

N-asetilsisteinle Ön-muamele Edilmiş Kardiyomyositlerden Salgılanan Eksozomların Yaşlanmaya Bağlı ROS Üretimi Üzerindeki Etkisi

Effect of Exosomes Secreted from N-acetylcysteine Pretreated Cardiomyocytes on Aging-induced ROS Production

© Ceylan Verda Bitirim¹, © Kardelen Genç¹, © Zeynep Özer¹, © Belma Turan²

¹Ankara Üniversitesi Kök Hücre Enstitüsü, Ankara, Türkiye

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

Öz

Amaç: Bu çalışmada bir antioksidan olan N-asetilsisteinin (NAC), kardiyomyositlerden salınan eksozomlar aracılığı ile kardiyomyositlerde yaşlanmaya bağlı artan reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi ve mitokondri membran potansiyeli (MMP) üzerindeki düzenleyici etkisinin moleküler düzeyde incelenmesi hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Yaşlanma modeli, sıçan sol ventrikül hücre hattı H9c2'leri D-galaktoz (D-Gal; 50 mg/mL) ile 48-saat inkübasyon yapılarak gerçekleştirilmiştir. NAC ile ön-muamele tabii tutulan sağlıklı H9c2'lerden salınan eksozomlar yaşlı kardiyomyositler ile inkübe edilerek, yaşlanma ile artan ROS üretimindeki artışa ve MMP depolarizasyonuna etkileri hem normal kontrol hücreleri ve hem de eksozom verilmemiş yaşlı hücrelerle karşılaştırılarak incelenmiştir. ROS ve MMP ölçümleri spesifik floresan boyalar (DCFDA ve FCCP) kullanılarak konfokal mikroskopunda floresan şiddetinde değişim olarak görüntülenerek bağlı olarak hesaplanmıştır. ROS belirteci olarak da kabul edilen miR-21 ifadesi, eksozomal miRNA izolasyonunu takiben yapılan cDNA sentezi qRT-PCR ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: Yaşlanma modeli oluşturulmuş kardiyomyositlerin, NAC ile inkübe edilmiş H9c2'lerden izole edilen eksozomlar ile 72-saat inkübasyonu yaşlanmaya bağlı artan ROS üretiminin belirgin şekilde baskılanmasına, depolarize olan MMP'nin normalize olmasına neden olmaktadır. Diğer yandan, NAC muamelesi normal sağlıklı kardiyomyositlerde eksozomal miR-21 ifadesini anlamlı olarak baskılamaktadır.

Sonuç: Bu bulgular ışığında, kalp hasar tedavisinde kullanılan ROS hedefli ajanların eksozom-temelli parakrin bir mekanizma aracılığı ile kontrolsüz olarak artan mitokondriyon kaynaklı ROS üretiminin spesifik bir şekilde baskılıyor olabileceğini işaret etmektedir. Çalışmamız, ayrıca, literatürde ilk kez olmak üzere, NAC ile ön-muamele edilmiş kardiyomyositlerde eksozomal miRNA modülasyonuna neden olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, antioksidan sistemi kuvvetlendirilmiş kardiyomyositlerden elde edilen eksozom uygulamasının yaşlanmaya bağlı yetersiz kalp fonksiyonu için yeni bir tedavi yaklaşımı olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Yaşlanma, Kardiyomyosit, Eksozom, Antioksidan, N-asetilsistein, miR-21

Abstract

Objectives: In this study, it was aimed to investigate the regulatory effect of N-acetylcysteine (NAC), an antioxidant, on the aging-related reactive oxygen species (ROS) production and mitochondrial membrane potential (MMP) in cardiomyocytes via exosomes released from cardiomyocytes at the molecular level.

Materials and Methods: The aging model was performed by incubating rat left ventricular cell line H9c2 with D-galactose (D-Gal; 50 mg/mL) for 48 hours. Exosomes released from H9c2 pretreated with NAC were incubated with aged cardiomyocytes and their effects on the enhanced ROS production and MMP depolarization with aging were compared with both normal control cells and aged cells without exosomes. ROS and MMP

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Ceylan Verda Bitirim

Ankara Üniversitesi Kök Hücre Enstitüsü, Ankara, Türkiye

Tel.: +90 535 612 67 96 E-posta: ceylanverda@gmail.com ORCID ID: orcid.org/0000-0002-7979-0679

Geliş Tarihi/Received: 19.09.2021 Kabul Tarihi/Accepted: 01.12.2021

©Telif Hakkı 2022 Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, Galenos Yayınevi tarafından yayınlanmıştır.

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



measurements were calculated relative to the confocal microscope using specific fluorescent dyes (DCFDA and FCCP) by visualizing the change in fluorescence intensity. MiR-21 expression, which is also accepted as a ROS marker, and cDNA synthesis qRT-PCR measurements were performed following exosomal miRNA isolation.

Results: Seventy-two-hour incubation of aging-modeled cardiomyocytes with exosomes isolated from H9c2 incubated with NAC significantly suppresses the increased ROS production associated with aging and normalizes depolarized MMP. On the other hand, NAC treatment significantly suppressed exosomal miR-21 expression in normal healthy cardiomyocytes.

Conclusion: These findings indicate that ROS-targeted agents used in the treatment of heart damage may specifically suppress mitochondrion-derived ROS production, which increases uncontrollably through an exosome-based paracrine mechanism. Our study also demonstrates, for the first time in the literature, that NAC induces exosomal miRNA modulation in pretreated cardiomyocytes. These findings indicate that the administration of exosomes obtained from cardiomyocytes with enhanced antioxidant system is a new treatment approach for aging-related inadequate heart function.

Key Words: Aging, Cardiomyocyte, Exosome, Antioxidant, N-acetylcysteine, miR-21

Giriş

Yaşlanmaya bağlı kalpte gözlenen ve kademeli olarak artan bir şekilde yapısal ve fonksiyonel bozulmaların ana nedeni arasında önemli sırada mitokondrion fonksiyon bozukluğu yer almaktadır. Bu bozulmalarda artan reaktif oksijen türlerinin (ROS) önemli rol oynadığı bilinmektedir (1-4). Hücre içi başlıca ROS üretim kaynağı olan mitokondrionlar, bu nedenle yaşlanma sürecinin merkezi denetleyicisi olarak kabul edilmektedir (1). Yaşlanma fizyolojik bir süreç olmasına karşın, kardiyovasküler yaşlanma kalp hastalıkları için en önemli risk faktörleri arasındadır. Deneysel çalışmalara göre, yaşlı sıçan kalplerinde, artan mitokondrion ROS üretimiyle birlikte, ATP düzeyinde önemli seviyede azalma ve mitokondrion membran potansiyelinde depolarizasyon gerçekleşmektedir. Bu değişimlerle birlikte, hem mitokondrionlarda ve hem de sitozolde önemli seviyelerde serbest Ca^{+2} artışı (Ca^{+2} -overload) gerçekleşmektedir (5-7). Ayrıca, artan ROS kaynaklı yükselen oksidatif strese paralel olarak hücrelerde otofaji, kronik enflamasyon ve mitokondrion-DNA instabilitesi mitokondrion fonksiyon bozukluğu ile birlikte kalpte yaşlanma ile ilişkili patofizyolojik olaylardır (8-10). Tüm bu bulgular, başlıca artan ROS üretiminin yaşlanma sürecindeki rolünü ve intra-mitokondrion ROS üretiminin yaşlanmanın ana belirleyicisi olduğunu işaret etmektedir (11,12). Özet olarak, kontrolsüz mitokondrion kaynaklı ROS üretiminin spesifik ve seçici bir şekilde engellenmesi, sağlıklı yaşlanma için umut verici bir terapötik strateji gibi görünmektedir.

