ryanodine receptor channel incorporated into planar lipid bilayers", *Biochem Biophys Res Commun*, **2493**, 938-42.
- ARNHEIM, N. AND G. CORTOPASSI. (1992). "Deleterious mitochondrial DNA mutations accumulate in aging human tissues", *Mutat Res*, **2753-6**, 157-67.
- AYAZ, M., S. OZDEMIR, M. UGUR, G. VASSORT, AND B. TURAN. (2004). "Effects of selenium on altered mechanical and electrical cardiac activities of diabetic rat", *Arch Biochem Biophys*, **4261**, 83-90.
- AYAZ, M. AND B. TURAN. (2006). "Selenium prevents diabetes-induced alterations in [Zn²⁺]_i and metallothionein level of rat heart via restoration of cell redox cycle", *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **2903**, H1071-80.
- BAO, L., et al. (2013). "Alterations in ventricular K(ATP) channel properties during aging", *Aging Cell*, **121**, 167-76.
- BERS, D.M. (2002). "Cardiac excitation-contraction coupling", *Nature*, **4156868**, 198-205.
- BILLUR, D., E. TUNCAY, E.N. OKATAN, Y. OLGAR, A.T. DURAK, S. DEGIRMENCI, B. CAN, AND B. TURAN. (2016). "Interplay Between Cytosolic Free Zn²⁺ and Mitochondrion Morphological Changes in Rat Ventricular Cardiomyocytes", *Biological trace element research*, 1-12.
- BRAYER, K.J., S. KULSHRESHTHA, AND D.J. SEGAL. (2008). "The protein-binding potential of C2H2 zinc finger domains", *Cell Biochem Biophys*, **511**, 9-19.
- BRAZ, J.C., et al. (2004). "PKC- α regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure", *Nat Med*, **103**, 248-54.
- CAMPBELL, S.G., P. HAYNES, W. KELSEY SNAPP, K.E. NAVA, AND K.S. CAMPBELL. (2013). "Altered ventricular torsion and transmural patterns of myocyte relaxation precede heart failure in

aging F344 rats", *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, **3055**, H676-H686.

CAMPBELL, S.G., P. HAYNES, W. KELSEY SNAPP, K.E. NAVA, AND K.S. CAMPBELL. (2013). "Altered ventricular torsion and transmural patterns of myocyte relaxation precede heart failure in aging F344 rats", *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **3055**, H676-86.

CHAN, D.C. (2006). "Dissecting mitochondrial fusion", *Dev Cell*, **115**, 592-4.

DAI, D.F., Y.A. CHIAO, D.J. MARCINEK, H.H. SZETO, AND P.S. RABINOVITCH. (2014). "Mitochondrial oxidative stress in aging and healthspan", *Longev Healthspan*, **3**, 6.

DEGIRMENCI, S., Y. OLGAR, A. DURAK, E. TUNCAY, AND B. TURAN. (2018). "Cytosolic increased labile Zn²⁺ contributes to arrhythmogenic action potentials in left ventricular cardiomyocytes through protein thiol oxidation and cellular ATP depletion", *J Trace Elem Med Biol*, **48**, 202-212.

DESPA, S., M.A. ISLAM, C.R. WEBER, S.M. POGWIZD, AND D.M. BERS. (2002). "Intracellular Na(+) concentration is elevated in heart failure but Na/K pump function is unchanged", *Circulation*, **10521**, 2543-8.

DURAK, A., Y. OLGAR, S. DEGIRMENCI, E. AKKUS, E. TUNCAY, AND B. TURAN. (2018). "A SGLT2 inhibitor dapagliflozin suppresses prolonged ventricular-repolarization through augmentation of mitochondrial function in insulin-resistant metabolic syndrome rats", *Cardiovasc Diabetol*, **171**, 144.

DURAK, A., Y. OLGAR, E. TUNCAY, I. KARAOMERLIOGLU, G. KAYKI MUTLU, E. ARIOGLU INAN, V.M. ALTAN, AND B. TURAN. (2017). "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*, 1-8.

EGEA, J., et al. (2017). "European contribution to the study of ROS: A summary of the findings and prospects for the future from the COST action BM1203 (EU-ROS)", *Redox Biol*, **13**, 94-162.

ESCRIVA, F., M.L. GAVETE, Y. FERMIN, C. PEREZ, N. GALLARDO, C. ALVAREZ, A. ANDRES, M. ROS, AND J.M. CARRASCOSA. (2007). "Effect of age and moderate food restriction on insulin sensitivity in Wistar rats: role of adiposity", *J Endocrinol*, **1941**, 131-41.

EVANS, J.L. AND I.D. GOLDFINE. (2013). "Aging and insulin resistance: just say iNOS", *Diabetes*, **622**, 346-8.

FABIATO, A. AND F. FABIATO. (1979). "Calcium and cardiac excitation-contraction coupling", *Annu Rev Physiol*, **41**, 473-84.

FAIVRE, J.F. AND I. FINDLAY. (1990). "Action potential duration and activation of ATP-sensitive potassium current in isolated guinea-pig ventricular myocytes", *Biochim Biophys Acta*, **10291**, 167-72.

