

T. C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ADİPONEKTİN'İN GLUKOZ VE YAĞ ASİDİ ALINMASINDAN
VE TAŞINMASINDAN SORUMLU GENLERİN İFADELERİ
ÜZERİNE ETKİSİNİN *in vitro* KARDİYAK HÜCRE
MODELLERİNDE ARAŞTIRILMASI

Minel Can EKİN
ORCID: 0009-0001-1902-4956

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
Moleküler Tıp Yüksek Lisans Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR
AĞUSTOS 2024

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2021970146

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ADİPONEKTİN'İN GLUKOZ VE YAĞ ASİDİ ALINMASINDAN
VE TAŞINMASINDAN SORUMLU GENLERİN İFADELERİ
ÜZERİNE ETKİSİNİN *in vitro* KARDİYAK HÜCRE
MODELLERİNDE ARAŞTIRILMASI

Minel Can EKİN
ORCID: 0009-0001-1902-4956

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
Moleküler Tıp Yüksek Lisans Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Özlenen ŞİMŞEK PAPUR
ORCID: 0000-0002-7368-1498

İZMİR
AĞUSTOS 2024

Bu araştırma TUSEB 2022-B-03 Proje No: 27862 ile desteklenmiştir.

T. C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
ETİK BEYANI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum “Adiponektin’in Glukoz Ve Yağ Asidi Alınmasından Ve Taşınmasından Sorumlu Genlerin İfadeleri Üzerine Etkisinin *in vitro* Kardiyak Hücre Modellerinde Araştırılması” başlıklı Yüksek Lisans tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Minel Can EKİN

05/09/2024

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans sürecim ve tez çalışmam boyunca yanımda olan, benimle tüm deneyimlerini paylaşmaktan çekinmeyen, bana karşı her zaman sabırlı ve yol gösterici olan değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Özlenen ŞİMŞEK PAPUR'a;

Yüksek lisans sürecim boyunca bana destek olan Moleküler Tıp Anabilim Dalının tüm değerli öğretim üyelerine,

İmmunofloresan analizlerdeki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Oğuz ALTUNGÖZ hocama,

Tüm bu zorlu süreçte yanımda olan, yardımlarını ve bilgi paylaşımını esirgemeyen laboratuvar ekibinden Ülkü BALANDIZ'a;

Tez çalışmamın yürütülmesinde alt yapı ve ekipmanları kullanmama müsaade eden Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı sorumlularına ve her bir sorumu sabırla cevaplayan tüm laboratuvar arkadaşlarıma;

Her aradığımda orada olduklarını bildiğim beni sabırla dinleyip derdime, yorgunluğuma ortak olan güzel arkadaşlarım Hande BEZGİN ve Aybala Asena ŞAHİN'e;

En önemlisi de her zaman, her koşulda arkamda desteklerini hissettiğim tüm bu süreci bitirebileceğime beni inandıran çok sevdiğim annem Asuman EKİN, babam Derya EKİN ve kardeşim Efe Kaan EKİN'e;

Bu süreçte bana gösterdiğiniz tüm fedakârlıklarınız ve anlayışınız için teşekkür ederim.

Minel Can EKİN

İZMİR – 2024

İÇİNDEKİLER

TABLolar DİZİNİ	i
ŞEKİLLER DİZİNİ	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	
1.1. Problemin Tanımı ve Önemi	1
1.2. Araştırmanın Amacı.....	2
1.3. Araştırmanın Hipotezleri	2
2. GENEL BİLGİLER	
2.1. Kardiyovasküler Hastalıklar	3
2.2. Diabetes Mellitus.....	3
2.2.1 Tip 1 Diyabet	4
2.2.2 Tip 2 Diyabet	4
2.3 Diyabetik Kardiyomiyopati	4
2.4. GLUT4	8
2.5. CD36	8
2.6 Adiponektin	9
2.6.1. Adiponektin Aracılı Metabolizmanın Sinyal Yolları.....	11
2.6.2. Adiponektinin Farklı Dokulardaki Fonksiyonları.....	12
2.6.3. Diyabetik Kardiyomiyopatide Adiponektin'in Rolü.....	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM	
3.1. Araştırmanın Tipi.....	14
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	15
3.3. Çalışma Materyali	15
3.4. Araştırmanın Değişkenleri.....	15
3.5. Veri Toplama Araçları.....	16
3.5.1. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler ve Cihazlar	16
3.5.2. Kullanılan Metotlar	20

3.5.2.1. Hücre Kültürü.....	20
3.5.2.1.1. HL-1 Hücre Hattı Kültürü.....	20
3.5.2.1.2. H9c2 Hücre Hattı Kültürü.....	21
3.5.2.2. İmmüno Floresan Boyama	22
3.5.2.3. Protein Eldesi	25
3.5.2.3.1. Protein Konsantrasyon Ölçümü	26
3.5.2.4. Western Blot / SDS-PAGE	27
3.6. Verilerin Değerlendirilmesi	31
3.7. Araştırma Planı	31
3.8. Araştırmanın Kısıtlılıkları.....	32
3.9. Etik Kurul Onay	32
4. BULGULAR.....	
4.1. H9c2 Hücrelerinin Kültüre Edilmesinin Mikroskopik Görüntüleri	33
4.2. İmmüno Floresan Boyama ile Kardiyak Hücre Hattı Olduğunun Doğrulanması	34
4.3. Adiponektin Uygulanan H9c2 Hücresinin Mikroskopik Görüntüleri	36
4.4. Adiponektin'in Glukoz ve Yağ Asidi Alınmasından Ve Taşınmasından Sorumlu Genlerin İfadeleri Üzerine Etkisinin Protein Düzeyinde Gösterilmesi	37
4.4.1. APN Uygulanan H9c2 Hücrelerinde GLUT4 Ekspresyonlarının Gösterilmesi.....	40
4.4.2. Western blot Verilerinin Birlikte Değerlendirilmesi.....	52
5. TARTIŞMA.....	55
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	59
7. KAYNAKLAR.....	60

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Diyabetik kardiyomiyopatinin evreleri.....	5
Tablo 2. Adiponektinin farklı organlardaki işlevleri.....	12
Tablo 3. Araştırmanın yapılması tahmin edilen zaman planı.....	15
Tablo 4. Proje kapsamında kullanılan kimyasal malzeme ve sarfların listesi.....	16
Tablo 5. Proje kapsamında kullanılan cihazların listesi.....	19
Tablo 6. Deney seti.....	21
Tablo 7. İmmünohistokimyasal boyamada kullanılacak antikorlar.....	25
Tablo 8. SDS PAGE için %12'lik ayırıcı jel solüsyonu oranları.....	27
Tablo 9. SDS PAGE için %4'lük paketleyici jel solüsyonu oranları.....	28
Tablo 10. 10X Yürütme tamponunun solüsyon oranları.....	28
Tablo 11. 10X Tranfer tamponunun solüsyon oranları.....	28
Tablo 12. 10X TBS solüsyon oranları.....	28
Tablo 13. Kullanılan birincil-ikincil antikorların marka ve dilüsyon oranları.....	31
Tablo 14. Araştırmanın yapılması tahmin edilen zaman planı.....	32
Tablo 15. H9c2 Hücre hattı immunofloresan görüntüleri.....	35
Tablo 16. HT-29 Hücre hattı immunofloresan görüntüleri.....	35
Tablo 17. APN uygulamasının mikroskopik görüntüleri.....	36
Tablo 18. APN uygulaması sonuçları.....	53

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Yağ asidi-glukoz substrat dengesi ile kalp hastalığı ilişkisinin şematik sunumu.....	6
Şekil 2. Diyabetik kardiyomiyopatiyi tetikleyen mekanizmalar.....	6
Şekil 3. Diyabetik kardiyomiyopatide kardiyak enerji metabolizması.....	7
Şekil 4. CD36'nın aracılık ettiği uzun zincirli yağ asitleri alım süreci.....	9
Şekil 5. Adiponektinin yapısı.....	9
Şekil 6. Adiponektin reseptörleri.....	10
Şekil 7. Adiponektinin temel sinyal yolları.....	11
Şekil 8. Adiponektinin kardiyak ve vasküler sistemlerde kardiyokoruyucu etkileri.....	13
Şekil 9. Çalışmanın şematize edilmiş hali.....	20
Şekil 10. İmmunofloresan deneyi için 35 kuyuluk deney düzeneği.....	23
Şekil 11. Protein eldesi için 6 kuyulu tabakaların düzeneği.....	25
Şekil 12. Mikroskopik görüntüler.....	33
Şekil 13. HL-1 hücre hattı kültüre edilmesi mikroskopik görüntüleri.....	34
Şekil 14. HL-1 hücre hattının 48 saat sonundaki kültürün mikroskopik görüntüleri.....	34
Şekil 15. H9c2 hücrelerinde 30 dk. APN uygulaması Western blot görüntüleri.....	38
Şekil 16. H9c2 hücrelerinde 30 dk. APN uygulaması Western blot görüntüleri	39
Şekil 17. H9c2 hücrelerinde 30 dk. boyunca 1.25 µg/ml APN uygulaması	41
Şekil 18. H9c2 hücrelerinde 30 dk. boyunca 2,5 µg/ml APN uygulaması.....	42
Şekil 19. H9c2 hücrelerinde 30 dk. boyunca 5 µg/ml APN uygulaması.....	43
Şekil 20. H9c2 hücrelerinde 1 saat boyunca 1,25 µg/ml APN uygulaması.....	44
Şekil 21. H9c2 hücrelerinde 1 saat boyunca 2,5 µg/ml APN uygulaması.....	45
Şekil 22. H9c2 hücrelerinde 1 saat boyunca 5 µg/ml APN uygulaması.....	46
Şekil 23. H9c2 hücrelerinde 2 saat boyunca 1,25 µg/ml APN uygulaması.....	47
Şekil 24. H9c2 hücrelerinde 2 saat boyunca 2,5 µg/ml APN uygulaması.....	48
Şekil 25. H9c2 hücrelerinde 2 saat boyunca 5 µg/ml APN uygulaması.....	49

Şekil 26. H9c2 hücrelerinde 24 saat boyunca 1,25 µg/ml APN uygulaması.....	50
Şekil 27. H9c2 hücrelerinde 24 saat boyunca 2,5 µg/ml APN uygulaması.....	51
Şekil 28. H9c2 hücrelerinde 24 saat boyunca 5 µg/ml APN uygulaması.....	52



SİMGELER VE KISALTMALAR

DCM: Diyabetik Kardiyomiyopati

KVH: Kardiyovasküler hastalıklar

DM: Diabetes mellitus

T1DM: Tip 1 diyabet

T2DM: Tip 2 diyabet

LCFA: Uzun Zincirli Yağ Asidi - Long chain fatty acid,

GLUT4: Glukoz Taşıyıcı 4

CD36: Farklılaşma Kümesi- Cluster of differentiation 36

APN: Adiponektin

AMPK: Aktive olan protein kinaz

PBS: Phosphate Buffer Saline

FBS: Fetal Bovine Serum

SDS: Sodyum Dodesil Sülfat

**ADİPONEKTİN'İN GLUKOZ VE YAĞ ASİDİ ALINMASINDAN VE
TAŞINMASINDAN SORUMLU GENLERİN İFADELERİ ÜZERİNE
ETKİSİNİN *in vitro* KARDİYAK HÜCRE MODELLERİNDE
ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Minel Can EKİN

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Moleküler Tıp Anabilim Dalı

ÖZET

Kardiyovasküler Hastalıklar; periferik arter, koroner arter, kalp kapağı, kalp kası ve doğuştan kalp hastalıklarından aritmilere ve kalp yetmezliğine kadar uzanan bir grup hastalığı içermektedir. Kardiyomiyopatiler, kalp yetmezliğinin önde gelen nedeni olan ve hipertansiyon, kalp kapağı hastalığı, iskemik kalp hastalığı veya doğuştan gelen kalp yetmezliği gibi ikincil nedenlerin yokluğunda miyokardın yapısal veya işlevsel bozuklukları ile tanımlanan çeşitli hastalık grubunu oluşturur. Diyabetik Kardiyomiyopati (DCM) geleneksel faktörler olan koroner arter hastalığı, hipertansiyon, kongenital kalp hastalıkları veya valvüler kalp hastalıklarıyla ilişkili olmayan, diyabet ile ilişkili yapısal ve fonksiyonel miyokard bozukluğudur. Sağlıklı kalpte, enerji kaynağı olarak glukoz ve uzun zincirli yağ asidi eşit oranda kullanılır. Ayrıca, glukoz ve uzun zincirli yağ asidi alımında ve taşınmasında dinamik bir denge vardır. Kalpte, yağ asidi ve glukoz alımında-taşınmasında görevli genlerin (CD36, GLUT4) vezikül aracılığıyla translokasyonunun inhibisyonu veya kalıcı olarak sarkolemmaya konumlanması sonucunda Diyabetik Kardiyomiyopati gelişir.