İyi bilinen güvenli bir antioksidan kimyasal ajan olan N-asetilsistein (NAC), hücre redoks durumunun öncüsüdür. Klinik ve deneysel çalışmalarla güçlü bir antioksidan olduğu gösterilen NAC'nin, anti-oksidant etkisi, redükte glutatyon öncüsü olmasına ve aynı zamanda direkt olarak serbest radikalleri toplayabilmesine bağlanmaktadır (13-15). Daha önce parasetamol panzehiri olarak kullanılan NAC, son zamanlarda klinik uygulamalarda antioksidant olarak çeşitli endikasyonlarda uygulanmaya başlamıştır. Anti-enflamatuvar ve anti-oksidant özelliklere sahip NAC'nin, dilate kardiyomiyopati, diyabetik

kardiyomiyopati, idiyopatik pulmoner fibroz (16), iskemik repüfüzyona bağlı kalp hasarı ve kalpte enflamasyon gibi birçok kalp hasarında faydalı bir ajan olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (13,17,18). Yapılan çalışmalarda NAC, artan ROS üretimini durdurarak, sol ventrikülde gözlenen miyokard fibrozunun azalmasını sağlayan güçlü bir anti-oksidant olduğu gösterilmiştir (17,19). Monokrotalin ile indüklenmiş sıçanlarda pulmoner hipertansiyon modelinde NAC tedavisinin, pulmoner vasküler sisteminde yeniden şekillenme ve akciğer enflamasyonu ile kardiyomiyosit hipertrofisini ve fibroz oluşumunu önemli derecede azalttığı ve sağ ventrikülde bozulmuş olan hemodinamik parametrelerin önemli derecede düzelmesine neden olduğu gözlenmiştir (19). Bunlara ek olarak, NAC'nin kalpte hiperglisemiye bağlı mitokondrion kaynaklı ROS üretimini baskılayarak, diyabetik kardiyomiyopati üzerinde pozitif etkiler oluşturduğu da bilinmektedir (20). Deneysel ortamlarda, NAC'nin oksidatif hasarı önlediği bilinmekle birlikte, memeli kardiyomiyositlerinde artan hücre içi ROS üretiminin önlenmesinin, hangi moleküler mekanizmalar üzerinden gerçekleştiği tam olarak aydınlatılamamıştır.

Ekstraselüler veziküllerin bir grubu olan eksozomlar, taşıdıkları kompleks protein kargoları ve genetik materyaller sayesinde son yıllarda ideal terapötik ajanlar olarak kabul edilmektedirler. Eksozomlar endotel kaynaklı hücreler olup, fibroblastlar, kardiyomiyositler ve düz kas hücreleri arasında molekül transferi yaparak birden çok sinyal yolağını aktive eden mesajcılar gibi davranabilmektedirler (21). Eksozomların pro-anjiyojenik, pro-miyojenik, proliferatif ve anti-apoptotik rollerinin anlaşılması, bu mekanizmalarda rol alan eksozomal kargoların tesbiti ve modülasyonu, eksozomların kalp hasarı tedavisinde çok daha etkin bir şekilde kullanılmasına neden olduğu işaret edilmektedir (22). Bununla birlikte, eksozomal kargo içeriğinin, buldukları hücrelerin ekzojenik faktörler ile ön-muamelesi sonucu değiştirilebildiği, eksozomal parakrin etkinin bu eksozomal içerik profiline bağlı olarak etki gösterdiği bilinmektedir (22,23). MicroRNA'ların (miRNA) en temel taşınma yolu eksozomlar ve mikroveziküller aracılığı ile olmaktadır. Bununla birlikte, eksozomal kargo içeriğinin, hipoksik ortama

maruz bırakma gibi fiziksel ön muamelelere ek olarak hücrel resptörlerin aktivasyonuna yol açan indükleyici bir ekzojen faktör hücrelerin inkübasyonunun kalp hasarı tedavisinde klinik olarak da kullanılan mezenkimal kök hücre ve kardiyak kök hücrelerin eksozomal miRNA repertuarını içeriğini kardiyoprotektif, anti-apoptotik ve anti-enflamatuvar yönde etkilediğini göstermektedir (21).

Hipoksik ön-mumaleye tabi tutulmuş kardiyak kök hücrelerden salgılanan eksozomların, miyokard enfarktüsü oluşturulmuş sıçan modellerine enjeksiyonu sonucu, ön-mumaleye tabi tutulmayanlara oranla iskemik dokunun küçülmesi, anjiyogenezisin ve kalp fonksiyonunun iyileşmesi üzerinde anlamlı olarak daha yoğun düzenleyici etkileri gözlenmiştir (23). Eksozom tedavisindeki sınırlama, eksozomların rejeneratif özelliklerinin ve bu özelliklerin nasıl aktive edilebileceğinin anlaşılmasındadır. Özellikle NAC'nin eksozomal-parakrin mekanizmalar aracılığı ile kalp yaşlanması üzerinde tedavi edici olarak nasıl rol alabileceğine ilişkin herhangi bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Bu nedenle ve bulgular bilinenler ışığında, çalışmamızda NAC'nin eksozomal miRNA modülasyon yoluyla, kardiyomyositlerde yaşlanmaya bağlı artan ROS üretimi ve depolarize mitokondri üzerindeki düzenleyici etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir. Yapılan çalışmalar çok sayıda miRNA'nın farklı şekilde eksprese edildiği ve kardiyak yaşlanma sırasında yolakları düzenlediği açıklanmıştır (24). Bunların arasında özellikle miR-21'in ROS homeostazını bozarak oksidatif strese duyarlılığı artırmadaki rolü gösterildiği için (25) çalışmamızda NAC muamlesinin eksozomal miR-21 ifadesindeki etkileri incelenmiştir.

Bulgularımız, NAC ile ön-mumalenin kardiyomyositlerden salgılanan eksozomları modüle edebileceğini ve eksozom-aracılı parakrin etki ile ROS üretimini önleyebileceğini ve/veya geri döndürebileceğini işaret etmiştir.