- FARES, E. AND S.E. HOWLETT. (2010). "Effect of age on cardiac excitation-contraction coupling", *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **371**, 1-7.
- FARES, E. AND S.E. HOWLETT. (2010). "Effect of age on cardiac excitation-contraction coupling.", *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **371**, 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*, **6312**, 1416-1419.
- FINK, R.I., O.G. KOLTERMAN, J. GRIFFIN, AND J.M. OLEFSKY. (1983). "Mechanisms of insulin resistance in aging", *J Clin Invest*, **716**, 1523-35.
- FRASSINETTI, S., G. BRONZETTI, L. CALTAVUTURO, M. CINI, AND C.D. CROCE. (2006). "The role of zinc in life: a review", *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, **253**, 597-610.
- HAFNER, A.V., J. DAI, A.P. GOMES, C.Y. XIAO, C.M. PALMEIRA, A. ROSENZWEIG, AND D.A. SINCLAIR. (2010). "Regulation of the mPTP by SIRT3-mediated deacetylation of CypD at lysine 166 suppresses age-related cardiac hypertrophy", *Aging (Albany NY)*, **212**, 914-23.
- HIRAOKA, M. (2003). "A novel action of insulin on cardiac membrane", *Circ Res*, **927**, 707-9.
- HOJYO, S. AND T. FUKADA. (2016). "5: Zinc transporters and signaling in physiology and pathogenesis", *Arch Biochem Biophys*.
- HOPPEL, C.L., B. TANDLER, H. FUJIOKA, AND A. RIVA. (2009). "Dynamic organization of mitochondria in human heart and in myocardial disease", *Int J Biochem Cell Biol*, **4110**, 1949-56.
- HUYNH, M.B., et al. (2012). "Age-related changes in rat myocardium involve altered capacities of glycosaminoglycans to potentiate growth factor functions and heparan sulfate-altered sulfation", *J Biol Chem*, **28714**, 11363-73.
- IZZO, J.L., JR. AND B.E. SHYKOFF. (2001). "Arterial stiffness: clinical relevance, measurement, and treatment", *Rev Cardiovasc Med*, **21**, 29-34, 37-40.
- JEONG, E.-M., M. LIU, M. STURDY, G. GAO, S.T. VARGHESE, A.A. SOVARI, AND S.C. DUDLEY, JR. (2012). "Metabolic stress, reactive oxygen species, and arrhythmia", *Journal of molecular and cellular cardiology*, **522**, 454-463.
- JOUAVILLE, L.S., P. PINTON, C. BASTIANUTTO, G.A. RUTTER, AND R. RIZZUTO. (1999). "Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming", *Proc Natl Acad Sci U S A*, **9624**, 13807-12.
- JOVANOVIC, S. AND A. JOVANOVIC. (2004). "Sarcolemmal K(ATP) channels in ageing", *Ageing Res Rev*, **32**, 199-214.

- KAMBE, T., T. TSUJI, A. HASHIMOTO, AND N. ITSUMURA. (2015). "The Physiological, Biochemical, and Molecular Roles of Zinc Transporters in Zinc Homeostasis and Metabolism", *Physiol Rev*, **953**, 749-84.
- KANSAL, S.K., U. JYOTI, S. SHARMA, A. KAURA, R. DESHMUKH, AND S. GOYAL. (2015). "Effect of zinc supplements in the attenuated cardioprotective effect of ischemic preconditioning in hyperlipidemic rat heart", *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **3886**, 635-41.
- KEEN, C.L. AND L.S. HURLEY. (1987). "Effects of zinc deficiency on prenatal and postnatal development", *Neurotoxicology*, **83**, 379-87.
- KIMURA, T. AND T. KAMBE. (2016). "The Functions of Metallothionein and ZIP and ZnT Transporters: An Overview and Perspective", *Int J Mol Sci*, **173**, 336.
- LAKATTA, E.G. (2003). "Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part III: cellular and molecular clues to heart and arterial aging", *Circulation*, **1073**, 490-7.
- LAKATTA, E.G. AND D. LEVY. (2003). "Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part II: the aging heart in health: links to heart disease", *Circulation*, **1072**, 346-54.
- LICHTEN, L.A. AND R.J. COUSINS. (2009). "Mammalian zinc transporters: nutritional and physiologic regulation", *Annu Rev Nutr*, **29**, 153-76.
- LINNANE, A.W., C. ZHANG, A. BAUMER, AND P. NAGLEY. (1992). "Mitochondrial DNA mutation and the ageing process: bioenergy and pharmacological intervention", *Mutation Research/DNAging*, **2753**, 195-208.
- Loukas, M., P. Youssef, J. Gielecki, J. Walocha, K. Natsis, and R. Tubbs, *History of cardiac anatomy: A comprehensive review from the Egyptians to today*. Vol. **29**. 2016.
- MACDONALD, R.S. (2000). "The role of zinc in growth and cell proliferation", *J Nutr*, **1305S Suppl**, 1500s-8s.
- MARET, W. (2013). "Zinc and human disease", *Met Ions Life Sci*, **13**, 389-414.
- MATSUURA, H. AND M.J. SHATTOCK. (1991). "Effects of oxidant stress on steady-state background currents in isolated ventricular myocytes", *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **2615**, H1358-H1365.
- MIURA, S., S.I. SAITOH, T. KOKUBUN, T. OWADA, H. YAMAUCHI, H. MACHII, AND Y. TAKEISHI. (2017). "Mitochondrial-Targeted Antioxidant Maintains Blood Flow, Mitochondrial Function, and Redox Balance in Old Mice Following Prolonged Limb Ischemia", *Int J Mol Sci*, **189**.
- MORIS, D., M. SPARTALIS, E. TZATZAKI, E. SPARTALIS, G.-S. KARACHALIOU, A.S. TRIANTAFYLLIS, G.I. KARAOLANIS, D.I. TSILIMIGRAS, AND S. THEOCHARIS. (2017). "The role of reactive

oxygen species in myocardial redox signaling and regulation", *Annals of Translational Medicine*, **516**.