Adiponektin, yağ dokusu tarafından büyük oranda sentezlenen ve salgılanan bir adipokindir. Adiponektin, normal plazmada 5-30 µg/mL düzeyinde bulunmaktadır. Abdominal yağlanma, insülin direnci ve tip 2 diyabette adiponektin konsantrasyonu azalmaktadır. Adiponektin, kalpte iskelet kası tarafından yağ asidi oksidasyonunu ve glukoz alımını artırarak insülin direncini önlemektedir.

Çalışma kapsamında, Adiponektin'in *in vitro* kardiyak hücrelerde glukoz ve yağ asidi alımından ve taşınmasından sorumlu genlerin ifade değişimlerine etkisinin araştırılması amaçlandı. Proje kapsamında H9c2 hücre hattının kardiyak hücre özelliğini koruduğunun doğrulanması amacıyla immünofloresan deneyi yapıldı. *In vitro* kardiyak hücre hattında bazal, hipoglisemi ve hiperglisemi şartları uygulanarak Diyabetik Kardiyomiyopatinin taklit edildiği model oluşturuldu. Oluşturulan Diyabetik Kardiyomiyopati modelinde adiponektinin glukoz ve yağ asidi alımı-taşınımından sorumlu olan GLUT4 ve CD36'nın protein düzeyindeki ifade değişimlerine etkisi Western blot yöntemiyle saptandı.

Çalışmamızda belli zaman aralıklarında insülin sinyal yolağında etkili GLUT4 ekspresyonlarında artış gözlemlendi. Böylece farklı doz ve zamanlarda APN uygulamasının hücre içerisine glukoz alımındaki etkisinden dolayı DCM tedavisinde destekleyici olabileceği gösterildi.

Anahtar Sözcükler: Diyabetik Kardiyomiyopati, Adiponektin, Glukoz ve yağ asidi alımı-taşınımı, CD36, GLUT4

Tezin sayfa adedi: 86

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Özlenen ŞİMŞEK PAPUR

**INVESTIGATION OF THE EFFECT OF ADIPONECTIN ON EXPRESSIONS
OF GENES RESPONSIBLE FOR GLUCOSE AND FATTY ACID UPTAKE
AND TRANSPORT IN *in vitro* CARDIAC CELL MODELS**

Master Thesis

Minel Can EKİN

DOKUZ EYLUL UNIVERSITY HEALTH SCIENCE INSTITUTE

Department of Molecular Medicine

ABSTRACT

Cardiovascular Diseases; It includes a group of diseases ranging from peripheral artery, coronary artery, heart valve, heart muscle and congenital heart diseases to arrhythmias and heart failure. Cardiomyopathies constitute a diverse group of diseases defined by structural or functional disorders of the myocardium in the absence of secondary causes such as hypertension, heart valve disease, ischemic heart disease or congenital heart failure, which are the leading cause of heart failure. Diabetic Cardiomyopathy (DCM) is a structural and functional myocardial disorder associated with diabetes that is not associated with the traditional factors of coronary artery disease, hypertension, congenital heart disease or valvular heart disease. Diabetic Cardiomyopathy is diagnosed with the development of cardiomyopathy in the presence of diabetes, independent of hypertension and coronary artery disease. In a healthy heart, glucose and long-chain fatty acids are used equally as energy sources. There is a dynamic balance in their uptake and transport. In the heart, diabetic cardiomyopathy develops as a result of the inhibition of vesicle-mediated translocation of proteins (CD36, GLUT4) responsible for fatty acid and glucose uptake and transport or their permanent placement in the sarcolemma.

Adiponectin is an adipokine synthesized and secreted largely by adipose tissue. Adiponectin is at a level of 5-30 µg/mL in normal plasma; adiponectin concentration decreases in abdominal adiposity, insulin resistance and type 2 diabetes. Adiponectin prevents insulin resistance by increasing fatty acid excretion and glucose by skeletal muscle.

The aim of the study is to investigate the effect of adiponectin on the expression changes of genes responsible for glucose and fatty acid uptake and transport in in vitro cardiac cell lines. Within the scope of the project, the confirmation of the H9c2 cell line as a cardiac cell will be shown by immunofluorescence analysis. By creating two different cardiac in vitro cell models that mimic diabetic cardiomyopathy, the effect of adiponectin on the expression changes of GLUT4 and CD36 genes under basal, hypoglycemic and hyperglycemic conditions will be determined by Western blot method. This study aims to define new mechanisms that play a role in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy.

In our study, an increase in GLUT4 expressions effective in the insulin signaling pathway was observed at certain time intervals. Thus, it was shown that APN application at different doses and times could be supportive in DCM treatment due to its effect on glucose uptake into the cell.

Keywords: Diabetic cardiomyopathy, Adiponectin, Glucose and fatty acid uptake-transport, CD36, GLUT4.

Page number: 86

Advisor: Dr. Öğr. Üyesi Özlenen ŞİMŞEK PAPUR

1. GİRİŞ ve AMAÇ

1.1.Problemin Tanımı ve Önemi

Diyabet ile ilişkili komplikasyonlardan kardiyovasküler hastalıklar dünyada ve ülkemizde ölümün başlıca nedenidir. Çoklu miyokardiyal substratların artışına rağmen, diyabette kalpte yağ asidi kullanımı artar ve glukoz kullanımı azalır. Sağlıklı kalpte, enerji kaynağı olarak keton cisimleri, laktat, yağ asitleri ve glukoz tercihinde esneklik vardır. Glukoz ve yağ asitlerinin tercihinde bir denge mevcuttur. Enerji kaynağı olarak büyük bir kısmını yağ asitleri sağlıyor olsa da glukoz da önemli bir yere sahiptir.

Bozulmuş insülin sinyali, artan lipoliz ile dolaşımdaki serbest yağ asidi konsantrasyonunu arttırmaktadır. Yağ asitlerinin kullanımındaki artış; lipotoksiste, mitokondriyal disfonksiyon ve diyabetik kardiyomiyopati gibi mekanizmaları tetiklemektedir. Kardiyak enerji metabolizmasında yağ asitlerinin yanı sıra glukozun alınmasından ve taşınmasından sorumlu glukoz taşıyıcılar bulunmaktadır. Kalpte glukoz ve yağ asidi alım düzeyindeki değişim ve bunların taşınımından sorumlu olan proteinlerin translokasyonu Diyabetik Kardiyomiyopati patofizyolojisinde önemlidir.

Adiponektin (APN); beyaz yağ dokusundan ve 3T3-L1 adipositleri tarafından salgılanan proteindir. İnsan vücudunda en çok salgılanan adipokin olup fizyolojik düzeyi 5-30 $\mu\text{L/mL}$ 'dir. Adiponektinin reseptörlerinden AdipoR1 ve AdipoR2 kalpte eksprese edilmektedir, düzeyleri vücut yağı ve obezite ile ters orantılıdır. APN'nin kardiyomiyositlerde anti-inflamatuar, anti-fibrotik ve anti-apoptotik mekanizmaları etkilediği bilinmektedir. APN seviyesi ile tip 2 diyabet riski arasında ters ilişki bulunmaktadır ve adiponektin seviyeleri tip 2 diyabetli hastalarda önemli ölçüde azalmaktadır. Adiponektin seviyesindeki azalma insülin direncinin artmasına, miyokardiyal enerji disfonksiyonuna, lipid birikimine ve buna bağlı kontraktıl disfonksiyona neden olarak DCM gelişimini hızlandırır.

Çalışma kapsamında HL-1 ve H9c2 kardiyak hücre hatları kullanılmıştır. H9c2 hücre hattı sıçan kalbinden elde edilmiştir. HL-1 hücre hattı, yetişkin dişi C57BL / 6J faresinden eksize edilen AT-1 deri altı tümöründen türetilmiştir. Adiponektin'in DCM tedavisi için yeni terapötik hedef olabileceği düşünülmektedir ancak bunu hangi mekanizmalar aracılığı ile gerçekleştirdiği tam olarak açıklanamamıştır.

Çalışmamızda H9c2 hücre hattında hipoglisemi hiperglisemi koşullarının taklit edildiği glukoz konsantrasyonlarında oluşturulan DCM modelinde Adiponektin'in glukoz ve yağ asidi alımı-taşınmı üzerindeki olası etkisinin araştırılması amaçlandı. H9c2 hücresinin kardiyak hücre özelliğini koruduğu kardiyak biyobelirteçler olan Desmin, MHC ve ANF antikorları kullanılarak immünfloresan deneyi ile gösterildi. Glukozun farklı konsantrasyonlarında adiponektinin farklı doz ve sürelerde uygulanmasıyla oluşturulan DCM'nin taklit edildiği modelde glukoz ve yağ asidi alımı-taşınmından sorumlu genlerin (GLUT4, CD36) protein seviyesindeki ifade değişimleri Western Blot yöntemiyle belirlendi.

1.1. Araştırmanın Amacı

Çalışmanın amacı, adiponektinin kardiyak hücre hatlarında glukoz ve yağ asidi alımından ve taşınmasından sorumlu genlerin ifade değişimlerine etkisinin araştırılmasıdır.

1.2. Araştırmanın Hipotezi

Çalışma kapsamında hipotezimiz, adiponektinin kardiyak hücre hatlarında anti-diyabetik özellik göstererek yağ asidi alımından-taşınmından sorumlu CD36'nın gen ifadesini azalttığı ve hücre içerisine glukoz alımından-taşınmından sorumlu GLUT4'un gen ifadesini arttırdığı şeklindedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kardiyovasküler Hastalıklar

Kardiyovasküler hastalıklar (KVH'ler), dünya çapında önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olduğu için altta yatan patojenik mekanizmaların daha iyi anlaşılması gerekmektedir (1,2). KVH'ler, ailesel hiperkolesterolemi, kardiyomiyopatiler, konjenital kalp hastalıkları, torasik aort anevrizmaları, koroner arter hastalığı ve kalp yetmezliğine kadar ulaşan hastalıklar grubudur (2).

2.2. Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus (DM), dünya çapında 422 milyondan fazla insanı etkileyen önemli bir halk sağlığı sorunudur ve her yıl 1,5 milyon kişinin ölümü diyabet ile ilişkilendirilmektedir (3).

Diyabet, anormal derecede yüksek kan şekeri seviyeleriyle teşhis edilen bir endokrin sistem bozukluğu olup dünya çapında en yaygın ve en hızlı büyüyen hastalıklardandır (4). Dünya Sağlık Örgütü'nün- World Health Organization (WHO) diyabet ile ilgili verilerinde, diyabet ile yaşayan yetişkinlerin sayısının 1980'den bu yana neredeyse dört kat artarak 422 milyon yetişkine çıktığını göstermektedir. Yüksek kan şekerinin her yıl yaklaşık 4 milyon insanın ölümüne neden olduğu ve durdurmaya yönelik müdahaleler olmazsa 2045 yılına kadar en az 629 milyon kişinin diyabete yakalanacağı düşünülmektedir (5).

Diyabet, klasik olarak erken başlangıçlı otoimmün form Tip 1 diyabet (T1DM) ve geç başlangıçlı otoimmün olmayan form Tip 2 diyabet (T2DM) olarak ikiye ayrılır (4).

Diyabet, artmış kardiyak fibröz, sistolik ve diyastolik fonksiyonu olumsuz etkileyen yeniden düzenlenmeyle ilişkilidir. Diyabette dolaşımdaki yüksek yağ asidi seviyeleri; kardiyak yağ asidi alımını, yağ asidi β -oksidasyonunu ve metabolize edilmemiş yağ asitlerinin birikimini artırır. İnsülin direnci kardiyak glukoz alımını ve oksidasyonunu bozar, glukozu adenozin 5'-trifosfat (ATP) olmayan farklı enerji üretim yollarına yönlendirir. Diyabette kardiyak yağ asidi ve glukoz oksidasyonundaki

metabolik değişiklikler kardiyak ATP'de ve kardiyak verimlilikte azalmaya neden olur. Bu değişiklikler fonksiyonel iyileşmeyi kötüleştirir (6).