Gereç ve Yöntem

Hücre Kültürü ile İşlemler

Çalışmada kullanılan sıçan sol ventrikül hücre hattı H9cS, %1 penisilin-streptomisin ve %10 FBS içeren DMEM-düşük-glukoz besi yeri içerisinde büyütülmüştür. Yaşlanma modeli, daha önceki çalışmamızda açıklanmış olduğu gibi H9cS hücrelerinde 50 mg/mL D-Gal ile 48 saat boyunca inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir (1). Eksozom izolasyonu yapılacak H9cS hücreleri ise 1 uM NAC ile 72 saat süre ile serumsuz ortamda inkübe edilmiştir.

Eksozom İzolasyonu

H9cS hücrelerinin NAC varlığında 72 saat kültür ortamında inkübasyonunu takiben, hücre besi yerleri toplanarak eksozom izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolasyonda kolon ile ayrıştırma metodu qEV kolon sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir

(26). Kolondan elde edilen eksozom fazını yoğunlaştırmak için 100.000 xg'de ve 4 °C'de 1-saat santrifüj edilerek eksozom pelleti çöktürülmüştür. Eksozom pelletleri 1 mL 1xPBS içinde çözümlenerek MicroBCA assay kiti (Thermo) ile var olan eksozom konsantrasyonu ölçülmüştür.

İzole Eksozomların Kantitasyonu ve Karakterizasyonu

Eksozom karakterizasyonu, akış sitometri analizi ile gerçekleştirildi. Eksozomlar, CD9 antikoru (Biolegend, SanDiego, Cat no: 312102) ile kaplanmış manyetik boncuklarla inkübe edildi. Eksozom-manyetik boncuk karışımı, PE-konjuge anti-insan CD81 antikoru (Biolegend, SanDiego, Kat no: 104905) ile saptandı. İzole edilmiş eksozomların boyut dağılımı ve niceliği de qNanoGold (Izon Science, Polonya) kullanılarak ölçüldü. Eksozom örnekleri için, <100 nm (NP100-, Izon Science, UK) partiküller için derecelendirilmiş bir poliüretan nanopor kullanılmıştır. Eksozomların konsantrasyonu, MicroBCA tahlili (Thermo Fisher) ile değerlendirilmiştir. Dil veya PKH26 gibi floresans boyalar ile işaretlenmiş eksozomların hücreler tarafından internalizasyonunun konfokal mikroskopu ile gösterimi literatürdeki çalışmalarda gösterilmiştir (27). Çalışmamızda da dil boyası ile işaretlenmiş eksozomların hücre içerisine alınması konfokal mikroskop (Zeiss) ile görselleştirilmiştir. 10 ug/mL eksozom son hacmi 200 uL olacak şekilde 1X PBS içinde çözülmüş ve 2677 uM konsantrasyondaki stok Dil boyasından 0,747 uL boya eklenerek Rotatorda 1 saat oda sıcaklığında, karanlıkta inkübe edilmiştir. On iki-kuyucuklu tabaklar içine yerleştirilmiş lamellere 3×10^5 /mL konsantrasyonda ekilmiş H9c2'lere verilerek 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Yirmi dört saat sonunda yıkanan lameller DAPI'li mounting medium ile 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra lameller kapatılarak konfokal mikroskopunda (Zeiss) görüntülenmiştir. Çalışmada Dil ile boyanmamış eksozomların verildiği hücreler negatif kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

H9cS Hücrelerinde ROS Seviyesinin Ölçülmesi

H9cS hücrelerinde ROS ölçümü, ROS oluşumuna spesifik floresans boya (DCDFA 10 μ M) kullanılarak konfokal mikroskopunda (Leica TCS SP5), floresans şiddetinde değişim olarak görüntülenmiştir (1). ROS ölçümü için takip edilen işlemde ROS varlığında DCFH, hücre zarına nüfuz edemeyen güçlü bir yeşil floresans madde olan DCF'ye (diklorofloresin) oksitlenmesi temeline dayanmaktadır. Yetmiş iki saat boyunca 0,5 ug/mL eksozom ile inkübe edilmiş H9c2 hücreleri DCFDA ile yüklenmiş ve bazal ölçümler (F0) alınmıştır. Bunu takiben yüksek doz (100 μ M) H₂O₂ uygulanmış hücrelerde floresans ölçümü yapılmış ve maksimum değer bulunmuştur (F). Her hücre için floresans yoğunluğu değişiklikleri $\Delta F/F_0$ ile hesaplanır, burada $\Delta F = F - F_0$; F, bazal seviye F0 üzerinde floresans yoğunluğunun yerel maksimum yükselmesi olarak tanımlanır. ROS oluşumu için eksitasyon ve emisyon dalga boyları için E_{ex} : 490 nm

ve E_{em} : 530 nm kullanılmıştır. Analiz edilen her bir hücre için yapılan hesaplamalar sonucu elde edilen değerler Tablo 1'de sunulmuştur.

Mitokondriyal Membran Potansiyeli (MMP) Ölçümü

Kardiyomyositlerdeki MMP, daha önce tarif edildiği gibi Floresans bazlı tahlille ölçüldü (1). H9c2 hücreleri 3 μ M zar geçirgen floresans boya olan JC-1 ile 45 dakika oda sıcaklığında boyanmış ve Leica TCS SP5 konfokal mikroskobu ile görüntülenmiştir. MMP ölçümü alınırken 585 nm ve 535 nm emisyon değerlerinde aynı anda kayıt alındı. Hücrelerin ışımaya değerleri 585/535 oranına göre değerlendirildi. Bazal ölçüm alındıktan sonra MMP ölçümlerini kalibre etmek için 5 μ M FCCP [karbonil siyanür 4-(triflorometoksi) feyhidrazon] kullanıldı. Floresans sinyali şiddet değişiminden arka plan sinyali

Tablo 1: Analiz edilen her bir hücreden elde edilen ROS ölçüm değerleri

Hücre	Kontrol	D-Gal	D-Gal+exo
1	0,386662	1,065357	0,253257
2	0,425018	0,887946	0,578529
3	0,538414	1,057675	0,383307
4	0,576103	0,982516	0,295615
5	0,444191	0,80718	0,367933
6	0,362125	0,65328	0,585462
7	0,740264	1,195701	0,466813
8	0,367528	0,602337	0,260201
9	0,571275	0,790702	0,430752
10	0,639689	1,118819	0,349783
11	0,607099	1,200132	0,582364
12	0,463139	0,978059	0,892146
13	0,747882	1,704072	1,631285
14	1,742102	0,61226	1,127077
15	0,607563	0,600038	0,724373
16	1,012564	0,665079	1,211928
17	0,977212	0,789441	1,363167
18	1,639743	1,048233	0,900646
19	1,277969	1,167503	1,087196
20	1,429707	0,938483	0,844149
21	1,424853	1,532789	0,082353
22	0,685432	1,399178	0,562298
23	0,623562	1,66986	0,693846
24	1,01456	1,56094	0,573885
25	1,3409	1,123715	0,741081
26		1,629261	0,816513
27		1,266287	0,865063
28		2,26864	1,418904
29		2,028978	1,04554
30		1,180934	1,070246

çıkarıldıktan sonra $\Delta\Psi_m = F - F_0 / F_0$ (F_0 =bazal sinyal, F =maksimum floresans değeri) formülü kullanılarak membran potansiyel değişimleri hesaplanmış ve ışımaya grafiği oluşturulmuştur. Analiz edilen her bir hücre için yapılan hesaplamalar sonucu elde edilen değerler Tablo 2'de sunulmuştur.