NERBONNE, J.M. (2000). "Molecular basis of functional voltage-gated K⁺ channel diversity in the mammalian myocardium", *J Physiol*, **525 Pt 2**, 285-98.

NERBONNE, J.M. AND R.S. KASS. (2005). "Molecular physiology of cardiac repolarization", *Physiol Rev*, **854**, 1205-53.

NISHIKAWA, E., A.F.A. NETO, AND M.G.A. VIEIRA. (2012). "Equilibrium and Thermodynamic Studies of Zinc Adsorption on Expanded Vermiculite", *Adsorption Science & Technology*, **308-9**, 759-772.

NOHL, H., L. GILLE, AND K. STANIEK. (2005). "Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria", *Biochem Pharmacol*, **695**, 719-23.

NORTH, B.J. AND D.A. SINCLAIR. (2012). "The intersection between aging and cardiovascular disease", *Circulation research*, **1108**, 1097-1108.

OKATAN, E.N., E. TUNCAI, G. HAFEZ, AND B. TURAN. (2015). "Profiling of cardiac beta-adrenoceptor subtypes in the cardiac left ventricle of rats with metabolic syndrome: Comparison with streptozotocin-induced diabetic rats", *Can J Physiol Pharmacol*, **937**, 517-25.

OLGAR, Y., S. DEGIRMENCI, A. DURAK, D. BILLUR, B. CAN, G. KAYKI-MUTLU, E. ARIOGLU-INAN, AND B. TURAN. (2018). "Aging related functional and structural changes in the heart and aorta: MitoTEMPO improves aged-cardiovascular performance", *Exp Gerontol*, **110**, 172-181.

OLGAR, Y., et al. (2018). "Increased free Zn²⁺ correlates induction of sarco(endo)plasmic reticulum stress via altered expression levels of Zn²⁺ -transporters in heart failure", *J Cell Mol Med*, **223**, 1944-1956.

OLGAR, Y., N. OZTURK, C. USTA, P.E. PUDDU, AND S. OZDEMIR. (2014). "Ellagic Acid Reduces L-type Ca²⁺ Current and Contractility Through Modulation of NO-GC-cGMP Pathways in Rat Ventricular Myocytes", *J Cardiovasc Pharmacol*, **646**, 567-73.

OLGAR, Y. AND B. TURAN. (2018). "A SGLT2 inhibitor dapagliflozin comparison with insulin exerts important effects on Zn²⁺-transporters in cardiomyocytes from insulin-resistant metabolic syndrome rats through inhibition of oxidative stress", *Can J Physiol Pharmacol*.

OLIVETTI, G., M. MELISSARI, J.M. CAPASSO, AND P. ANVERSA. (1991). "Cardiomyopathy of the aging human heart. Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy", *Circ Res*, **686**, 1560-8.

OWADA, T., H. YAMAUCHI, S.I. SAITOH, S. MIURA, H. MACHII, AND Y. TAKEISHI. (2017). "Resolution of mitochondrial oxidant stress improves aged-cardiovascular performance", *Coron Artery Dis*, **281**, 33-43.

- OZTURK, N., Y. OLGAR, H. ER, M. KUCUK, AND S. OZDEMIR. (2017). "Swimming exercise reverses aging-related contractile abnormalities of female heart by improving structural alterations", *Cardiol J*, **241**, 85-93.
- PAWELEC, G., D. GOLDECK, AND E. DERHOVANESSIAN. (2014). "Inflammation, ageing and chronic disease", *Curr Opin Immunol*, **29**, 23-8.
- PAYNE, B.A. AND P.F. CHINNERY. (2015). "Mitochondrial dysfunction in aging: Much progress but many unresolved questions", *Biochim Biophys Acta*, **184711**, 1347-53.
- PRASAD, A.S. (2013). "Discovery of human zinc deficiency: its impact on human health and disease", *Adv Nutr*, **42**, 176-90.
- PRASAD, A.S., J.A. HALSTED, AND M. NADIMI. (1983). "Nutrition classics. The American Journal of Medicine, Volume 31, 1961. Syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism and geophagia", *Nutr Rev*, **417**, 220-3.
- RANKI, H.J., R.M. CRAWFORD, G.R. BUDAS, AND A. JOVANOVIC. (2002). "Ageing is associated with a decrease in the number of sarcolemmal ATP-sensitive K⁺ channels in a gender-dependent manner", *Mech Ageing Dev*, **1236**, 695-705.
- RAVEAUD, S., J. VERDETTI, AND G. FAURY. (2009). "Nicorandil protects ATP-sensitive potassium channels against oxidation-induced dysfunction in cardiomyocytes of aging rats", *Biogerontology*, **105**, 537-47.
- ROCHA, V.C., et al. (2016). "Protective effects of mito-TEMPO against doxorubicin cardiotoxicity in mice", *Cancer Chemother Pharmacol*, **773**, 659-62.
- RODEN, D.M. AND A.L. GEORGE, JR. (1997). "Structure and function of cardiac sodium and potassium channels", *Am J Physiol*, **2732 Pt 2**, H511-25.
- ROOHANI, N., R. HURRELL, R. KELISHADI, AND R. SCHULIN. (2013). "Zinc and its importance for human health: An integrative review", *J Res Med Sci*, **182**, 144-57.
- SCHIEBER, M. AND N.S. CHANDEL. (2014). "ROS function in redox signaling and oxidative stress", *Current biology: CB*, **2410**, R453-R462.
- SEBASTIAN, D., et al. (2012). "Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis", *Proc Natl Acad Sci U S A*, **10914**, 5523-8.
- SEBASTIÁN, D. AND A. ZORZANO. (2016). "When MFN2 (mitofusin 2) met autophagy: A new age for old muscles", *Autophagy*, **1211**, 2250-2251.
- SPINALE, F.G., et al. (1999). "Matrix metalloproteinase inhibition during the development of congestive heart failure: effects on left ventricular dimensions and function", *Circ Res*, **854**, 364-76.