2.2.1 Tip 1 Diyabet

Tip 1 diyabet (T1DM) pankreatik adacık β hücrelerinin kaybının bir sonucu olarak ortaya çıkan insülin eksikliğine bağlı hiperglisemi ile karakterize kronik bir otoimmün hastalıktır (7,8). T1DM başlangıcı genellikle çocukluk çağında görülmesine rağmen erişkinlerde de görülebilmektedir ve hastaların %84'ünün erişkin olduğu bilinmektedir; erkek ve kadınlarda eşit oranda görüldüğü gözlemlenmiştir (5).

2.2.2 Tip 2 Diyabet

Tip 2 diyabet (T2DM), diyabetin % 90-95'ini oluşturmaktadır, yaygın olarak yetişkinlerde görülürken çocuk ve ergenlerde de sayıları artmaya devam etmektedir (5).

Tip 2 diyabet dünya çapında 400 milyondan fazla yetişkini etkilemektedir ve prevalansı epidemik oranlarda artmaya devam etmekte, dolayısıyla toplum için en büyük halk sağlığı sorunlarından birini oluşturmaktadır (9). Tip 2 diyabet ve insüline dirençli bireylerin klinik özelliği glukozun kandan temizlenme miktarının azalmasıdır ve bunun başlıca nedeni insülin ile uyarılan glukoz taşınmasının kas ve adipositlerde bozulmasıdır (10).

Hastalık, glisemiye yönetmede rol oynayan pankreas hormonu olan insülinin konsantrasyonu ve/veya aktivitesindeki eksiklik nedeniyle yüksek kan şekeri seviyeleriyle karakterize edilmektedir (11).

Diyabetin bu formuna sahip hastaların insülin seviyeleri normal veya yüksek görünmektedir, diyabetik hastalardaki yüksek kan şekeri seviyeleri, beta hücre fonksiyonlarının normal olduğu durumlarda daha yüksek insülin değeri göstermektedir (12).

2.3 Diyabetik Kardiyomiyopati

Diyabetik kardiyomiyopati- Diabetic cardiomyopathy (DCM), kalp dokusunda insülinin metabolik etkilerine dirençli, hiperinsülinemi, koroner arter hastalığı ve hipertansiyon gibi diğer kardiyak risk faktörlerinden bağımsız olarak ortaya çıkan

hipergliseminin ilerlemesi ile desteklenen spesifik bir kalp hastalığıdır (13,14). Uzun süreli hiperglisemi ve insülin direnci, DCM'yi tetikleyen iki ana faktördür (15).

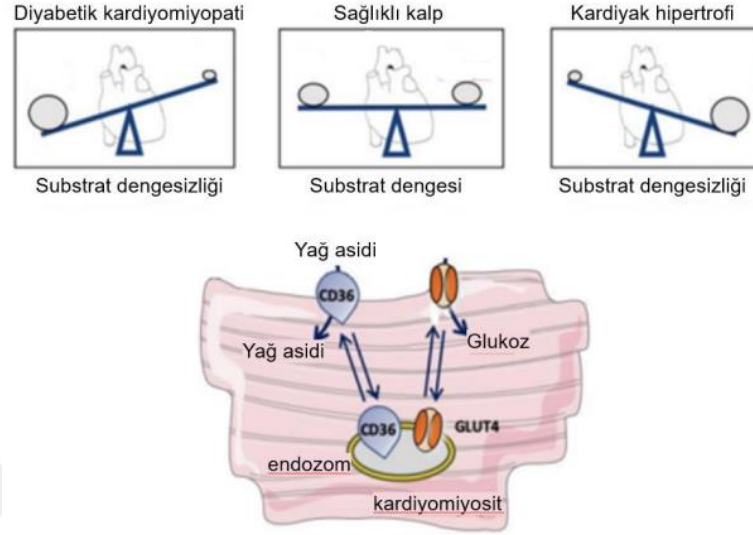
DCM'nin ilerlemesi, farklı patofizyolojik özelliklere ve klinik sonuçlara sahip üç farklı evreden oluşmaktadır (Tablo 1) (16).

Tablo 1. Diyabetik Kardiyomiyopati'nin evreleri (16).

EVRE	Patofizyolojik Olaylar	Yapı ve morfolojideki değişimler	İşlevsel Performans
ERKEN	- Hiperglisemi - Glut4'ün down regülasyonu - Serbest yağ asidi- Free fatty acid (FA) seviyelerinde artışlar - İnsülin direnci - Kalsiyum bozulması - Sempatik sinir sistemi	- Çok küçük patofizyolojik miyositlerde değişiklikler - Normal sol ventrikül kütlesi ve duvar kalınlığı	Sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu çok az veya hiç görülmemektedir.
İLERİ	- Kardiyomiyosit yaranlanması ve ölümü - Fibrozis - Aktif Renin-Anjiyotensin-Aldesteron Sistemi	Artmış sol ventrikül kütlesi, duvar kalınlığı ve boyutu	Sol ventrikül diyastolik fonksiyon bozukluğu ve hafif azalmış ejeksiyon fraksiyonu
GEÇ	- Miyokard fibrozisi - Anormal koroner mikrovasküler - İnflamatuar yanıt	Sol ventrikül kitlesinde, duvar kalınlığında ve boyutunda önemli artışlar	Hem diyastolik hem sistolik fonksiyonun bozulması

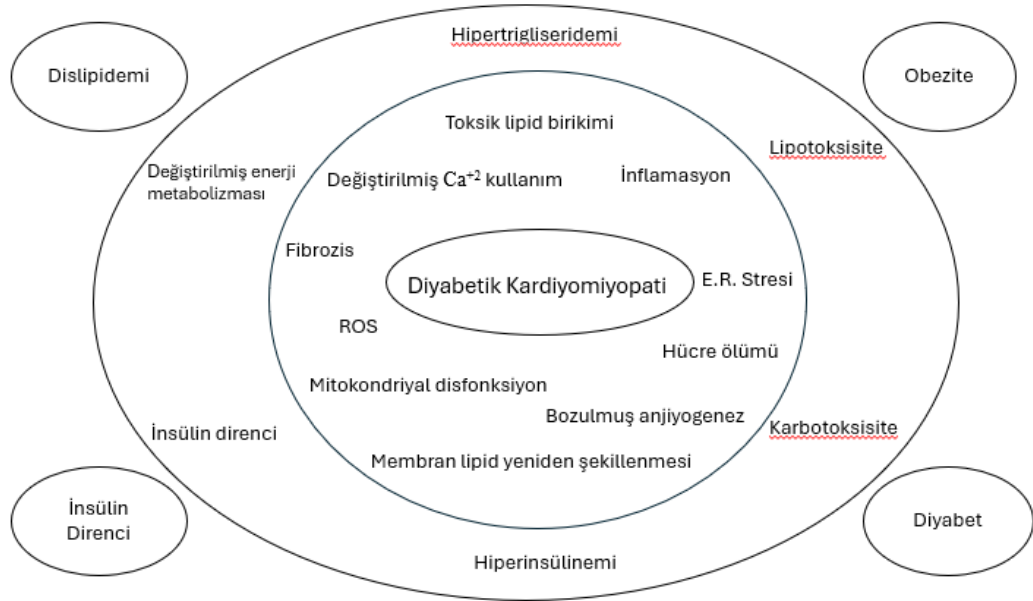
Sağlıklı kalpte, enerji kaynağı olarak glukoz ve uzun zincirli yağ asidi (Long chain fatty acid, LCFA) eşit oranda kullanılır. Bunların alımında ve taşınmasında dinamik bir denge vardır. Kalpte, LCFA ve glukoz alımında-taşınmasında görevli genlerin (CD36, GLUT4) vezikül aracılığıyla translokasyonunun inhibisyonu veya kalıcı olarak sarkolemmaya konumlanması sonucunda DCM tetiklenir (17). Sağlıklı

kalpteki denge durumu Diyabetik kardiyomiyopati’de, yağ asidinin daha fazla alımı yönüne kaymaktadır (Şekil 1) (18).



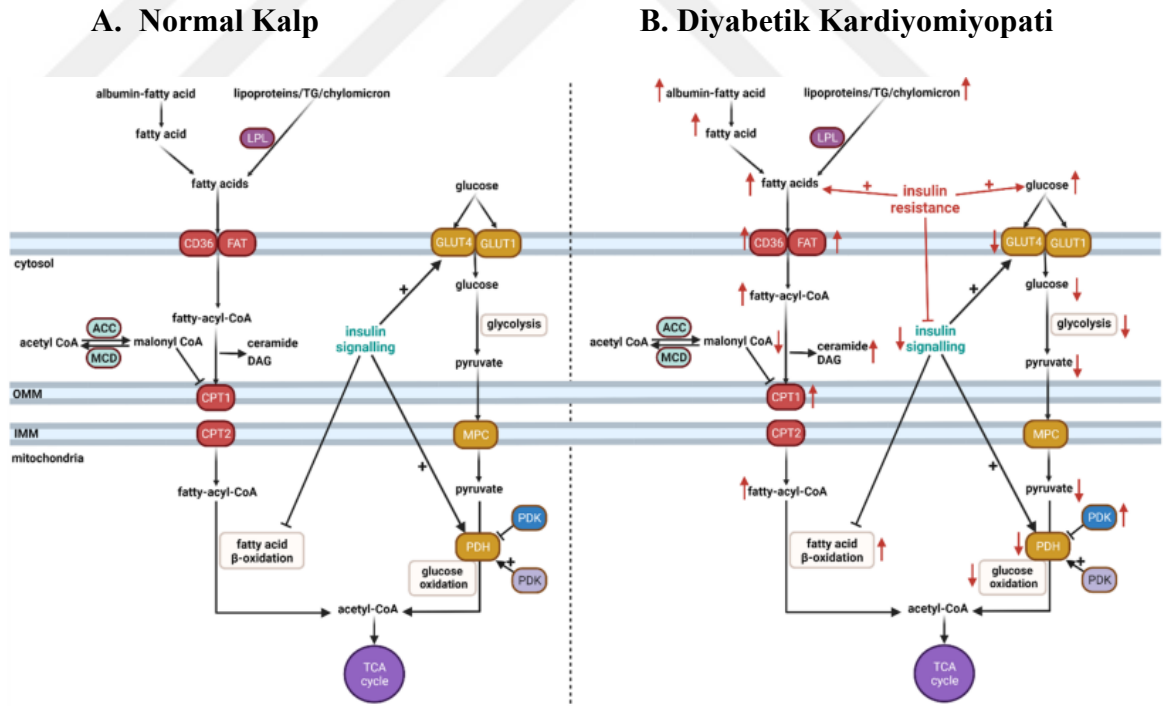
Şekil 1. Yağ asidi-glukoz substrat dengesi ile kalp hastalığı ilişkisinin şematik sunumu (18).

DCM’nin patogenezi çok faktörlü olmasına rağmen, diğer kardiyomiyopatilerden farklı olarak altta yatan temel mekanizma, değişen kardiyak metabolizmadır (Şekil 2) (19).



Şekil 2. Diyabetik kardiyomiyopatiyi tetikleyen mekanizmalar (19).

Kalp, kasılma fonksiyonunu sürdürebilmesi için ATP formunda sürekli ve yüksek miktarda enerjiye ihtiyaç duyar. Bu ihtiyacını karşılamak için; yağ asidi, glukoz, laktat, keton ve amino asit dahil olmak üzere çeşitli substratları enerji kaynağı olarak kullanmaktadır (20). Yağ asidi oksidasyonu, ATP üretiminin yaklaşık % 40-60'ını sağlayan en önemli enerji kaynağıdır. ATP üretiminin yaklaşık % 20-40'luk dilimini ise glukoz sağlamaktadır (21). Kalp metabolik olarak oldukça esneklik. Enerji kaynağını iş yüküne göre değiştirerek farklı oksidatif substratları tercih edebilir. Bununla birlikte kardiyak ATP üretiminde baskın olan yağ asidi β -oksidasyonu ve diyabette glukoz oksidasyonunda belirgin bir azalma olduğundan bozulmuş bir metabolik esneklik vardır (Şekil 3) (20). Kardiyak insülin direnci, insülinin yağ asidi β -oksidasyonu üzerindeki doğrudan önleyici etkilerini azaltarak yağ asidi β -oksidasyon oranını artırır. Aynı zamanda kardiyak insülin direnci, diyabette insülinin uyardığı glukoz alımının azalmasını tetikler (Şekil 3) (20,21). Glukoz taşıyıcısı 1 ve 4'ün (GLUT1 ve GLUT4) ekspresyon seviyelerinin diyabetik kalpte azalması glukoz alımında, glikolizde ve glukoz oksidasyonunda azalmaya yol açar (20).