Eksozomal miRNA İzolasyonu ve qRT-PCR ile miRNA İfadesi Tayini

Eksozomal miRNA ifadesini incelemek için stem-loop qRT-PCR (kök döngü kantitatif ters transkripsiyon PCR) yöntemi uygulanmıştır. Eksozomlardan mikroRNA izolasyonu total eksozom RNA kiti (invitrogen) kullanılarak gerçekleştirilecektir. MiR-21 için "Genomics miRNA primer design" programı kullanılarak, 3' ucuna bağlanacak spesifik stem-loop reverse transkriptaz primeri (Stem-loop RT) tasarlanmış ve reverse transkriptaz enzimi ile miRNA'lardan cDNA sentezi yapılmıştır (28). "Universal reverse primer" ve miR-21'e spesifik olarak bağlanacak forward miR-21 primeri ile qRT-PCR deneyi gerçekleştirilmiştir. Universal reverse primer tüm miRNA'ların 3' uçlarını tanıyabilir ve bağlanır. Kullanılacak universal reverse primer sekansı: 5'- GTG CAG GGT CCG AGG TA-3'27. Normalizasyon için miRNA normalizasyonunda sıklıkla kullanılan RNU6B (küçük nükleer RNA) kullanılmıştır. Sonuçlar relative CT metodu (2-deltaCt) ile analiz edilmiştir.

Bulgular

H9c2'den Türetilen Eksozomların Karakterizasyonu ve Partikül Konsantrasyonu

NAC ile inkübe edilmiş H9c2 kardiyomyositlerinden alınan eksozomlar, akış sitometrisi yöntemi ile karakterize edilmiştir (Şekil 1A). qNanoGold cihazı kullanılarak "Ayarlanabilir Dirençli Darbe Algılama (TRPS) teknolojisi" ile eksozom boyutları değerlendirilmiştir. Eksozomların boyut aralıkları, yaklaşık 65-240 nm aralığındadır ve her iki grupta da benzer olduğu gözlenmiştir (Şekil 1B). Çalışmamızda Dil ile işaretlenmiş eksozomlar ile 72 saat inkübe edilen H9c2 hücreleri konfokal mikroskobunda görüntülenmiştir.

NAC ile Inkübe Edilmiş H9c2'lerden İzole Edilen Eksozomlar Yaşlı Kardiyomyositlerdeki Aşırı ROS Üretimini Baskılamaktadır

Yaşlanmayla birlikte artan hücre içi ROS üretimi ve bu üretime NAC ile inkübe edilmiş H9c2'lerden izole edilen eksozom uygulamasının etkileri konfokal mikroskop incelemeleri ile gerçekleştirilmiştir. Daha önceki yaşlı sıçan kardiyomyositler ile yapılan çalışmalarda yaşlı hücrelerdeki ROS artışı gözlenmiş ve bu artış kontrole göre yaklaşık 1,5 kat olarak ölçülmüştür (1). Bu çalışmamızda, hem D-Gal muamelesi ile yaşlandırılmış grubun (D-Gal) hem de eksozom ile muamele edilmiş yaşlı grubun (D-Gal+exo) ROS üretimi kontrol gruba karşılaştırılmıştır. Önceki

Tablo 2: Analiz edilen her bir hücreden elde edilen MMP ölçüm değerleri

Hücre	Kontrol	D-Gal	D-Gal+exo
1	0,575746	0,773802	0,647003454
2	0,49291	0,735923	0,663411856
3	0,49063	0,774017	0,736622116
4	0,582364	0,743955	0,744833543
5	0,473401	0,829285	0,763496353
6	0,430553	0,838721	0,657274896
7	0,553519	0,856133	0,710446583
8	0,511792	0,849787	0,631587159
9	0,654895	0,783352	0,66301092
10	0,658342	0,794877	0,763019409
11	0,555684	0,763477	0,685039737
12	0,555609	0,76391	0,673107556
13	0,656396	0,803488	0,702854013
14	0,575159	0,774384	0,668432117
15	0,541669	0,67491	0,665021547
16	0,54442	0,765836	0,787143309
17	0,616453	0,606821	0,666904985
18	0,575257	0,686151	0,597167198
19	0,554673	0,716286	0,651729704
20	0,626354	0,633702	0,649931068
21	0,610103	0,727851	0,716714557
22	0,545606	0,882489	0,676234168
23	0,531986	0,875221	0,753562335
24	0,611937	0,845738	0,672010662
25	0,661321	0,71684	0,68747947
26	0,523318	0,715622	0,679823901
27	0,549065	0,690522	0,752180192
28	0,609776	0,900675	0,692118334
29	0,577421	0,712072	0,727757579
30	0,601908	0,715798	
31	0,580819	0,764356	
32	0,566677	0,867381	
33	0,583013		
34	0,548682		
35	0,699592		
36	0,544251		
37	0,58943		
38	0,577764		
39	0,666063		
40	0,644679		
41	0,54402		
42	0,660556		
43	0,460547		
44	0,529839		
45	0,603626		
46	0,614541		
47	0,659242		
48	0,674239		
49	0,561078		
50	0,657701		

çalışmalar ile uyumlu olarak, yaşlı kardiyomyositlerde bazal ROS miktarının kontrole göre yaklaşık 1,4 kat yüksek olduğu ve daha fazla ROS ürettiği floresans şiddetindeki farklarla gözlenmiştir. Yaşlanma modeli uygulanmış bu kardiyomyositlerin, NAC ile inkübe edilmiş H9c2'lerden izole edilen eksozomlar ile 72 saat boyunca inkübasyonunun ROS üretimini belirgin şekilde azalmasına, hatta kontrol bazal seviyesine düşmesine neden olduğu gözlenmiştir (Şekil 2A). Bu bulgu, ROS-hedefli bir antioksidan olan NAC uygulamasının ROS miktarını azaltarak eksozom regülasyonu yolu ile yaşlı kalpte koruyucu etkiler oluşturabileceği hipotezini desteklemektedir.