- TERMAN, A. AND U.T. BRUNK. (2004). "Aging as a catabolic malfunction", *Int J Biochem Cell Biol*, **3612**, 2365-75.
- TERZIOGLU, M. AND N.G. LARSSON. (2007). "Mitochondrial dysfunction in mammalian ageing", *Novartis Found Symp*, **287**, 197-208; discussion 208-13.
- TOCCHI, A., E.K. QUARLES, N. BASISTY, L. GITARI, AND P.S. RABINOVITCH. (2015). "Mitochondrial dysfunction in cardiac aging", *Biochim Biophys Acta*, **184711**, 1424-33.
- TUNCAY, E., A. BILGINOGLU, N.N. SOZMEN, E.N. ZEYDANLI, M. UGUR, G. VASSORT, AND B. TURAN. (2011). "Intracellular free zinc during cardiac excitation-contraction cycle: calcium and redox dependencies", *Cardiovasc Res*, **893**, 634-42.
- TUNCAY, E., C.V. BITIRIM, Y. OLGAR, A. DURAK, G.A. RUTTER, AND B. TURAN. (2018). "Zn(2+)-transporters ZIP7 and ZnT7 play important role in progression of cardiac dysfunction via affecting sarco(endo)plasmic reticulum-mitochondria coupling in hyperglycemic cardiomyocytes", *Mitochondrion*.
- TUNCAY, E., V. BITIRIM, A. DURAK, G.A. RUTTER, AND B. TURAN. (2016). "362 - Both Reactive ROS and RNS Contribute to Intracellular Free Zn²⁺ Regulation in Cardiomyocytes Via Zinc Transporter ZIP7 Under Hyperglycemia", *Free Radic Biol Med*, **100**, S153.
- TUNCAY, E., V.C. BITIRIM, A. DURAK, G.R.J. CARRAT, K.M. TAYLOR, G.A. RUTTER, AND B. TURAN. (2017). "Hyperglycemia-Induced Changes in ZIP7 and ZnT7 Expression Cause Zn²⁺ Release From the Sarco(endo)plasmic Reticulum and Mediate ER Stress in the Heart", *Diabetes*, **665**, 1346-1358.
- TUNCAY, E., V.C. BITIRIM, A. DURAK, G.R.J. CARRAT, K.M. TAYLOR, G.A. RUTTER, AND B. TURAN. (2017). "Hyperglycemia-Induced Changes in ZIP7 and ZnT7 Expression Cause Zn(2+) Release From the Sarco(endo)plasmic Reticulum and Mediate ER Stress in the Heart", *Diabetes*, **665**, 1346-1358.
- TUNCAY, E., E.N. OKATAN, G. VASSORT, AND B. TURAN. (2013). "ss-blocker timolol prevents arrhythmogenic Ca(2)(+) release and normalizes Ca(2)(+) and Zn(2)(+) dyshomeostasis in hyperglycemic rat heart", *PLoS One*, **87**, e71014.
- TUNCAY, E. AND B. TURAN. (2016). "Intracellular Zn(2+) Increase in Cardiomyocytes Induces both Electrical and Mechanical Dysfunction in Heart via Endogenous Generation of Reactive Nitrogen Species", *Biol Trace Elem Res*, **1692**, 294-302.
- TURAN, B., H. FLISS, AND M. DESILETS. (1997). "Oxidants increase intracellular free Zn²⁺ concentration in rabbit ventricular myocytes", *Am J Physiol*, **2725 Pt 2**, H2095-106.
- TURAN, B. AND E. TUNCAY. (2017). "Impact of Labile Zinc on Heart Function: From Physiology to Pathophysiology", *Int J Mol Sci*, **1811**.
- VASA, M., K. BREITSCHOPF, A.M. ZEIHNER, AND S. DIMMELER. (2000). "Nitric oxide activates telomerase and delays endothelial cell senescence", *Circ Res*, **877**, 540-2.

- VINKENBORG, J.L., T.J. NICOLSON, E.A. BELLOMO, M.S. KOAY, G.A. RUTTER, AND M. MERKX. (2009). "Genetically encoded FRET sensors to monitor intracellular Zn²⁺ homeostasis", *Nat Methods*, **610**, 737-40.
- WANG, Q., H.H. ZHAO, J.W. CHEN, Q.L. HAO, K.D. GU, Y.X. ZHU, Y.K. ZHOU, AND L.X. YE. (2010). "delta-Aminolevulinic acid dehydratase activity, urinary delta-aminolevulinic acid concentration and zinc protoporphyrin level among people with low level of lead exposure", *Int J Hyg Environ Health*, **2131**, 52-8.
- WEL, J.Y. AND B.J. GERSH. (1987). "Heart disease in the elderly", *Curr Probl Cardiol*, **121**, 1-65.
- XIAO, R.P., H.A. SPURGEON, F. O'CONNOR, AND E.G. LAKATTA. (1994). "Age-associated changes in beta-adrenergic modulation on rat cardiac excitation-contraction coupling", *The Journal of clinical investigation*, **945**, 2051-2059.
- XIONG, S., et al. (2016). "Ameliorating Endothelial Mitochondrial Dysfunction Restores Coronary Function via Transient Receptor Potential Vanilloid 1-Mediated Protein Kinase A/Uncoupling Protein 2 Pathway", *Hypertension*, **672**, 451-60.
- ZHANG, Y.H. AND J.C. HANCOX. (2003). "A novel, voltage-dependent nonselective cation current activated by insulin in guinea pig isolated ventricular myocytes", *Circ Res*, **927**, 765-8.