Şekil 3. Diyabetik kardiyomiyopatide kardiyak enerji metabolizması. Kardiyak insülin direncinin ortaya çıkması ve bozulmuş insülin sinyali, diyabetik kardiyomiyopatide glukoz ve yağ asidi oksidasyonundaki değişikliklere yol açar (20).

2.4. GLUT4

12 transmembran sarmalı dahil olmak üzere GLUT ailesinin pek çok izoformu bulunmaktadır. Bu aile üyeleri, insan vücudunda dolaşımdan glukoz alımına, enerjiden bağımsız olan ve glukozu hücrel membranlar boyunca taşımakta görevlidir. GLUT gen ailesinde bulunan GLUT4, esas olarak yağ ve kas dokularında eksprese olur. 45 kDa moleküler ağırlığa ve 509 aminoasit içermektedir. Ayrıca insülin tarafından uyarılmayan hücrelerdeki depolama veziküllerinde (GSV'lerde) hücre içi olarak tek başına lokalizedir (22-24).

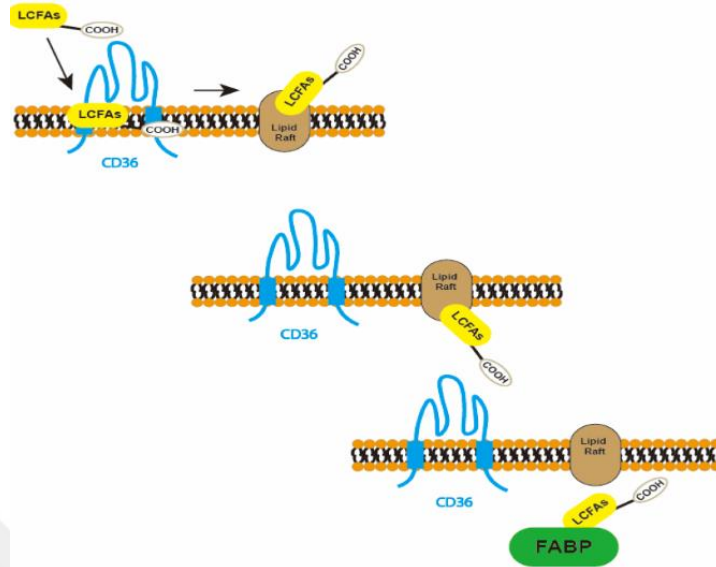
GLUT4, vücut glukoz homeostazının düzenlenmesinde anahtar rol oynayan insüline duyarlı bir glukoz taşıyıcısıdır (25). İnsülin, PI3K/Akt sinyal yolağını aktive ederek, GSV'lerden GLUT4 geçişini düzenler. Böylece adipositlerdeki plazma zarına veya miyositteki sarkolemmaya ve enine tübül zarına etki ederek iskelet kası ve yağ dokularına glukoz alımını artırır (26).

2.5. CD36

Farklılaşma Kümesi- Cluster of differentiation 36 (CD36) 88 kDa moleküler ağırlığa sahip 472 amino asit içeren bir transmembran glikoprotein reseptörüdür (27). CD36; trombositlerde, immün hücrelerinde, adipositlerde, miyositlerde, enterositlerde, enteroendokrin hücrelerinde, retina ve meme epitel hücrelerinde ve mikrovasküler endotel hücrelerinde eksprese edilir (28). CD36, LCFA'ları bağlar ve hücre içerisine aktarır, düşük yoğunluklu lipoprotein, trombospondin-1 ve patojenle ilişkili molekülleri oksitler (29). LCFA'lar moleküler yapısında her iki ucunda da bulunan bir karboksil grubu ve bir metil grubu sayesinde bir enerji kaynağı olarak görev alır (29).

CD36; LCFA'ların hücre içerisine alımına üç adımda aracılık etmektedir (Şekil 4). İlk adım, CD36'nın hücre zarına gelen LCFA'ları bağlayarak bunları plazma zarı üzerindeki spesifik lipid yapılarına bağlayan bir yağ asidi reseptörü olarak görev yaptığı hücre dışı alımdır. İkinci adım, yağ asitlerinin polar karboksil gruplarının lipid çift katmanı boyunca hücre dışından hücre içine geçtiği ve yer değiştirdiği translokasyondur. Son adım ise, yağ asitlerinin plazma zarının iç bağlanma

bölgesinden sitoplazmaya girdiği ve spesifik olarak yağ asidi bağlayıcı proteinlere (FABP'ler) bağlandığı desorpsiyondur (29,30).



Şekil 4. CD36'nın aracılık ettiği uzun zincirli yağ asitleri alım süreci (29).

2.6 Adiponektin

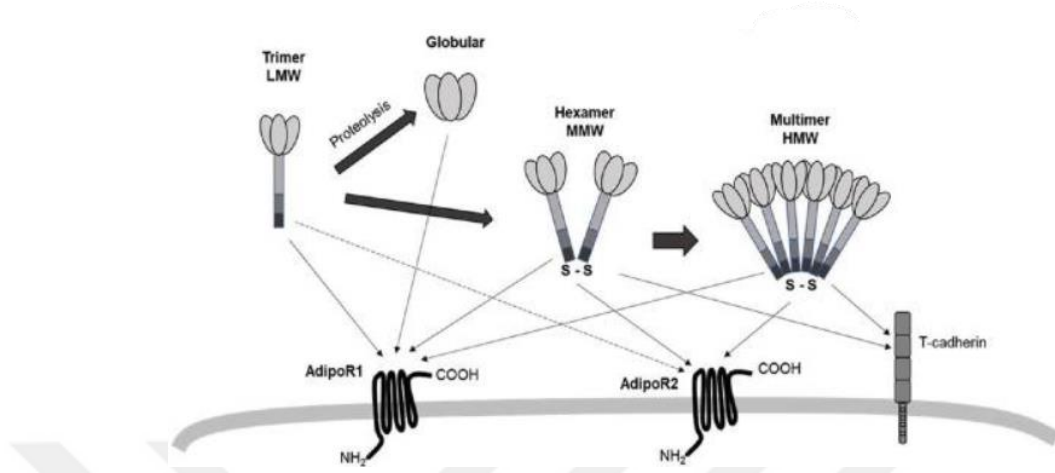
Adiponektin (APN); beyaz yağ dokusundan ve 3T3-L1 adipositleri tarafından salgılanan proteindir. APN, insan kanında en çok salgılanan adipokin olup yağ dokularından salgılanmasının fizyolojik düzeyi 5-30 µg/mL'dir (31,32). APN; 30 kDa molekül ağırlığında, 244 amino asitten oluşan ve 3q27 kromozomu üzerindeki ADIPOQ geni tarafından kodlanır (33). APN; N terminalinde bir sinyal peptidi, kısa bir değişken bölge, bir kolajen alan ve C1q'ya homolog bir C terminal küresel alanı olmak üzere 4 farklı alandan oluşmaktadır (34) (Şekil 5).



Şekil 5. Adiponektinin yapısı (31).

Dolaşımdaki APN oligomerleri plazmada üç multimerik formda bulunur. Küresel alan, hidrofobik bağ ile düşük moleküler ağırlıklı trimerlerin oluşumuna izin verir; disülfid bağları ile kolajen alanı seviyesindeki etkileşimler, orta moleküler ağırlıklı heksamerler (iki trimerin birleşmesi) ve yüksek moleküler ağırlıklı

multimerlerden (4 ila 6 trimer) oluşmaktadır. APN'nin formları farklı biyolojik özelliklere ve doku hedeflerine sahiptir (32).



Şekil 6. Adiponektin yapısı ve reseptörleri (32).

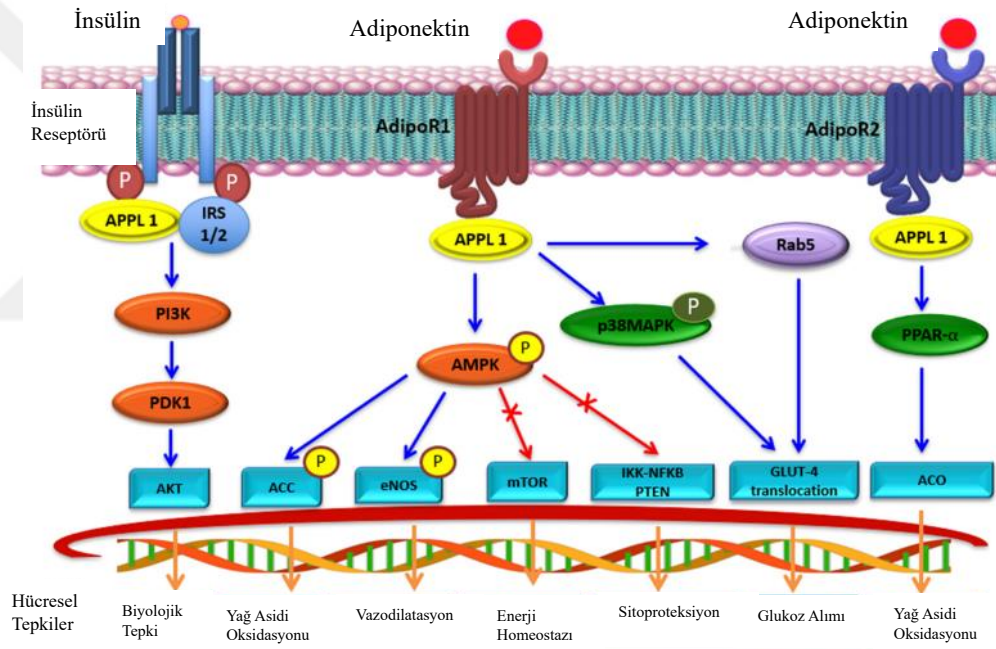
APN'nin biyolojik etkilerini gösterebilmesi için spesifik reseptörlere (AdipoR1 ve AdipoR2) bağlanması gerekmektedir (32). AdipoR1 ve AdipoR2, birincil APN reseptörleridir ve her ikisi de yedi transmembran alandan oluşmaktadır. AdipoR1 ve AdipoR2, hücre dışı C terminali ile ters bir topolojiye sahiptir (35). Hem AdipoR1 hem de AdipoR2 kalp hücrelerinde eksprese edilir (36) ve ekspresyon seviyeleri, vücut yağı ve obezite ile ters orantılıdır (32).

Üçüncü bir reseptör olarak T-Kadherin bulunmaktadır. T-kadherin, transmembran ve sitoplazmik alanlardan yoksun olan ve bir glikosilfosfatidilinositol (GPI) aracılığıyla yüzey zarına bağlanan ve hücre yapışmasında rol oynayan glikoproteindir (37,38). Adiponektin'in reseptörlerine bağlanması, adenosin monofosfat (AMP) ile aktive olan protein kinazın (AMPK) aktivasyonunu ve p38 mitojenle aktive olan protein kinaz (p38 MAPK), peroksizom proliferatörle aktive olan reseptör- α (PPAR α), RAS ile ilişkili protein Rab5, fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) ve v-akt murin timoma viral onkogen homologu (Akt) gibi çeşitli sinyal moleküllerinin aktivasyonunu tetikler (37,39). Ayrıca, AMPK, memeli hücrelerinde birincil hücre enerji dengesi sensörü olarak glukoz konsantrasyonunu ve lipid metabolizmasını kontrol eden bir serin/treonin protein kinazdır (40).

2.6.1. Adiponektin Aracılı Metabolizmanın Sinyal Yolları

Adiponektin sinyalleme esas olarak, adiponektinin kendi reseptörlerine bağlandığı ve AMPK, mTOR, NF- κ B, STAT3 ve JNK yolları aracılığıyla çeşitli hücre içi sinyalleme kaskadlarının aktivasyonunu başlattığı reseptör-ligand tipi etkileşimlere dayanır (39).