NAC ile İnkübe Edilmiş H9c2'lerden İzole Edilen Eksozomlar, Yaşlı Kardiyomyositlerdeki MMP Depolarizasyonunu Etkilemektedir

Önceki çalışmalarda, yaşlanma ile ilişkili ROS seviyesindeki artışın, mitokondri redoks durumunda rol oynadığı gösterilmiştir (1,6). Yaşlı kardiyomyositlerde NAC ile inkübe edilmiş H9c2'lerden izole edilen eksozom ile tedavinin yaşlanmaya bağlı değişen MMP üzerinde önemli düzeltici etkisi olduğu gösterilmiştir. Yaşlanma ile önemli ölçüde depolarize olan mitokondri, eksozom ile inkübasyon sonrası düzelmekte ve genç kontrol hücreleri seviyesine yaklaşmaktadır (Şekil 2B).

NAC Muamelesi H9c2'lerde Eksozomal miR-21 İfadesini Değiştirmektedir

NAC ile muamele edilmiş ve edilmemiş H9c2'lerden izole edilen eksozomlardan eksozomal miRNA izolasyonu sonrası miR-21'in baz sekansına uygun Stem-loop primer kullanılarak cDNA sentezi yapılmıştır. Bunu takiben qRT-PCR ile miR-21 ifadesindeki değişim NAC verilen ve verilmeyen hücrelerde karşılaştırılmıştır. NAC muamelesi kardiyomyositlerde eksozomal miR-21 ifadesini anlamlı olarak baskılamaktadır (Şekil 3).

Tartışma

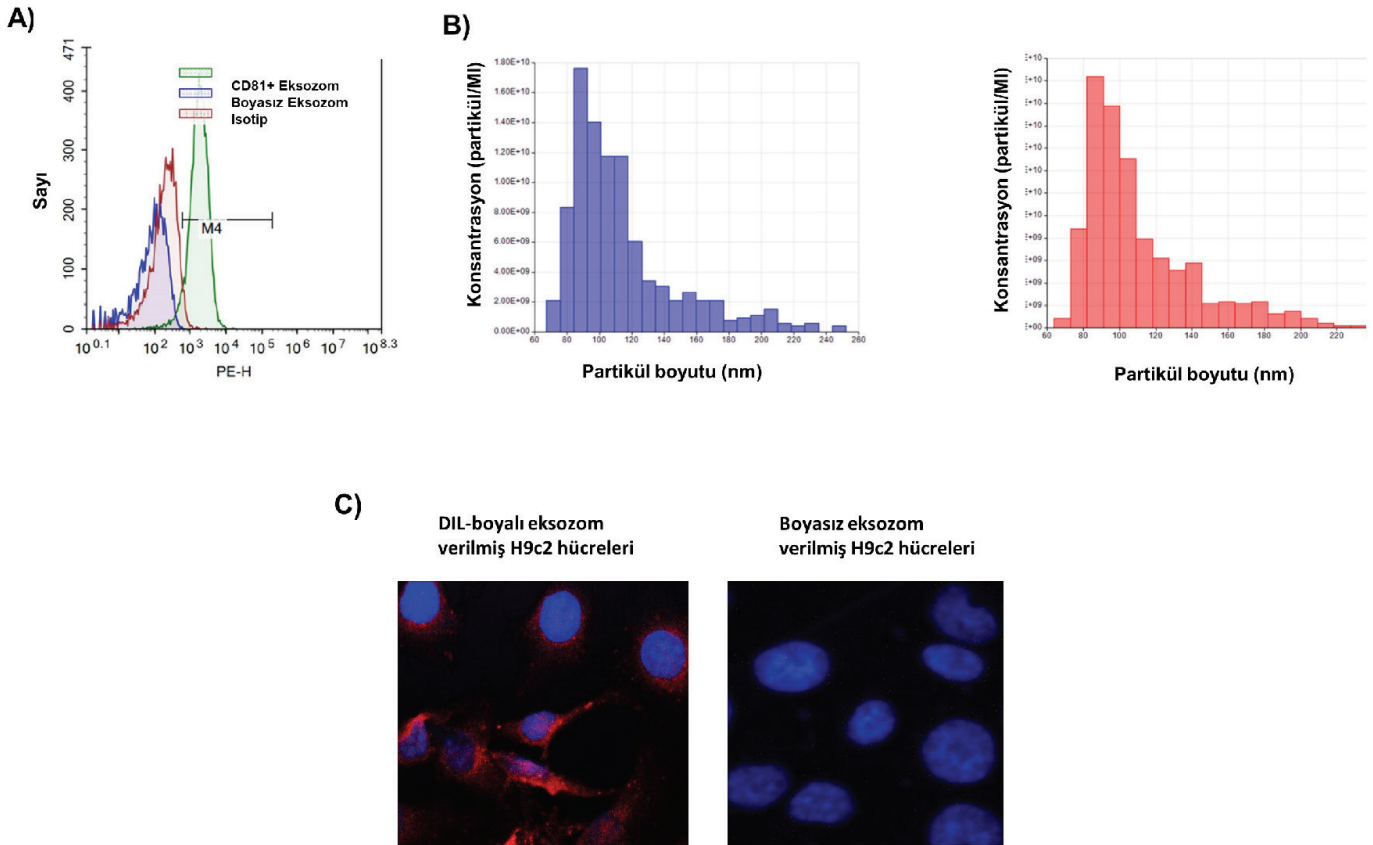
Bu çalışmamızda, anti-enflamatuvar ve anti-oksidant özelliklere sahip NAC uygulamasının, yaşlanmaya bağlı olarak artan ve hücre boyutunda sebep olduğu yapısal ve fonksiyonel bozulmalar aracılığı ile kalpte gelişen fizyopatolojik süreçlere etki ederek, örneğin yaşlanmaya bağlı artan ROS üretimini eksozomal modülasyon yoluyla düzenlediği gösterilmiştir. Sonuçlarımız, diyabetik kardiyomyopati, pulmoner fibroz ve iskemik repüfüzyona bağlı gelişen kalp hasarlarında düzenleyici olarak kullanılan bir antioksidan ajan olan NAC ile muamele edilen sağlıklı kardiyomyositlerden salgılanan eksozomların, yaşlı kardiyomyositlerdeki 1,4 kat artan ROS üretimini baskıladığı ve kontrol düzeyine kadar düşürdüğünü göstermiştir. Redoks sinyali, kontraktıl disfonksiyon, hücre içi Ca²⁺ düzensizliği, kardiyomyosit hipertrofisi, hücre ölümü, aritmi, fibrozis gibi kalp fenotipini etkileyen birçok fizyopatolojik süreçlerin gelişiminde rol oynamaktadır (29). ROS ayrıca kalp yetmezliğine

yatkınlık oluşturan iskemi-reperfüzyon hasarında ve bu tür yaralanmalara karşı koruma sağlayan sinyal yollarında da rol oynamaktadır (30). ROS homeostazı hem hücre dışı ve hem de Bcl-2 ailesi proteinleri gibi hücre içi apoptozis yolağında rol alan faktörleri aktive ederek kardiyomyosit apoptozunu ve nekrozunu etkileyebilmektedir. Bu yolla, akut iskemi-reperfüzyon hasarına, dolayısı ile kronik kalp yetmezliği gelişimine katkıda bulunabilmektedir (31).