EKLER

Ek 1: Etik kurul kararı



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI



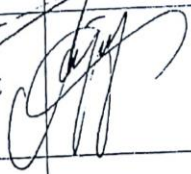

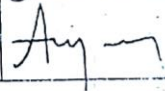
TOPLANTI TARİHİ : 21/09/2016
TOPLANTI NO : 2016-18
DOSYA NO : 2016-120
KARAR NO : 2016-18-165

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Belma Turan'nın yaptığı, araştırmacı olarak Prof.Dr.K.Can Akçalı, Arş.Gör Ayşegül Durak, Arş.Gör.Yusuf Olğar, Arş.Gör.Sinan Değirmenci ve Bio.Süleyman Tuştay'ın katıldığı "Çinko-taşıyıcıları ve Mitokondri ilişkisinin Yaşlanmaya Bağlı Kalp Fonksiyon Bozukluğundaki Rolünün İncelenmesi" başlıklı araştırma projesinin içeriği Kurulumuzca incelenmiş olup, söz konusu çalışmanın Üniversite Senatosunun 12/2/2016 tarihli toplantısında 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi"ne göre aşağıda belirtilen kapsamda yapılmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Sığır
Hayvan Sayısı : 60
Geçerlilik Süresi : 01/01/2017-01/01/2019

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof.Dr.M.Taner KARAOĞLU (Başkan)	Viroloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY (Başkan Vekili)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof.Dr.Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	F	
Prof.Dr.Fatih CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	
Prof.Dr.Mine KIRKAĞAÇ (Üye)	Su Ürünler Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	K	
Prof.Dr.Emine DEMİREL YILMAZ (Üye)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Yrd.Doç.Dr.Mehmet SAĞLAM (Üye)	Cerrahi Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	

Adres: Ankara Üniversitesi Rektörlüğü 06100 - Tandoğan/ANKARA Telefon : 0 (312) 212 60 40 / 2101 Faks : 0 (312) 212 60 49

Yrd.Doç.Dr.Atilla ÖZGÜR (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Yrd.Doç.Dr.Gülnur GÖLLÜ BAHADIR (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Uzm.Vet.Hek.Atilla İŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E	
Vet.Hek.Dr.Akife KAYA (Üye)	Referans Veteriner Kliniği	Serbest	K	
Uzm.Vet.Hek.Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Demegi	Serbest	E	
Fatma Aysun ÇOSKUN (Üye)	İktisat	Serbest	K	

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : Yusuf

Soyadı : OLĞAR

Doğum yeri ve tarihi : Antakya-1987

Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti

Medeni durumu : Evli

Askerlik Durumu : Muaf

İletişim adresi ve telefonu : yusuf.olgar@ankara.edu.tr, volgar52@gmail.com. Gsm: 0(539) 912 99 54

II- Eğitimi

- Doktora Programı, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik A.B.D
- Yüksek Lisans Programı, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik A.B.D
- Lisans Programı, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yabancı dili

- Yökdil 2017: 87,5
- YDS 2014: 76,25

III- Ünvanları

- Araştırma Görevlisi

IV- Mesleki Deneyimi

- Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik A.B.D.; Araştırma Görevlisi (2015-)
- Hipertrofik Kardiyomiyositlerde 3 Adrenerjik Reseptör Aktivasyonunun Hücre İçi Ca²⁺ ve Na Hemostazları Üzerindeki Olası Rolünün İncelenmesi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı, 15/04/ 2015 (ULUSAL)

- Hipertrofik kalp yetmezliği modelinde Rho kinaz ın rolünün elektrofizyolojik yöntemlerle incelenmesi, TÜBİTAK PROJESİ, Bursiyer., 15/01/ 2014 - 15/03/ 2016 (ULUSAL)