Adiponektin, AdipoR'nin hücre içi alanına bağlanan APPL1 adaptör proteini tarafından aracılık edilen AMPK sinyallemesinin aktivasyonunu başlatır. AMPK aktivasyonu, moleküllerin, diğer düzenleyici proteinlerin ve önemli transkripsiyon faktörlerinin biyosentezini içeren ilgili alt moleküllerin aktivasyonuna yol açar (31) (Şekil 7).



Şekil 7. Adiponektinin temel sinyal yolları. Adiponektin ve AdipoR'ler (AdipoR1 ve AdipoR2) aşağı akış sinyal yollarını aktive etmek için etkileşime girer. Adiponektinin reseptörlerine bağlanması adaptör protein APPL1'i aktive eder. Aktive edilmiş APPL1, PPAR- α 'yı aktive ederek ve AMPK ve p38 MAPK'yı fosforile ederek karmaşık sinyal iletimini başlatır. Fosfo-AMPK, lipogenezi inhibe eder ve ACC-1'i fosforile ederek yağ asidi oksidasyonunu ve mitokondriye taşınmasını teşvik eder. Fosforile edilmiş eNOS, vazodilatasyona neden olan nitrik oksiti (NO) uyarır. Ek olarak, adiponektin, AMPK'nin aktivasyonu mTOR ve IKK-NF κ BPTEN sinyallemesini baskıladığı için

sitoprotektif etki gösterir. İnsülinin metabolik etkileri esas olarak PI3K-Akt sinyalleme tarafından kontrol edilir. PI3K-Akt aktive edildiğinde glikojen sentezi ve glikoz alımı artar ancak lipoliz baskılanır. IRS1/2 adiponektin tarafından aktive edildiğinde insülin duyarlılığı artar.

Adiponektin'in yalnızca beyaz yağ dokusu tarafından üretildiği bilinmektedir ancak yapılan son çalışmalarda iskelet kası, karaciğer, epitel hücreleri, plasenta dokusu, osteoblastlar ve kardiyomiyositler dahil olmak üzere diğer dokularında deri altı yağ depolarıyla karşılaştırıldığında daha küçük miktarlarda da olsa adiponektin'in eksprese edildiği ve salgılandığı gösterilmiştir (41).

2.6.2. Adiponektinin Farklı Dokulardaki Fonksiyonları

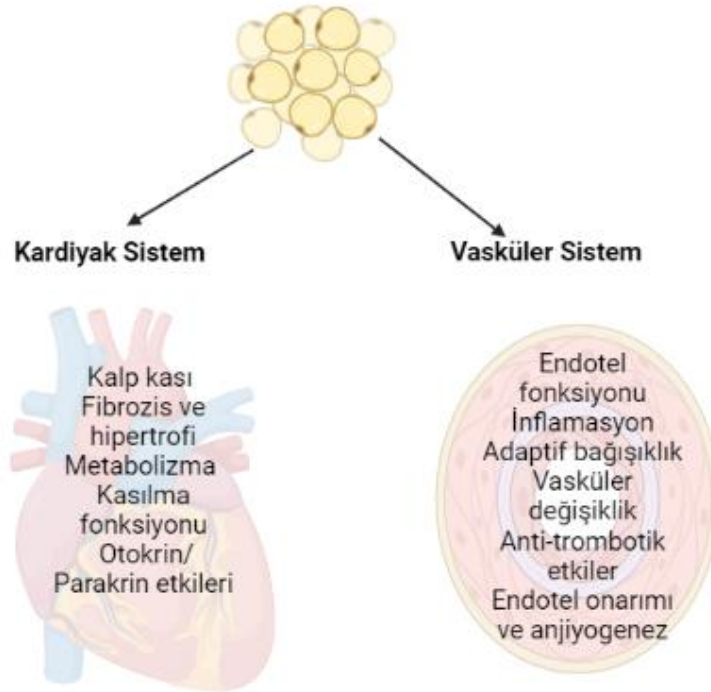
Adiponektin, farklı organlarda işlev görmektedir.

Tablo 2. Adiponektinin farklı organlardaki işlevleri özetlenmiştir (42).

Organlar	Adiponektin Fonksiyonları
Beyin	❖ İnsülin duyarlılaştırıcı, antienflamatuar, anjiyojenik ve damar genişletici özellikler ❖ Beyin bariyerini geçebilir ve beyin omurilik sıvısında tespit edilebilir ❖ Enerji homeostazi, hipokampal nörojenез ve sinaptik plastisite gibi önemli beyin fonksiyonlarını kontrol eder ❖ Nörojenез ve sinaptik plastisiteyi kontrol eder ❖ AdipoR1 esas olarak hipokampusta eksprese edilir ❖ Bilişsel işlevler üzerinde önemli bir etkiye sahip olabilir
Karaciğer	❖ Glukoz ve lipid metabolizmasını kontrol eder; glukoneogenezi azaltır ve glikoliz ve yağ asidi oksidasyonunu artırır ❖ Sirtuin-1 (SIRT1)-AMPK yolunun aktivasyonu ile yağ birikimini azaltır ❖ Glukoneogenzi inhibe eder, kan dolaşımındaki insülin seviyelerini azaltır, bu da lipogenezi azaltır ve yağ asitlerinin oksidasyonunu artırır
Kas	❖ İnsülin duyarlılığını ve yağ asidi oksidasyonunu teşvik eder ve iskelet kaslarında glukoz alımını artırır ❖ Çekirdekten sitozole (Protein-adaptif protein1) APPL1'e bağımlı protein LKB1 transferini artırır, bu da AMPK'nın aktivasyonuna yol açar
Kalp	❖ Kalbi aşağıdaki mekanizmalarla korur:

Organlar	Adiponektin Fonksiyonları
	- AdipoR1 ile APPL1 ve APPL2 arasındaki etkileşimleri artırır, AMPK-α2'ye bağlanır, asetil-CoA karboksilaz (ACC) fosforilasyonu ve inhibisyonu ile sonuçlanır, bu da yağ asitlerinin oksidasyonunda artış sağlar
Böbrek	❖ Böbrekler üzerinde faydalı etkiler ve ayrıca fare modellerinde albüminüriden korur ❖ Protein-kinaz ile aktive olan AMPK yolunun aktivasyonu yoluyla anti-enflamatuar ve antioksidan etkiler
Kemik	❖ Yağ-kemik ilişkisinin aracısı ❖ Kan adiponektin konsantrasyonları ile kemik mineral yoğunluğu arasında negatif ilişki ❖ AdipoR1 ve AdipoR2, insan primer osteoblastlarında ve kemik iliği makrofajlarında eksprese edilir ve osteoklast farklılaşmasını uyarır

APN, kardiyak fibroblastlar, miyositler, vasküler düz kas hücreleri, endotel hücreleri ve monosit-makrofajlar dahil olmak üzere vasküler ve kardiyak sistemlerin farklı bileşenlerinde anti-inflamatuar, anti-aterojenik ve anti-fibrotik etki göstermektedir (Şekil 8) (43).



Şekil 8. Adiponektinin kardiyak ve vasküler sistemlerde kardiyo koruyucu etkileri (43). (BioRender ile hazırlanmıştır).

2.6.3. Diyabetik Kardiyomiyopatide Adiponektin'in Rolü

Adiponektin sinyallemesinin koruyucu etkileri karaciğer, böbrek ve iskelet kasında yaygın olarak bildirilmiştir. AMPK'nin AdipoR1 uyarımına ve APPL1 sinyalleme yoluyla PPAR α 'nın AdipoR2 aktivasyonuna neden olmaktadır (41). Adiponektin, kardiyomiyositlerde anti-inflamatuar, anti-fibrotik ve anti-apoptotik mekanizmaları indüklemektedir (32). Diyabetli hastalarda, kardiyak AdipoR seviyelerinde azalma görülmesi; kardiyak yapıda değişikliklere, inflamasyona ve diyastolik disfonksiyona yol açar (41).

Diğer adipokinlerin çoğundan farklı olarak; obezite, tip 2 diyabet ve KVH dahil olmak üzere ilgili patolojilerde Adiponektin'in plazma seviyesi azalır (42). APN miyokard dokularında yaygın olarak eksprese edildiğinden, *in vivo* ve *in vitro* anti-inflamatuar ve anti-aterosklerotik özellik gösterir, böylece kardiyoprotektif etkiye sahiptir. Ayrıca APN, enflamasyonu azaltarak ve çeşitli araçların neden olduğu hasarı önleyerek de kardiyoprotektif etki gösterebilmektedir (36).

APN seviyesi ile tip 2 diyabet riski arasında ters ilişki bulunmaktadır ve adiponektin seviyeleri tip 2 diyabetli hastalarda önemli ölçüde azalmaktadır. Toplam adiponektinin düşük seviyelerinin, tip 2 diyabetli hastalarda kardiyovasküler hastalıkların riskinin daha yüksek olmasıyla ilişkili olduğu bilinmektedir (44), ancak adiponektinin diyabetik kardiyomiyopatideki rolü tam olarak anlaşılamamıştır (45).

İnsülin direnci, DCM'nin önemli bir patojenik mekanizmasıdır. Azaltılmış AdipoR1 ekspresyonu insülin direncini şiddetlendirir ve *in vivo* diyabet modeli oluşturulan sıçanlarda, diyabetik kardiyomiyopati gelişmesine neden olur (46). Adiponektin seviyesinin azalması ve insülin direncinin artması miyokardiyal enerji disfonksiyonuna, lipid birikimine ve buna bağlı kontraktıl disfonksiyona neden olarak DCM gelişimini hızlandırır (45).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Deneyssel kontrollü bir araştırmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri, Zamanı ve Planı

Araştırma Kasım 2023 ile Temmuz 2024 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi SBE Moleküler Tıp AD laboratuvarı ve Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı (ARLAB) alt yapı ve olanakları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3. Araştırmanın yapılması tahmin edilen zaman planı

İş Paketlerinin Adı ve Hedefleri	Zaman Aralığı
Teze ilişkin projenin hazırlanması	Nisan- Eylül 2022
Tez önerisinin hazırlanması Etik kurul onayı	Temmuz – Eylül 2022
Projenin kabul edilmesi Malzeme alımı	Mayıs- Kasım 2023
Hücrelerin kültüre edilmesi ön çalışma ve antikor optimizasyonları	Kasım 2023 – Mart 2024
Hedef proteinlerin ifade analizlerinin Western Blot yöntemi ile yapılması	Mart 2024 – Temmuz 2024
Deneylerin istatistiksel analizlerinin yapılması ve yorumlanması	Temmuz 2024 – Ağustos 2024
Tez yazımı	Ocak-Ağustos 2024

3.3. Çalışma Materyali

H9c2 embriyonik BD1X sıçan kalp dokusundan elde edilen kardiyomiyosit hücre hattı, ticari olarak sertifika analiziyle birlikte American Type Culture Collection- ATCC'den (Kat. No: CRL-1446) satın alındı.

HL-1 yetişkin dişi C57BL/6J fare AT-1 deri altı tümör dokusundan elde edilen immortal kardiyomiyosit hücre hattı, ticari olarak analiz sertifikası ile Millipore Sigma firmasından (Kat No: SCC065) satın alındı.

3.4. Araştırmanın Değişkenleri

Araştırma kapsamındaki bağımlı ve bağımsız değişkenler:

Bağımsız değişken: Glukoz ve adiponektin.

Bağımlı değişken: Hedeflenen genlerin (CD36, GLUT4) ifade analizleri

3.5. Veri Toplama Araçları

3.5.1. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler ve Cihazlar

Tablo 4. Proje kapsamında kullanılan kimyasal malzeme ve sarfların listesi

No	Adı	Markası / Kod	Kullanım Gerekçesi
1	H9c2 hücre hattı	ATCC/CRL.1446	Hücre kültüründe kullanılmıştır.
2	DMEM ortamı	Gibco/41966029 Gibco/11880028	H9c2 hücre hattının kültüre edilmesinde kullanılmıştır.
3	Adiponektin	PeproTech/315-26-1MG	Hücre hattında oluşturulan modelde etkisi incelenmiştir.
4	Trypsin-EDTA	Gibco/25200056	Hücre pasajlama aşamalarında kullanılmıştır.
5	L-glutamin	Thermo/2503002 4	Büyüme ortamlarını hazırlamak için kullanılmıştır.
6	PBS	Gibco/70011036	Hücre kültüründe yıkama işleminde kullanılmıştır.
7	DMSO	ATCC/4.X	Hücre dondurma ortamının hazırlanmasında kullanılmıştır.
8	FBS	Gibco/10270106	Hücrenin büyüme ortamında serum olarak kullanılmıştır.
9	Penisilin/ Streptomisin	Gibco/15140122	Hücre kültüründe büyüme ortamlarının hazırlanmasında kullanılmıştır.
10	Tripan mavisi	Gibco/15250061	Hücre sayımında kullanılmıştır.
11	Yüzey temizleyici alkol	TEKKİM / OKM.IZ.TK.2006 50.05001	Hücre kültürü laboratuvarında dezenfeksiyon için kullanılmıştır.
13	SDS	SİGMA/L3771	SDS-PAGE jeli hazırlamada kullanılmıştır.