Ayrıca, çeşitli deneysel çalışmalar genel olarak kardiyovasküler hastalıklarda, mitokondriyon fonksiyon bozukluğu, aşırı ROS üretimi, depolarize olmuş MMP ve anormal mitokondriyon ince yapısı arasındaki çapraz ilişkiyi vurgulamaktadır (5,6). Bu nedenle mitokondriyon-hedefli tedavi stratejilerinin, ROS homeostazını dolayısıyla kalp fonksiyon bozukluğu/yetmezliğini düzenleyebileceğini kuvvetle işaret etmektedir. Artan ROS üretimi, yaşlı kardiyomyositlerde mitokondriyal membran potansiyelinin kaybının ve değişen mitokondriyal dinamiklerin altında yatan en önemli nedenlerindendir (6). Çalışmamızda yaşlı

kardiyomyositlerde, genç kontrollere oranla artan ROS miktarı ile gözlenen MMP kaybının, NAC ile muamale edilen sağlıklı kardiyomyositlerden salgılanan ekzozomlar ile muamele sonrası düzeldiği ve genç kontrol grubuna yaklaştığı görülmüştür.

Mitokondriyal kaynaklı oksidatif stres, mitokondriyal DNA'ya (mtDNA) geri dönüşü olmayan hasar vererek kardiyak yaşlanmada hayati bir rol oynadığı düşünülmektedir. Çünkü, elektron taşıma sisteminin enzimleri, mtDNA içeren mitokondriyal matrisi kapsayan iç mitokondriyal zar üzerinde bulunur. Aşırı mitokondriyal ROS üretimi DNA'ya zarar vererek kardiyak yaşlanma sırasında yeterli ATP üretim stabilizasyonunu bozabilmektedir. Bu durum ise hücre ölümünü tetiklemektedir (32). Tüm bu bulgular, mitokondriyon kaynaklı ROS üretiminin azaltılmasının ve/veya kontrol altında tutulmasının, mitokondriyonların fonksiyonu üzerindeki olumlu etkileri nedeniyle kardiyak yaşlanmada potansiyel bir hedef olabileceğini öne sürmektedir (33). Biz de çalışmamızda, ROS üretimini baskılayan bir anti-oksidan olan NAC'nin



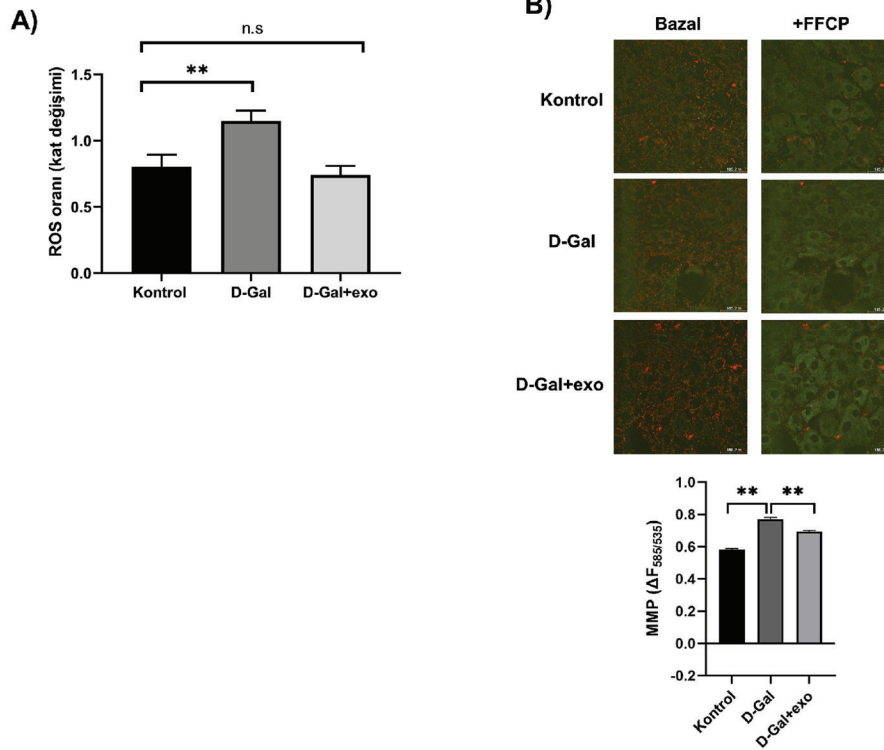
Şekil 1: İzole ekzozomların karakterizasyonu

A) CD9 ekzozom belirteci ile kaplanmış manyetik boncuklar kullanılarak akış sitometri analizi. Bu kaplanmış boncuklar, bir PE-konjuge CD81 antikoruna ile inkübe edilmiştir. M4, PE-pozitif boncukların yüzdesini göstermektedir. B) İzole edilmiş hücre dışı veziküllerin boyut dağılımı ve miktar tayini, qNanoGold kullanılarak analiz edilmiştir. Her iki grupta da ekzozomların ölçülen çapı ortalama 100-nm olarak gözlenmiştir. C) Dil ile işaretlenmiş ekzozomların H9c2 hücreleri tarafından alınımı, konfokal mikroskopu ile görüntülenmiştir. Dil boyası ile işaretlenmemiş ekzozomların ile inkübe edilen H9c2 grubu, negatif kontrol grubudur. Bu hücrelerde sadece nükleus boyası olan DAPI boyası (mavi) tespit edilmiştir. Dil boyası ile işaretlenmiş ekzozomların verildiği hücrelerde DAPI boyası çevresinde Dil boyalı ekzozomlar (kırmızı) gözlenmiştir

yaşlı kardiyomyositlerdeki koruyucu etkisini hangi moleküler mekanizmalar aracılığı ile gösterdiğini incelemeyi hedefleyerek elde edilen veriler ile bu hipotezin doğru olduğunu sergiledik.