V- Üye Olduğu Bilimsel Kurulular

- Türk Biyofizik Derneği
- Biophysical Society

VI- Bilimsel Etkinlikleri

Yayımlar

- TOY AYŞEGÜL, **OLĞAR YUSUF**, DEĞİRMENCİ SİNAN, AKKUŞ ERMAN, TUNCAY ERKAN, TURAN BELMA (2018). A SGLT2 inhibitor dapagliflozin suppresses prolonged ventricular-repolarization through augmentation of mitochondrial function in insulin-resistant metabolic syndrome rats. *Cardiovascular Diabetology*, 17(1), Doi: 10.1186/s12933-018-0790-0 (Yayın No: 4501346)
- **OLĞAR YUSUF**, DEĞİRMENCİ SİNAN, DURAK AYSEGUL, BİLLUR DENİZ, CAN BELGİN, KAYKI MUTLU GİZEM, ARIOĞLU İNAN EBRU, TURAN BELMA (2018). Aging related functional and structural changes in the heart and aorta: MitoTEMPO improves aged-cardiovascular performance. *Experimental Gerontology*, 110, 172-181., Doi: 10.1016/j.exger.2018.06.012 (Yayın No: 4309419)
- **OLĞAR YUSUF**, DEĞİRMENCİ SİNAN, TOY AYŞEGÜL, BİLLUR DENİZ, CAN BELGİN, KAYKI MUTLU GİZEM, ARIOĞLU İNAN EBRU, TURAN BELMA (2018). Aging related functional and structural changes in the heart and aorta: MitoTEMPO improves aged-cardiovascular performance. *Experimental Gerontology*, 110, 172-181., Doi: 10.1016/j.exger.2018.06.012 (Yayın No: 4343388)
- DEĞİRMENCİ SİNAN, **OLĞAR YUSUF**, TOY AYŞEGÜL, TUNCAY ERKAN, TURAN BELMA (2018). Cytosolic increased labile Zn 2 contributes to arrhythmogenic action potentials in left ventricular cardiomyocytes through protein thiol oxidation and cellular ATP depletion. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 48, 202-212., Doi: 10.1016/j.jtemb.2018.04.014 (Yayın No: 4269532)
- **OLĞAR YUSUF**, ÖZDEMİR SEMİR, TURAN BELMA (2018). Induction of endoplasmic reticulum stress and changes in expression levels of Zn2-transporters in hypertrophic rat heart. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 440(1-2), 209-219., Doi: 10.1007/s11010-017-3168-9 (Yayın No: 3635458)
- **OLĞAR YUSUF**, ÇELEN MURAT CENK, YAMASAN BİLGE EREN, ÖZTÜRK ERBOĞA NİHAL, TURAN BELMA, ÖZDEMİR SEMİR (2017). Rho-kinase inhibition reverses impaired Ca 2 handling and associated left ventricular dysfunction in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Cell Calcium*, 67, 81-90, Doi: 10. 1016/ j.ceca.2017.09.002 (Yayın No: 3903017)
- TOY AYŞEGÜL, **OLĞAR YUSUF**, TUNCAY ERKAN, KAYKI MUTLU GİZEM, KARAÖMERLİOĞLU İREM, ARIOĞLU İNAN EBRU, TURAN BELMA, ALTAN VECDİ MELİH (2017). Onset of decreased heart work is correlated with increased heart rate and shortened QT interval in high-carbohydrate fed overweight rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 95(11), 1335-1342., Doi: 10.1139/cjpp-2017-0054 (Yayın No: 3651732)

- KANTAR GÖK DENİZ, HİDİŞOĞLU ENİS, ER HAKAN, ACUN ALEV DUYGU, **OLĞAR YUSUF**, YARGIÇOĞLU AKKİRAZ PİRAYE (2017). Changes of auditory event-related potentials in ovariectomized rats injected with d -galactose: Protective role of rosmarinic acid. *NeuroToxicology*, 62, 64-74, Doi: 10. 1016/j.neuro.2017.05.003 (Yayın No: 3651709)
- ÖZTÜRK ERBOĞA NİHAL, **OLĞAR YUSUF**, ER HAKAN, KÜÇÜK MURATHAN, ÖZDEMİR SEMİR (2017). Swimming exercise reverses aging-related contractile abnormalities of female heart by improving structural alterations. *Cardiology Journal*, 24(1), 85-93., Doi: 10.5603/CJ.a2016.0069 (Yayın No: 3181528)
- ÖZTÜRK ERBOĞA NİHAL, **OLĞAR YUSUF**, AYDIN ASLAN MUTAY, ÖZDEMİR SEMİR (2016). Effects of magnesium supplementation on electrophysiological remodeling of cardiac myocytes in L NAME induced hypertensive rats. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 48(4), 425-436., Doi: 10.1007/s10863-016-9666-8 (Yayın No: 2880446)
- BİLLUR DENİZ, TUNCAY ERKAN, OKATAN ESMA NUR, **OLĞAR YUSUF**, TOY AYŞEGÜL, DEĞİRMENCİ SİNAN, CAN BELGİN, TURAN BELMA (2016). Interplay Between Cytosolic Free Zn2 and Mitochondrion Morphological Changes in Rat Ventricular Cardiomyocytes. *Biological Trace Element Research*, 174(1), 177-188. Doi: 10. 1007/s12011-016-0704-5 (Yayın No: 3048107)
- KÜÇÜK MURATHAN, ÇELEN MURAT CENK, YAMASAN BİLGE EREN, **OLĞAR YUSUF**, ÖZDEMİR SEMİR (2015). Effects of Ticagrelor on Ionic Currents and Contractility in Rat Ventricular Myocytes. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 29(5), 419-424. Doi: 10.1007/s10557-015-6617-2 (Yayın No: 1906755)
- **OLĞAR YUSUF**, HİDİŞOĞLU ENİS, ÇELEN MURAT CENK, YAMASAN BİLGE EREN, YARGIÇOĞLU AKKİRAZ PİRAYE, ÖZDEMİR SEMİR (2015). 2 1 GHz electromagnetic field does not change contractility and intracellular Ca2 transients but decreases adrenergic responsiveness through nitric oxide signaling in rat ventricular myocytes. *International Journal of Radiation Biology*, 91(10), 851-857., Doi: 10.3109/09553002.2015.1068462 (Yayın No: 1906548)
- **OLĞAR YUSUF**, USTA COŞKUN, ÖZTÜRK ERBOĞA NİHAL, ÖZDEMİR SEMİR, (2014). Ellagic Acid Reduces L type Ca2 Current and Contractility Through Modulation of NO GC cGMP Pathways in Rat Ventricular Myocytes. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 64(6), 567-573., Doi: 10.1097/FJC.000000000000153 (Yayın No: 1907215)
- ÖZTÜRK ERBOĞA NİHAL, **OLĞAR YUSUF**, ÖZDEMİR SEMİR (2013). Trace elements in diabetic cardiomyopathy An electrophysiological overview. *World Journal of Diabetes*, 4(4), 92, Doi: 10. 4239/wjd.v4.i4.92 (Yayın No: 1907825)
- AYDEMİR MUSTAFA, ÖZTÜRK ERBOĞA NİHAL,, **OLĞAR YUSUF**, AYDIN ASLAN MUTAY ÖZDEMİR SEMİR, (2012). Sodium Tungstate Administration Ameliorated Diabetes Induced Electrical and Contractile Remodeling of Rat Heart without Normalization of Hyperglycemia. *Biological Trace Element Research*, 148(2), 216-223., Doi: 10.1007/s12011-012-9350-8 (Yayın No: 1907478)