14	Glukoz	Sigma/G7021	Hücrenin inkübasyonunda kullanılmıştır.
15	RIPA tamponu	CST/9806	Protein izolasyonunda kullanılmıştır.
16	Nitroselüloz membran	BioRad/1620115	Western Blot protokolünde kullanılmıştır.
17	PVDF Membran	Thermo/88518	Western Blot protokolünde kullanılmıştır.
18	TEMED	Sigma/T22500	SDS-PAGE jeli hazırlamada kullanılmıştır.
19	APS	Sigma/248614	SDS-PAGE jeli hazırlamada kullanılmıştır.
20	Tris	Sigma/T15760	SDS-PAGE jeli hazırlamada kullanılmıştır.
21	Akrilamid/ Bisakrilamid	BioRad/1610156	SDS-PAGE jeli hazırlamada kullanılmıştır.
22	Transfer buffer	BioRad/1610732	Western Blot protokolünde kullanılmıştır.
23	BSA	Sigma/A2153-10G	Western Blot protokolünde bloklamada kullanılmıştır.
24	Süt tozu	SİGMA/70166	Western Blot protokolünde bloklamada kullanılmıştır.
25	Protein Marker	Thermo/26619	Western Blot protokolünde bloklamada kullanılmıştır.
26	DTT	Thermo/R0861	Western Blot protokolünde bloklamada kullanılmıştır.
27	Proteaz/Fosfat az İnhibitör Kokteyl	CST/5872	Protein izolasyonunda kullanılmıştır.
28	ECL Western Kiti	BioRad/1705061	Western Blot protokolünde görüntü alma aşamasında kullanılacaktır.
29	GAPDH Poliklonal Antikoru	CST/2118	Western Blot protokolünde bloklamada kullanılmıştır.
30	GLUT4 Poliklonal Antikoru	CST/2213	Western Blot protokolünde bloklamada kullanılmıştır.
31	CD36 Poliklonal Antikoru	CST/28109	Western Blot protokolünde bloklamada kullanılmıştır.

32	HRP Konjuge Keçi Anti- Tavşan IgG (H+L) İkicil Antikoru	CST/7074	Western Blot protokolünde bloklamada kullanılmıştır.
33	HRP Konjuge Eşek Anti- Tavşan IgG (H+L) İkicil Antikoru	CST/7076	Western Blot protokolünde bloklamada kullanılmıştır.
34	6 Well Plate	LabSelect/11112	Hücre hattının kültüre edilmesinde kullanılmıştır.
35	75 cm2 Flask	LabSelect/13212	Hücre hattının yetiştirilmesinde kullanılmıştır.
36	25 cm2 Flask	LabSelect/13112	Hücre hattının yetiştirilmesinde kullanılmıştır.
37	Falkonlar	LabSelect	Hücre kültüründe kullanılmıştır.
38	Ependorflar	Golden Gate/Lab Select	Hücre kültüründe kullanılmıştır.
39	1,2 ml Kriyo Tüp	S.091.11.102	Hücre kültüründe kullanılmıştır.
40	Serolojik Pipetler	LabSelect	Hücre kültüründe kullanılmıştır.
41	Thoma Lam/Lamel	I075.03.001	Hücre kültüründe kullanılmıştır.
42	Filtreli- Filtresiz Pipet Ucu	LabSelect	Hücre kültüründe kullanılmıştır.
43	200 µl Pipet Ucu Uzun Tip	LabSelect/FT- 200-LR-R-S	Western Blot protokolünde örneklerin yüklenmesinde kullanılmıştır.
44	Tween 20	BioRad/1706531	Western Blot ve Immunofloresan protokolünde kullanılmıştır.
45	Metanol	İSOLAB/947.046	Western Blot ve Immunofloresan protokolünde kullanılmıştır.
46	Monoklonal Anti-Desmin Antikoru	CST/5332	Immunofloresan protokolünde kullanılmıştır.
47	Sarkomerik Miyozin Ağır Zinciri	İnvitrogen/MA12 6180	Immunofloresan protokolünde kullanılmıştır.

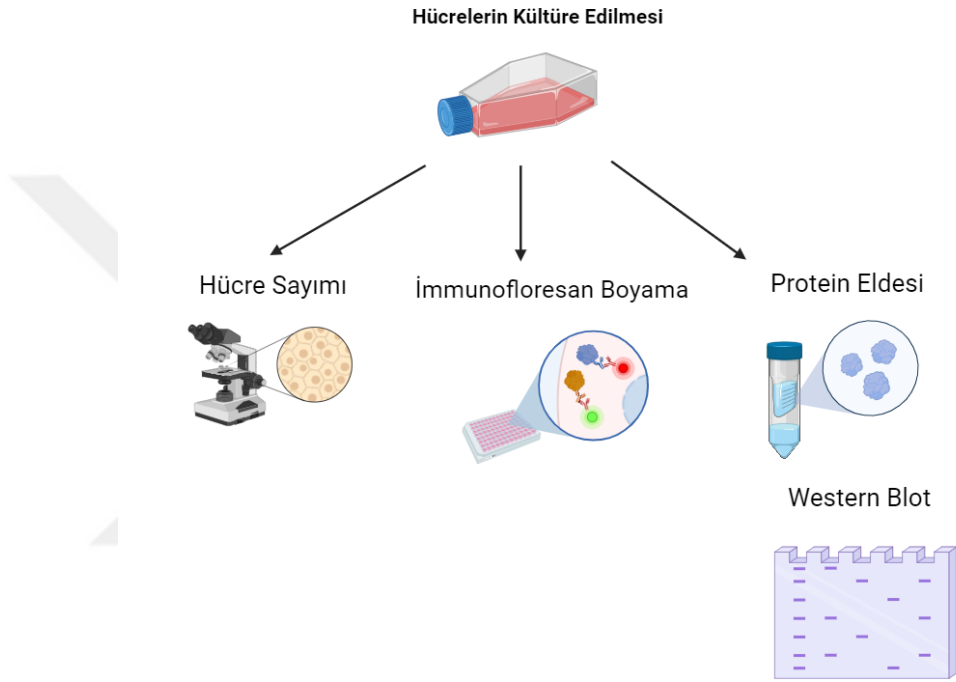
	Antikoru (MHC)		
48	Atriyal Natriüretik Faktör Antikoru (ANF)	İnvitrogen/PA3228	Immunofloresan protokolünde kullanılmıştır.
49	Keçi Anti-Fare IgG (H+L) Antikoru, Rodamin Konjugatı	Sigma/AP124R	Immunofloresan protokolünde kullanılmıştır.
50	FITC Konjugatı	Sigma/AP132F	Immunofloresan protokolünde kullanılmıştır.
51	HL-1 Hücre Hattı	MERCK/SCC065	Hücre kültüründe kullanılmıştır.
52	Gelatin	Sigma/G9391	Hücre kültüründe hücrenin kültüre edilmesinde kullanılmıştır.
53	L-Askorbik Asit	Sigma/A7506	Hücre kültüründe hücrenin kültüre edilmesinde kullanılmıştır.

Tablo 5. Proje kapsamında kullanılan cihazların listesi

No	Ad	Marka	Kullanım Amacı
1	Sınıf 2 biyogüvenlik kabini	Heraeus HeraSafe	Steril hücre kültürü yapmak
2	Etüv	Memmert	Hücre kültürü malzemelerinin ısıtılması
3	İnverted mikroskop	Nikon Eclipse TS100	Hücrelerin mikroskopik incelenmesi
4	CO ₂ inkübatörü	Nuarie-5500E	Hücre kültürü yetiştirilmesi
5	Mikroskop görüntüleyici	Nikon	Hücre kültürü görüntülerinin detaylı incelenmesi
6	Distile su cihazı	Reservoir USF-Elga	Saf su kullanılması
7	Vorteks	Wised (VM-10)	Kimyasalların karıştırılması
8	Santrifüj	Hettich Rotofix 32	Hücrelerin çöktürülmesi
9	Soğutmalı santrifüj	Sigma 2K15C	Protein izolasyonu
10	Su banyosu	Memmert	Dondurulmuş hücrelerin çözdürülmesi
11	Mikroplaka okuyucu	Biotek Synergy HT	Protein konsantrasyonu ölçümü
12	Elektroforez sistemi	BioRad	Elektroforez

13	Turbo transfer	BioRad	Western blotta transfer
14	Görüntüleme cihazı	Vilber Lourmart Chemi-Smart 3000	Western blotta protein bandının görüntülenmesi
15	Derin dondurucu	Thermo	Hazırlanan örneklerin saklanması

3.5.2. Kullanılan Metotlar



Şekil 9. Çalışmada uygulanan yöntemlerin şematize edilmesi (BioRender kullanılarak oluşturulmuştur).

3.5.2.1. Hücre Kültürü

3.5.2.1.1. HL-1 Hücre Hattı Kültürü

HL-1 hücre hattı, kardiyak fenotipi korunurken sürekli olarak bölünebilen ve kendiliğinden kasılabilen ölümsüzleştirilmiş bir fare kardiyomiyosit hücre hattıdır.

Flaskları Jelatin/Fibronektin ile önceden kaplama

1. 0,1 g jelatin tartıldı ve 500 ml'lik bir cam şişede otoklavlandı.
2. 199 ml %0,02 jelatin içinde, 1 ml fibronektin 1 mg/ml olacak şekilde seyreltildi ve alıkatlandı.

3. Flasklar Jelatin/Fibronektin ile kaplanarak 2-8°C’de bir gece inkübe edildi.

Ortamın Hazırlanması

(+)-Norepinefrin (A0937) 100X (10 mM) Stok Çözeltisinin Hazırlanması

1. 30 mM konsantrasyonda (50 mL damıtılmış suda 0,264 g L-Askorbik asit)i L-Askorbik Asit hazırlandı.
2. Hazırlanan 30 mM L-Askorbik asit çözeltisine 160 mg Norepinefrin eklendi ve 0,2 µm filtre kullanarak filtreden geçirildi.

Hücrelerin Çözülmesi

1. Dondurulmuş HL-1 hücrelerini içeren kriyotüp sıvı nitrojenden çıkarıldı ve 37 °C su banyosunda çözündürüldü.
3. Hücre kültürü kabininde hücreler 15 mL falkona aktarıldı ve üzerine damla damla 9 mL HL-1 hücre ortamı eklendi.
5. Hücre süspansiyonuna yavaşça iki kez pipetaj yapıldı.
6. Hücre süspansiyonunu içeren falkonlar, pelet oluşturmak için 2-3 dakika boyunca 300 x g’de santrifüj edildi.
7. Santrifüj işleminden sonra, üst faz uzaklaştırıldı.
8. Hücre pelleti 10-15 mL HL-1 ortamında yeniden süspanse edildi.
9. Hücre süspansiyonu Jelatin/Fibronektin kaplı T25 flaksa aktarıldı.
10. Hücreler %5 CO₂ içeren nemli bir inkübatörde 37 °C’de inkübe edildi.
11. Ertesi gün, hücre ortamı 10-15 mL taze HL-1 hücre ortamı ile değiştirildi.