Fizyolojik kardiyak yaşlanma, kardiyak fibrozis, sol-ventrikül hipertrofisi, ve diyastolik disfonksiyonda artış ile ilişkilidir ve endotel disfonksiyonu, artmış fibrozis ve arteriyel sertlik ile karakterize edilmektedir (34). Çok sayıda çalışma, vasküler yaşlanmanın hücre modellerinde veya fizyolojik yaşlanmanın hayvan modellerinden izole edilen damarlarda yaşlanma sırasında miRNA'ların rolünü değerlendirmiştir. Çalışmamızda NAC uygulanan sağlıklı kardiyomyositlerden salınan ekzozomların, yaşlı kardiyomyositlerde artan ROS üretimini anlamlı olarak baskıladığını ve ROS üretimi ile ilişkili olan mitokondri

depolarizasyonunu önlediğini gösterdik. Klinik öncesi çalışmalar diyabetik kardiyomyopati ile ifadesi değişen spesifik miRNA'ları tanımlanmış ve bu miRNA'ların diyabetik kalp komplikasyonunun ilerlemesindeki önemli rolünü ortaya çıkarılmıştır. Bunların arasından özellikle miR-21'in atriyal fibrilasyon ve koroner arter bozuklukları ile ilerleyen diyabette aşırı eksprese edildiğini, bu artışın da kardiyomyositlerde elektriksel bozuklukların bir sinyali olarak azalan L tipi kalsiyum akım akışına neden olduğu gösterilmiştir (35). Ayrıca miR-21'in prediyabetik durumla ilişkili olduğu, glukoz intoleransının ve ROS artışının erken tespiti için biyobelirteçler olarak kullanılabilirliği gösterilmiştir (36). Bu bulgular, kalp hasarı ile ilgili tedavilerde kullanılan ROS hedefli ajanların da kardiyomyositlerden salgılanan ekzozom içeriğini regüle edebileceğini ve ekzozom-temelli parakrin bir



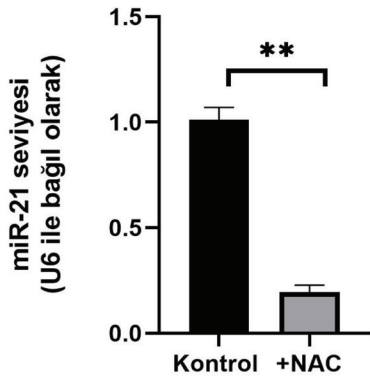
Şekil 2: NAC uygulanmış H9c2'lerden salgılanan ekzozomların yaşlanmaya bağlı artan ROS üretimi ve mitokondri membran potansiyeli (MMP) üzerindeki etkisi üzerindeki etkisi

A) Konfokal mikroskopi kullanılarak hücre içi ROS seviyesi Floresans şiddet seviyelerindeki değişimler olarak kantite edilmiştir. Kontrol grubu, yaşlı (D-gal) grubu ve 72 saat ekzozom ile inkübe edilen yaşlı (D-gal+exo) grubu hücreleri konfokal görüntülemesi için ROS göstergesi klorometil-2',7'-diklorodihidroflorosein diasetat (DCFDA) ile 1 saat inkübe edilmiştir. NAC ile ön işleme tabi tutulmuş H9c2 hücrelerinden salınan ekzozomlar, yaşlı (D-Gal) kardiyomyositlerinde gelişmiş ROS üretim seviyesinde önemli bir düşüğe neden olmaktadır. Veriler ortalama (\pm SS) olarak verilmiştir. Hücre sayısı her grup için n=25-30 hücredir. İstatistiksel anlamlılık *p<0,05 kontrole göre, **p<0,01 kontrole göre, n.s: anlamlı değil. B) JC-1 yüklü kardiyomyositlerde MMP için temsili Floresans görüntüleri ve histogram, NAC ile ön işleme tabi tutulmuş H9c2 hücrelerinden salınan ekzozomların, yaşlı kardiyomyositlerde neden olduğu MMP değişimi JC-1 Floresans boyası ile konfokal mikroskobunda ölçüldü. Kontrol grubu, yaşlı (D-gal) grubu ve 72 saat ekzozom ile inkübe edilen yaşlı (D-gal+exo) grubu hücreleri 3 μ M JC-1 ile 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra konfokal mikroskobuyla MMP ölçümü yapılmıştır. MMP yanıtı için hücrelere 1 μ M FCCP verilerek mitokondri depolarizasyonu sağlanmıştır.

Veriler ortalama (\pm SS) olarak verilmiştir. Hücre sayısı her grup için n=25-40 hücredir. İstatistiksel anlamlılık *p<0,05 kontrole göre, **p<0,01 kontrole göre, n.s: anlamlı değil

Not: Yeşil renk, mitokondriyal membran potansiyelinin kaybını göstermektedir

SS: Standart sapma, NAC: N-asetilsistein, ROS: Reaktif oksijen türleri



Şekil 3: NAC inkübasyonu eksozomal miRNA ifadesini değiştirmektedir. NAC ile muamele edilmiş ve edilmemiş H9c2'lerden izole edilen eksozomlardan eksozomal miRNA izolasyonu sonrası miR-21'in baz sekansına uygun Stem-loop primer kullanılarak cDNA sentezi yapılmıştır. Bunu takiben qPCR ile miR-21 ifadesindeki değişim NAC verilen ve verilmeyen hücrelerde karşılaştırılmıştır. N=4 ve veriler ortalama \pm SS olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık * $p < 0,05$ kontrole göre, ** $p < 0,01$ kontrole göre

SS: Standart sapma, NAC: N-asetilsistein

mekanizma aracılığı ile kalpteki artan ROS üretimini baskılıyor olabileceğini düşündürmektedir. Bu ifademizi destekler nitelikte, çalışmamızda NAC uygulamasının eksozomal miR-21 ifadesini anlamlı olarak baskıladığı gözlenmiştir.

Sonuç

Tüm verilerimiz ışığında, ventriküler kardiyomyositlerin salgıladığı eksozomların miRNA'ların bir antioksidan muamelesi ile modüle edilebileceğini ve bu yolla ROS üretimi ve mitokondri fonksiyon bozukluğu üzerinde düzenleyici rol alabileceğini önermekteyiz. Karmaşık sinyal yolları üzerindeki ROS hedefli kardiyometabolik ilaç etkilerinin mekanizmalarının aydınlatılması, böylece kalbi herhangi bir patolojik uyarana karşı korumak için umut verici alternatif farmakolojik kullanım sağlayabileceğini vurgulamaktadır.

Etik

Etik Kurul Onayı: Çalışma hücre hattı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İnsan ve hayvan deneyi içermemektedir. Bu nedenle etik kurul iznine gerek yoktur.

Hasta Onayı: Bu çalışmada hasta örneği kullanılmamıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulunun dışından olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

Yazarlık Katkıları

Konsept: B.T., C.V.B., Veri Toplama, İşleme, Analiz veya Yorumlama: C.V.B., Veri Toplama ve İşleme: K.G., Z.Ö., Literatür Arama: C.V.B., Yazan: C.V.B., B.T.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.