Bildiriler:

- **OLĞAR YUSUF**, DEĞİRMENCİ SİNAN, TOY AYŞEGÜL, TURAN BELMA (2018). Mitochondria-Targeted Antioxidants in Aging related functional changes in the heart and aorta: MitoTEMPO improves aged-cardiovascular performance. 13 th Conference on Mitochondrial Physiology MIP2018/ MitoEAGLE (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:4372636)
- TUNCAY ERKAN, BİTİRİM CEYLAN VERDA, **OLĞAR YUSUF**, TOY AYŞEGÜL, TURAN BELMA (2018). REGULATION OF MITOCHONDRIAL ZN2 LEVEL BY ZN2 TRANSPORTER ZIP7 EFFECTS SARCO(ENDO)PLASMIC RETICULUM S(E)R-MITOCHONDRIA COUPLING IN

HYPERGLYCEMIA. 13 th Conference on Mitochondrial Physiology MİP2018/ MitoEAGLE (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:4372619)

- BAYRAM PINAR, BİLLUR DENİZ, KIZIL ŞULE, ÇALIŞKAN HASAN, CAN BELGİN, TOY AYŞEGÜL, **OLĞAR YUSUF**, TURAN BELMA (2018). High Sucrose Diet Affects Memory and Learning. 1st International Food and Medicine Congress (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:4283633)
- KIZIL ŞULE, BAYRAM PINAR, NAKKAŞ HİLAL, BİLLUR DENİZ, TOY AYŞEGÜL, **OLĞAR YUSUF**, TURAN BELMA, CAN BELGİN (2018). High-Carbohydrate Diet-Induced Insulin Resistance Causes Apoptosis at Rats' Cortical Neurons. 1st International Food and Medicine Congress (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4283622)
- TOY AYŞEGÜL, **OLĞAR YUSUF**, TUNCAY ERKAN, TURAN BELMA (2018). b3-Adrenergic Receptor Regulation of Cardiac Ion Channels in Overweight Insulin Resistant Rats. 62th Annual Meeting Biophysical Society (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4188955)
- ÖZDEMİR SEMİR, YAMASAN BİLGE EREN, **OLĞAR YUSUF**, TURAN BELMA (2017). The Role of Rhoa/ROCK Pathway in Impaired Ca₂ Homeostasis of Hypertrophic Heart. Association of Thrace Universities 1st International Health Sciences Congress (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:3903705)
- ALYU TEKEŞ FEYZA, **OLĞAR YUSUF**, ÖZTÜRK YUSUF, TURAN BELMA (2017). CARDIOVASCULAR SAFETY EVALUATION OF SIBUTRAMINE IN A METABOLIC SYNDROME MODEL VIA PATCH CLAMPTECHNIQUE. 2TH İNTERNATIONAL GAZİ SYMPOSIUM SERIES (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:3757269)
- TUNCAY ERKAN, BİTİRİM CEYLAN VERDA, **OLĞAR YUSUF**, TOY AYŞEGÜL, RUTTER G A, TURAN BELMA (2017). Mitochondrial localization and function of Zn²-transporters ZIP7 and ZnT7 in mammalian heart. 34th Annual Meeting, European Section of the International Society for Heart Research, 109, 1-62, Doi: 10.1016/j.yjmcc.2017.06.002 (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:3561983)
- TOY AYŞEGÜL, TURAN BELMA, **OLĞAR YUSUF** (2017). Expression levels of zinc transporters in human failing heart. 34th Annual Meeting of the European Section of the International Society for Heart Research (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:3653274)
- DEĞİRMENCİ SİNAN, **OLĞAR YUSUF**, TUNCAY ERKAN, TURAN BELMA (2017). Increased cytosolic free Zn² alters action potential parameters via activation of KATP-channels in rat ventricular cardiomyocytes. 34th Annual Meeting, European Section of the International Society for Heart Research, 109, 1-62., Doi: 10.1016/j.yjmcc.2017.06.002 (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:3561936)
- **OLĞAR YUSUF**, TOY AYŞEGÜL, tuncay erkan, TURAN BELMA, ÖZDEMİR SEMİR (2017). The Zn² transporters in hypertrophied rat heart. 34th Annual Meeting, European Section of the International Society for Heart Research, July 24–27, 2017, Hamburg, Germany (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:3651645)
- ARIOĞLU İNAN EBRU, TOY AYŞEGÜL, **OLĞAR YUSUF**, tuncay erkan, KAYKI MUTLU GİZEM, KARAÖMERLİOĞLU İREM, ALTAN VECDİ MELİH, TURAN BELMA (2017). altered heart function in high sucrose-fed overweight rats: in vivo and in vitro investigations. DCVD Annual meeting (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:3826727)
- KOÇER GÜNNUR, ÖZTÜRK ERBOĞA NİHAL, **OLĞAR YUSUF**, ÜLKER SEHER, ÖZDEMİR SEMİR (2017). THE CONTRIBUTION OF SWIMMING EXERCISE TO CARBON MONOXIDE RELAXATION RESPONSES IN AGED RATS. SANKO University Innovation in Medicine Summit-3, 11th-13th May 2017, Gaziantep, Turkey. (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:3766910)