3.5.2.1.2. H9c2 Hücre Hattı Kültürü

Tablo 6. Deney seti

25 mg/dL glukoz (+Ortam + Hücre)
100 mg/dL glukoz (+Ortam + Hücre)
200 mg/dL glukoz (+ortam + Hücre)
Adiponektin (APN) 1.25 µg/mL (+Ortam + Hücre)

APN 2.5 µg/mL (+Ortam + Hücre)
APN 5 µg/mL (+Ortam + Hücre)
APN (1.25 µg/mL) + 25 mg/dL glukoz
APN (1.25 µg/mL) + 100 mg/dL glukoz
APN (1.25 µg/mL) + 200 mg/dL glukoz
APN (2.5 µg/mL) + 25 mg/dL glukoz
APN (2.5 µg/mL) + 100 mg/dL glukoz
APN (2.5 µg/mL) + 200 mg/dL glukoz
APN (5 µg/mL) + 25 mg/dL glukoz
APN (5 µg/mL) + 100 mg/dL glukoz
APN (5 µg/mL) + 200 mg/dL glukoz

(Glukoz konsantrasyonları Quiroz vd., 2015'e, insülin konsantrasyonu Glatz vd., 2013'e göre düzenlenmiştir ve

Adiponektin konsantrasyonları Hao R. vd., 2019'a göre belirlenmiştir. Belirlenen konsantrasyon aralıklarında 30 dk., 60dk., 120 dk. ve 24 saat olacak şekilde zamana bağlı şekilde yapıldı Pineiro R. vd., 2005'ten kaynak alındı.)

H9c2 kardiyak sıçan hücre hattıdır. H9c2 hücre hattı protokolüne uygun olarak kültüre edildi.

1. Hücre kültürü için %10 (v/v) FBS, DMEM kültür ortamına eklenerek kullanıldı.
2. -80°C'de bulunan hücre vialı 37°C'deki su banyosunda eritildi.
3. Vialdeki hücreler T25 cm²'lik kültür flasklarına 5 mL kültür ortamına ekilerek %5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C'de kültüre edildi.
4. Hücreler flask içerisinde %80 yoğunluğa ulaşınca ppasajı yapıldı. Pasajlama işlemi için flask içerisindeki ortam uzaklaştırıldı.
5. 3 mL Tripsin/EDTA flaska eklendi ve flask 37°C %5 CO₂ olan inkübatörde 5 dakika inkübe edildi. 5 dakika bekledikten sonra hücreler kontrol edildi ve yüzeyden ayrılan hücrelere 9 mL kültür ortamı eklenerek tripsin inaktive edildi.
6. Ardından hücreler, 15 mL falkona alındı ve 1500 rpm 5 dk boyunca santrifüj edildi.
7. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet 1 mL kültür ortamı ile pipetaj yapılarak süspanse edildi.
8. Süspanse edilen hücreler Thoma-Neuber lamında sayıldı ve hücre sayısına göre tekrar T75 flasklara ekildi.

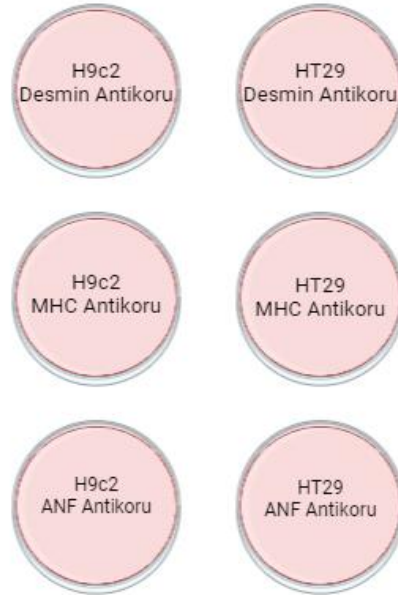
3.5.2.2. Hücre Sayımı

Hücre morfolojisi ve canlılığı, tripan mavisi kullanılarak değerlendirildi.

1. Hücreler, %0,25 Tripsin-EDTA çözeltisi ile tripsinize edildi.
2. Santrifüj edilerek pellet oluşturulan hücreler 1 mL kültür ortamı ile pipetaj yapılarak süspanse edildi ve 0,2 µL örnek alınarak 1:1 oranda tripan mavisi ile karıştırıldı.
3. Hücreler Thoma-Neuber lamına yüklenerek 1x1mm kare başına canlı ve canlı olmayan hücrelerin sayısına bakıldı. Ölü hücreler, zar yarı geçirgenliğini kaybettiği için mavi renkte boyandı. Canlı hücreler ise boyanmamış olanlardır.
4. Hücreler sayıldı ve hücre sayısı [canlı hücre sayısı x 2 x 10⁴] formülüyle hesaplandı.

3.5.2.2. İmmünofloresan Boyama

HT-29 insan kolon kanseri hücre hattıdır. Hücre hattı, DEÜ- Dr. Öğr. Üyesi Aslı SADE MEMİŞOĞLU'ndan temin edilerek negatif kontrol olarak kullanılmıştır.



Şekil 10. İmmünofloresan deneyi için 35 cm² kuyuluk peti deney düzeneğinin şematize edilmesi (BioRender kullanılarak oluşturulmuştur.)

1. Gün

1. Bu deney kapsamında kullanılacak lameller %70 EtOH ile steril hale getirildi ve hücrelerin ekileceği yüzey herhangi bir yere temas ettirilmeden kurumaya bırakıldı.
2. H9c2 hücreleri lamel yerleştirilmiş 35cm² 'lik petrilere 1 mL kültür ortamı ekildi ve %80 yoğunluğa (yaklaşık 2-3 gün) gelmeleri bekledi.
3. Hücreler yeterli yoğunluğa geldiklerinde petrilere ortam uzaklaştırılarak fiksasyon için üzerlerine her bir petrinin içerisine %5 oranında olacak şekilde asetik asit karıştırılan 800 µL MetOH (-20 C'de bekletilmiş) eklendi ve -20°C'de 10 dakika inkübe edildi.
4. İnkübasyon ardından MetOH uzaklaştırıldı. Ardından 1X (Phosphate Buffer Saline) PBS ile 3 kere 5'er dakika hafifçe sallanarak yıkama yapıldı.
5. Yıkamalar ardından %5'lik Triton X-100 eklendi ve oda ısısında 15 dakika inkübe edildi.
6. Triton X-100 uzaklaştırıldı ve bloklama yapmak için petrilere % 0,1 oranında BSA eklenerek ve 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
7. BSA uzaklaştırıldı ve Tablo 7'de belirtilen primer antikorlar petrilere eklenerek (Antikorlar firmanın önerdiği şekilde seyreltili.) +4°C'de 1 gece (en az 16 saat) boyunca inkübasyona bırakıldı.

2. Gün

1. Primer antikor solüsyonu ortamdan uzaklaştırıldı ve PBS-T ile 3 kere 2 'şer dakika yıkandı.
2. Az ışıklı ortamda ikincil antikorlar eklendi ve folyo ile sarılarak karanlıkta 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
3. İnkübasyon sonrası sekonder antikor uzaklaştırıldı ve 3 kere 5 'er dakika PBS-T ile yıkandı.
4. 10 µL Dapi-Antifade lama damlatıldı ve hücrelerin olduğu lamel yüzeyi Dapi solüsyonu üzerine gelecek şekilde kapatıldı.
5. 15-20 dakika oda sıcaklığında karanlıkta tekrar inkübe edildi. Ardından floresan mikroskopta görüntülenmesi yapıldı.

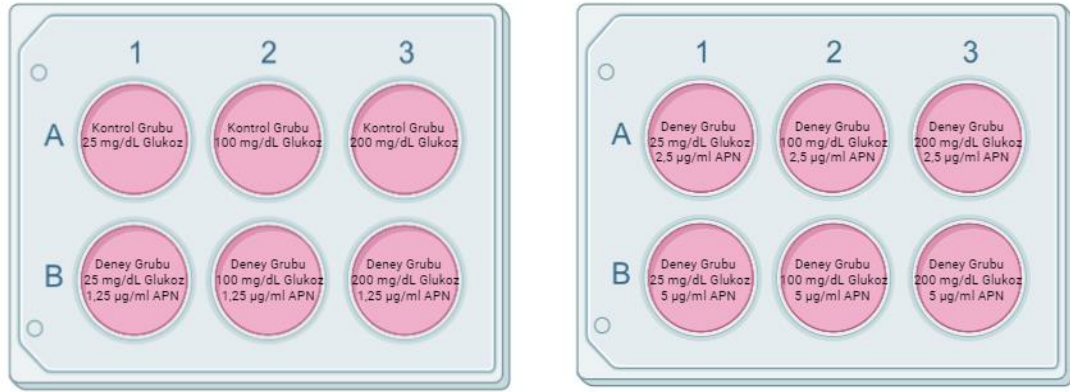
Tablo 7. İmmünohistokimyasal boyamada kullanılan antikorlar (Claycomb vd., 1998).

Birincil Antikorlar	İkincil Antikor
Monoklonal Anti-Desmin Antikoru	Keçi Anti-Fare IgG (H+L) Antikoru, Rodamin Konjugatı
Sarkomerik Miyozin Ağır Zinciri Antikoru (MHC)	Keçi Anti-Fare IgG (H+L) Antikoru, Rodamin Konjugatı
Atriyal Natriüretik Faktör Antikoru (ANF)	Keçi Anti-Tavşan IgG Antikoru, FITC konjugatı

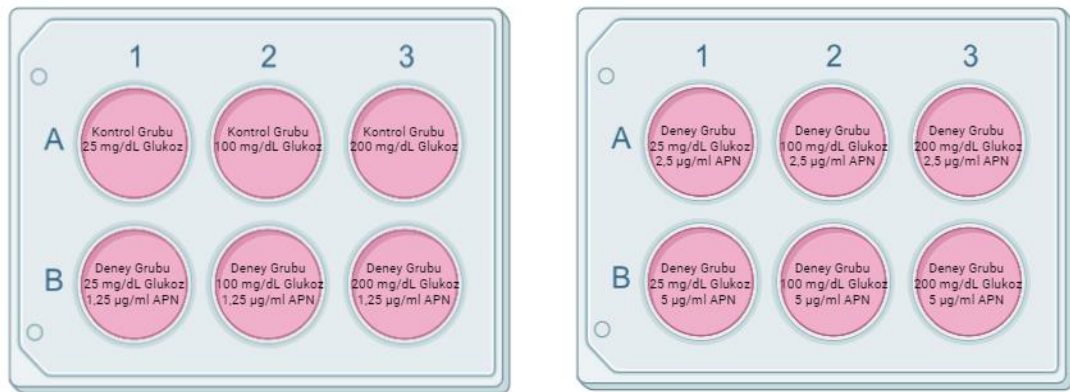
3.5.2.3. Protein Eldesi

Şekil 11. Protein eldesi için 6 kuyulu tabakaların gösterilmesi (BioRender kullanılarak oluşturulmuştur.)

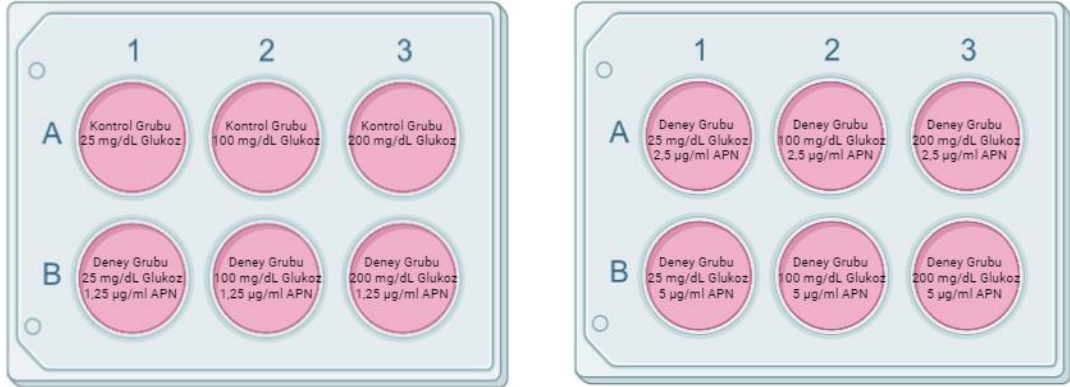
30 Dk. İnkübasyon Süresi



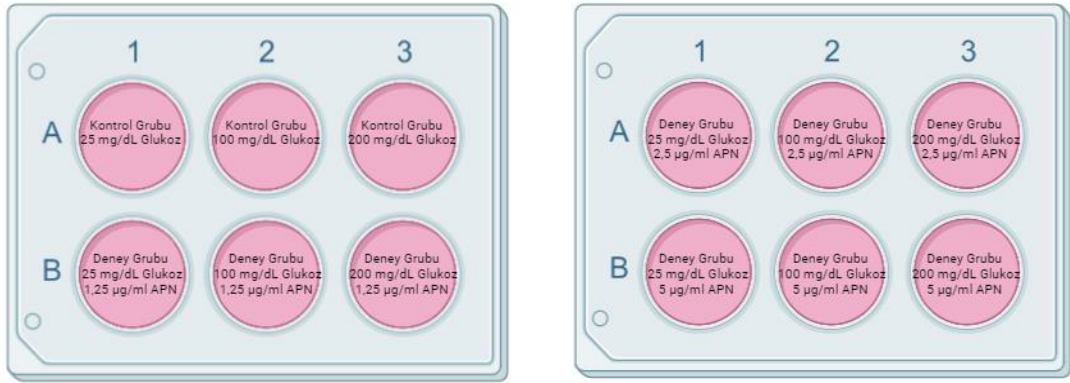
60 Dk. İnkübasyon Süresi



120 Dk. İnkübasyon Süresi



24 Saat İnkübasyon Süresi



1. Hücreler deneyin koşulları göz önüne alınarak 6 kuyulu tabakaların her kuyusuna 100.000 hücre olacak şekilde ekildi ve glukozun farklı konsantrasyonları ayarlanarak 1'er mL ortam eklendi.
2. Tablo 6'da belirtilen APN konsantrasyonları ve inkübasyon süreleri sonunda her gruba ait hücrelerden protein izolasyonu RIPA lizis buffer karışımı kullanılarak elde edildi (RIPA lizis karışımında; 10X RIPA lizis tamponu, proteaz inhibitör kokteyli, dH₂O ve PMSF kullanıldı).
3. Hücreler, %80 yoğunluğa ulaştığında hücre kazıyıcısı ile kazınarak 1.5 mL'lik ependorflara aktarıldı ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
4. Hücre pelletine dokunmamaya özen gösterilerek üstte kalan hücre ortamı uzaklaştırıldı üzerine 1 mL soğuk PBS eklendi ve pipetaj yapılarak tekrar santrifüj yapıldı.