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

Kaynaklar

1. Olgar Y, Degirmenci S, Durak A, et al. Aging related functional and structural changes in the heart and aorta: MitoTEMPO improves aged-cardiovascular performance. *Exp Gerontol.* 2018;110:172-181.
2. Bulthuis EP, Adjobo-Hermans MJW, Willems PHGM, et al. Mitochondrial Morphofunction in Mammalian Cells. *Antioxid Redox Signal.* 2019;30:2066-2109.
3. Wu NN, Zhang Y, Ren J. Mitophagy, mitochondrial dynamics, and homeostasis in cardiovascular aging. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:9825061.
4. Turan B. Role of antioxidants in redox regulation of diabetic cardiovascular complications. *Curr Pharm Biotechnol.* 2010;11:819-836.
5. Durak A, Olgar Y, Degirmenci S, et al. A SGLT2 inhibitor dapagliflozin suppresses prolonged ventricular-repolarization through augmentation of mitochondrial function in insulin-resistant metabolic syndrome rats. *Cardiovasc Diabetol.* 2018;17:144.
6. Olgar Y, Tuncay E, Degirmenci S, et al. Ageing-associated increase in SGLT2 disrupts mitochondrial/sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ homeostasis and promotes cardiac dysfunction. *J Cell Mol Med.* 2020;24:8567-8578.
7. Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:10771-10778.
8. Ren J, Zhang Y. Targeting autophagy in aging and aging-related cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 2018;39:1064-1076.
9. Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Science.* 1992;257:1220-1224.
10. Durak A, Bitirim CV, Turan B. Titin and CK2 α are New Intracellular Targets in Acute Insulin Application-Associated Benefits on Electrophysiological Parameters of Left Ventricular Cardiomyocytes From Insulin-Resistant Metabolic Syndrome Rats. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2020;34:487-501.
11. Dai DF, Rabinovitch PS, Ungvari Z. Mitochondria and cardiovascular aging. *Circ Res.* 2012;110:1109-1124.
12. Kauppila TES, Kauppila JHK, Larsson NG. Mammalian mitochondria and aging: an update. *Cell Metabolism.* 2017;25:57-71.
13. Reyes DRA, Gomes MJ, Rosa CM, et al. N-Acetylcysteine Influence on Oxidative Stress and Cardiac Remodeling in Rats During Transition from Compensated Left Ventricular Hypertrophy to Heart Failure. *Cell Physiol Biochem.* 2017;44:2310-2321.
14. Tepel M, van der Giet M, Statz M, et al. The antioxidant acetylcysteine reduces cardiovascular events in patients with end-stage renal failure: a randomized, controlled trial. *Circulation.* 2003;107:992-995.
15. Scholze A, Rinder C, Beige J, et al. Acetylcysteine reduces plasma homocysteine concentration and improves pulse pressure and endothelial function in patients with end-stage renal failure. *Circulation.* 2004;109:369-374.
16. Samuni Y, Goldstein S, Dean OM, et al. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1830:4117-4129.
17. Burgunder JM, Varriale A, Lauterburg BH. Effect of N-acetylcysteine on plasma cysteine and glutathione following paracetamol administration. *Eur J Clin Pharmacol.* 1989;36:127-131.
18. Kerksick C, Willoughby D. The antioxidant role of glutathione and N-acetylcysteine supplements and exercise-induced oxidative stress. *J Int Soc Sports Nutr.* 2005;2:38-44.
19. Chaumais MC, Ranchoux B, Montani D, et al. N-acetylcysteine improves established monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Respir Res.* 2014;15:65.
20. Dlodla PV, Orlando P, Silvestri S, et al. N-Acetyl cysteine ameliorates hyperglycemia-induced cardiomyocyte toxicity by improving mitochondrial energetics and enhancing endogenous Coenzyme Q(9/10) levels. *Toxicol Rep.* 2019;6:1240-1245.

21. Yuan Y, Du W, Liu J, et al. Stem Cell-Derived Exosome in Cardiovascular Diseases: Macro Roles of Micro Particles. *Front Pharmacol.* 2019;9:547.
22. Zhang Y, Liu Y, Liu H, et al. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell Biosci.* 2019;9:19.
23. Barile L, Moccetti T, Marbán E, et al. Roles of exosomes in cardioprotection. *Eur Heart J.* 2017;38:1372-1379.
24. La Sala L, Mrakic-Sposta S, Micheloni S, et al. Glucose-sensing microRNA-21 disrupts ROS homeostasis and impairs antioxidant responses in cellular glucose variability. *Cardiovasc Diabetol.* 2018;17:105.
25. Dai B, Wang F, Nie X, et al. The Cell Type-Specific Functions of miR-21 in Cardiovascular Diseases. *Front Genet.* 2020;11:563166.
26. Pužar Dominkuš P, Stenovec M, Sitar S, et al. PKH26 labeling of extracellular vesicles: Characterization and cellular internalization of contaminating PKH26 nanoparticles. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2018;1860:1350-1361.
27. Tsai SJ, Guo C, Sedgwick A, et al. Exosome-Mediated mRNA Delivery For SARS-CoV-2 Vaccination. *bioRxiv.* 2020. doi: 10.1101/2020.11.06.371419
28. Kramer MF. Stem-loop RT-qPCR for miRNAs. *Curr Protoc Mol Biol.* 2011. doi: 10.1002/0471142727.mb1510s95
29. Zima AV, Blatter LA. Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. *Cardiovasc Res.* 2006;71:310-321.
30. Maack C, Kartes T, Kilter H, et al. Oxygen free radical, release in human failing myocardium is associated with increased activity of Rac1-GTPase and represents a target for statin treatment. *Circulation.* 2003;108:1567-1574.
31. Dorn GW 2nd. Apoptotic and non-apoptotic programmed cardiomyocyte death in ventricular remodelling. *Cardiovasc Res.* 2009;81:465-473.
32. Burgoyne JR, Mongue-Din H, Eaton P, et al. Redox signaling in cardiac physiology and pathology. *Circ Res.* 2012;111:1091-1106.
33. Quan Y, Xin Y, Tian G, et al. Mitochondrial ROS-Modulated mtDNA: A Potential Target for Cardiac Aging. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;2020:9423593.
34. Dai DF, Chen T, Johnson SC, et al. Cardiac aging: from molecular mechanisms to significance in human health and disease. *Antioxid Redox Signal.* 2012;16:1492-1526.
35. Zhang X, Azhar G, Williams ED, et al. MicroRNA Clusters in the Adult Mouse Heart: Age-Associated Changes. *Biomed Res Int.* 2015;2015:732397.
36. La Sala L, Mrakic-Sposta S, Tagliabue E, et al. Circulating microRNA-21 is an early predictor of ROS-mediated damage in subjects with high risk of developing diabetes and in drug-naïve T2D. *Cardiovasc Diabetol.* 2019;18:18.