- TOY AYŞEGÜL, **OLĞAR YUSUF**, TUNCAY ERKAN, BİTİRİM VERDA CEYLAN, ÖZÇINAR EVREN, İNAN MUSTAFA BAHADIR, AKÇALI KAMİL CAN, ÖZDEMİR SEMİR, AKAR AHMET RÜÇHAN, TURAN BELMA (2017). Role of Zinc Transporters in Mammalian Heart under Physiological and Pathological Conditions. Biophysical Society 61st Annual Meeting, 112(3), 538-538. (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:3445639)
- TOY AYŞEGÜL, **OLĞAR YUSUF**, Tuncay Erkan, Bitirim Verda C, ÖZÇINAR EVREN, İNAN MUSTAFA BAHADIR, AKÇALI KAMİL CAN, ÖZDEMİR SEMİR, AKAR AHMET RÜÇHAN, TURAN BELMA (2017). Role of zinc transporters in mammalian heart under physiological and pathological conditions. Biophysical Society 61st Annual meeting, 112(3), 538, Doi: 10.1016/j.bpj.2016.11.2910 (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:3762099)
- ÇELEN MURAT CENK, YAMASAN BİLGE EREN, **OLĞAR YUSUF**, ÖZDEMİR SEMİR (2016). Inhibition of Rho Kinase ROCK Restores Ionic Currents and Prevents Electrical Remodelling of Heart in Pressure Overload Induced Hypertrophy Model. 2016 XXII ISHR WORLD CONGRESS (Yayın No:3064240)
- **OLĞAR YUSUF**, TUNCAY ERKAN, TOY AYŞEGÜL, DEĞİRMENCİ SİNAN, BİLLUR DENİZ, CAN BELGİN, TURAN BELMA (2016). AN IN VITRO STUDY ON REGULATION OF INTRACELLULAR FREE Zn²⁺ IN VENTRICULAR CARDIOMYOCYTES. the COST action for zinc biology (Yayın No:3047765)
- TOY AYŞEGÜL, **OLĞAR YUSUF**, DEĞİRMENCİ SİNAN, TUNCAY ERKAN, TURAN BELMA (2016). An Investigation on Electrical Activity and Sarcolemmal K Channels in Cardiomyocytes from Insulin Resistant Rat Heart. 60. ANNUAL MEETING BIOPHYSICAL SOCIETY (Yayın No:3065833)
- **OLĞAR YUSUF**, TUNCAY ERKAN, TURAN BELMA (2016). AGE RELATED CHANGES IN ELECTRICAL ACTIVITIES AND MICRORNAs OF LEFT VENTRICULAR CARDIOMYOCYTES ISOLATED FROM RAT HEART. 60TH ANNUAL MEETING BIOPHYSICAL SOCIETY (Yayın No:3065610)
- DEĞİRMENCİ SİNAN, **OLĞAR YUSUF**, TOY AYŞEGÜL, TURAN BELMA (2016). Both Hyperglycemia and Hyperinsulinemia Induce Changes in Voltage Dependent K Channel Currents in H9c2 Ventricular Cells. 60TH ANNUAL MEETING BIOPHYSICAL SOCIETY (Yayın No:3065914)
- ÇELEN MURAT CENK, **OLĞAR YUSUF**, YAMASAN BİLGE EREN, ÖZDEMİR SEMİR (2015). acute effect of Rosuvastatin on electrophysiological parameters of rat cardiomyocyte. international society for heart research (Yayın No:2123149)
- **OLĞAR YUSUF** (2015). action of antioxidant ellagic acid on contractility and calcium currents in cardiomyocytes. training course on redox biology in health and disease (Yayın No:1954390)
- ÖZDEMİR SEMİR, **OLĞAR YUSUF**, ÇELEN MURAT CENK, YAMASAN BİLGE EREN, ÖZTÜRK ERBOĞA NİHAL (2015). effects of rho kinase inhibition on pressure overload induced cardiac hypertrophy and contractile dysfunction in rat. international society for heart research (Yayın No:2123592)

Katıldığı Bilimsel Toplantı ve Kurslar

- COST-MITOEAGLE (Letonya); Sözlü sunum; 2018
- Uluslararası Kardiyoloji toplantısı (KÜBA); Poster Sunumu; 2018
- COST-MITOEAGLE (çek cumhuriyeti); PosterSunumu; 2017
- ISHR Dünya Kongresi (Almanya); Poster Sunumu; 2017
- 28-29. Ulusal Biyofizik Kongresi (İstanbul); Sözlü Sunum; 2017
- Mass Spectrometry Training School (İspanya); Kurs Katılım; 2017
- 27. Ulusal Biyofizik Kongresi (Malatya); Poster Sunumu; 2015
- Zinc-Net COST Action TD1304 (Antalya); Workshop; 2015
- Training course on redox biology in health and disease (İspanya); Sözlü Sunum; 2015
- Ulusal Biyofizik Kongresi (KTÜ); Poster Sunumu; 2013