5. Santifüj sonunda pellete zarar verilmeden PBS uzaklaştırıldı ve pelletin boyutu göz önüne alınarak (~200 µL) hazırlanan RIPA lizis buffer eklendi.
6. Hızlıca pipetaj yapılarak pellet süspansiyon edildi ve buz üzerine alındı. 30 dakika boyunca 5 dakikada bir 30 saniye süreyle vortekslenerek buz üzerinde bekletildi.
7. Ardından 4°C’de ayarlanmış soğutmalı santrifüjde 1.400 g’de 7 dakika boyunca santrifüj edildi ve üst faz alınarak yeni bir ependorfa aktarıldı. Protein örnekleri -80°C’de saklandı.

3.5.2.3.1. Protein Konsantrasyon Ölçümü

1. Elde edilen proteinlerin konsantrasyonları BCA assay kiti kullanılarak ölçüldü.
2. BSA standartları kit protokolünde (Takara BCA Protein Assay Kit (Kat. No: T9300A)) verilen konsantrasyonlarda ana stok 2,000 µg/mL şeklinde kullanılırken diğer konsantrasyonlarda dH₂O ile seyreltilerek 1500, 1000, 750, 500, 250, 125 ve 0 (Blank) µg/mL şeklinde hazırlandı.
3. 96 kuyulu tabakalara 25 µl standartlardan ve protein örneklerinden eklendi.
4. Üzerlerine örnek sayısına oranla hazırlanan 200 µl çalışma solüsyonu (BCA reaktifi) eklenip hemen karıştırıldı ve 37°C etüvde 30 dakika inkübe edildi ve inkübasyon sonrası 562nm dalga boyunda absorbans değerleri mikroparka okuyucuda okutuldu ve örneklerdeki protein konsantrasyonları µg/mL cinsinden hesaplandı.

3.5.2.4. Western Blot / SDS-PAGE

Protein örnekleri, hazırlanan %12’lik ayırıcı jel ve %4’lük paketleyici jelde yürütüldü. Hazırlanan jel bileşenleri ve diğer solüsyon oranları aşağıda yer almaktadır.

Tablo 8. SDS PAGE için %12’lik ayırıcı jel solüsyonu oranları

Jel Bileşenleri	Hacim
Saf su	3.350 µl
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	2.500 µl
%10 SDS	50 µl
Akrilamid/Bis-akrilamid (%29.2/%0.8 w/v)	4.000 µl
%10 (w/v) APS	100 µl
TEMED	10 µl

Tablo 9. SDS PAGE için %4'lük paketleyici jel solüsyonu oranları

Jel Bileşenleri	Hacim
Saf su	1.826 µl
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	750 µl
%10 SDS	15 µl
Akrilamid/Bis-akrilamid	376 µl
%10 (w/v) APS	30 µl
TEMED	3 µl

Tablo 10. 10X Yürütme tamponunun solüsyon oranları

10X – Yürütme Tamponu	Hacim
Tris-Base	30,3 gram
Glisin	144 gram
SDS	10 gram
1L'ye tamamlayacak kadar dH ₂ O	

Tablo 11. 10X Tranfer tamponunun solüsyon oranları

10X – Transfer Tamponu	Hacim
Tris-Base	30 gram
Glisin	144 gram
SDS	3 gram
1L'ye tamamlayacak kadar dH ₂ O	
1X için; 700 ml dH ₂ O + 200 ml MetOH + 100 ml 10X buffer	

Tablo 12. 10X TBS solüsyon oranları

10X – TBS	Hacim
Tris-Hcl	2,23 gram
NaCl	80,06 gram
1L'ye tamamlayacak kadar dH ₂ O	
TBST için; 100ml 10XTBS + 1 ml Tween 20 + 1L'ye tamamlayacak kadar dH ₂ O	

Jel yürütme işlemi için dikey elektroforez sistemi (BioRad) kullanıldı. Bu sistem, yürütme tankı, jel taşıyan camlar (1 mm cam, ince cam, 10 kuyulu tarak), camları tutan kışkaçlar ve güç kaynağından oluşmaktadır.

1. Sistem içerisinde yer alan camlar üst üste konularak dökme standına yerleştirilerek sabitlendi.

2. Camlar arasına Tablo 8’de içeriği verilen ayırıcı jel karışımı hazırlanarak belli bir seviyeye kadar döküldü. Oluşan balon kabarcıklarını yok etmek için ve jelin oksijenle temasını engellemek için, üzerine 1 mL izopropanol eklendi.
3. İzopropanol uzaklaştırıldı ve Tablo 9’da içeriği verilen paketleyici jel karışımı hazırlanarak ayırıcı jel üzerine döküldü ve örneklerin yükleneceği kuyucukların oluşması için taraklar takıldı. Hazırlanan jelin donmasının ardından taraklar çıkarıldı ve kuyucuklar elde edildi.

Örnek Hazırlanması

1. Ölçüm sonrası 30 µg protein olacak şekilde hesaplama yapıldı ve ilgili protein DTT ile hazırlanan 4X Laemmli buffer ile karıştırıldı ve 95°C’ de 5 dakika ısı bloğunda ısıtıldı.

Jelin Yüklmesi

1. Donmuş jelin bulunduğu camlar kısa cam iç yüzeyde kalacak şekilde yürütme aparatına tutturuldu ve tanka yerleştirildi.
2. Tank ve yerleştirilen camların arası Tablo 10’da verilen oranlarda hazırlanıp seyreltilen 1X yürütme tamponu önce camlar arası boşluğa dökülerek sızdırmazlık testi yapıldı ardından tank jel miktarına göre yürütme tamponu ile dolduruldu.
3. Hazırlanan örnekler ve 4 µL protein marker, kuyulara yüklendi.

Örneklerin Yürütülmesi

1. Örnekler kuyucuklara yüklendikten sonra sistemin kapağı kırmızı-siyah elektrotlara dikkat edilerek bağlandı ve 100 Volt olacak şekilde sabit voltajda 60-70 dakika elektroforetik yürütme gerçekleştirildi.
2. Yürütme işlemi takip edildi gerekirse yürütme işleminin süresi uzatıldı ve proteinler arası yeterli ayrılma sağlandıktan sonra sistem kapatılarak jeller çıkarıldı.

Proteinlerin Membrana Transferi

1. Proteinlerin membrana transfer işleminde Turbo-transfer sistemi (BioRad) kullanıldı.
2. Transfer de kullanılacak olan PVDF membran ve filtre kağıtları jele uygun şekilde kesildi.
3. PVDF membran MetOH içerisinde 5 dk. boyunca inkübe edildi ve ardından membran tekrar Tablo 11'de verilen oranlarda hazırlanıp 1X'e seyreltilen transfer tamponu içerisinde filtre kağıtlarıyla beraber 5 dk. boyunca inkübasyona bırakıldı.
4. Transferin yapılacağı kaset içerisine filtre kâğıdı-membran-jel-filtre kâğıdı olacak şekilde dizildi, her katmanda aparat yardımı hava kabarcıkları çıkarıldı ve kaset kapatılarak cihaza yerleştirildi.
5. Transfer 25 volt 1.3 Amper'de 14 dk.'da gerçekleştirildi.

Bloklama

1. Membrandaki spesifik olmayan bağlanmaları engellenmek için bloklama yapıldı.
2. Transfer sonrası proteinlerin bağlandığı membran, antikorların önerilen TBS-T tamponunda seyreltilen bloklama solüsyonları (%5 süt tozu veya %5BSA) ile çalkalayıcıda 60 dakika oda ısısında inkübe edildi.
3. Bloklama işleminin ardından bloklama solüsyonu dökülüp membran çalkalayıcı üzerinde 3 defa 5'er dk. Tablo 12'de verilen oranlarda hazırlanan TBS-T (yıkama solüsyonu) ile yıkandı.

Birincil Antikor ile İnkübasyon

1. Bloklama işlemi bittikten sonra membranlardan bloklama çözeltisi döküldü ve 3 defa 5'er dk. TBS-T ile yıkaması yapıldı.
2. Ardından membran üzerini geçecek şekilde hazırlanan birincil antikor solüsyonu ile çalkalayıcı üzerinde +4°C'de gece boyunca inkübasyona bırakıldı.

3. Birincil antikorlar, Kullanım protokolüne uygun olarak TBS-T içerisinde; %5 süt tozu ya da %5 BSA seyreltildi.
4. Ertesi gün birincil antikorlar uzaklaştırıldı ve membranlar yıkama çözeltisi olan TBS-T ile 3 defa 5'er dk. yıkandı.

İkincil Antikor ile İnkübasyon

1. Yıkama sonrasında membran birincil antikora spesifik ikincil antikorlarla 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde bekletildi.
2. İkincil antikorlar, önerilen şekilde TBS-T çözeltisinde seyreltildi.
3. Sürenin sonunda membran TBS-T çözeltisi ile 3 defa 5'er dk. yıkandı.

Tablo 13. Kullanılan birincil-ikincil antikorların marka ve dilüsyon oranları

Antikor	Marka	Seyreltme Oranı
CD36 (E8B7S) Rabbit mAb	CST / 28109	1:1000
GLUT4 (1F8) Mouse mAb	CST / 2213	1:500
GAPDH (14C10) Rabbit mAb	CST / 2118	1:1000
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	CST / 7074	1:1000
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	CST / 7076	1:500

Görüntüleme

1. İnkübasyondan sonraki yıkamalar tamamlanarak membran görüntüleme için hazır hale getirildi.
2. Görüntüleme için, VİLBERT görüntüleme cihazı ve membrandaki protein sinyallerinin görünür olması için ECL kit (BioRad) kullanıldı.
3. Görüntü cihazındaki kaset üzerine uygun olacak şekilde şeffaf dosya yerleştirildi ve dosya üzerine membran yerleştirilerek başlangıç yer görüntüsü alındı.

4. Ardından kit içerisindeki solüsyonlar membran boyutuna göre 1:1 oranında karıştırılarak hazırlandı ve membran üzerine her yere eşit gelecek şekilde yayıldı ve 5 dk. inkübasyona bırakıldı.
5. İnkübasyon sonunda protein bant görüntüleri kaydedildi.

3.6. Verilerin Değerlendirilmesi:

Çalışma sonuçlarının tüm verileri ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunuldu. Verilerin değerlendirilmesinde İmageJ ve GraphPad programları ile istatistik yazılımları ile yapıldı. İstatistiksel analiz için iki taraflı Student t testi yapıldı veya mümkün olduğunda eşleştirilmiş test uygulandı. $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.7. Araştırma Planı

Tablo 14. Araştırmanın yapılması tahmin edilen zaman planı

İş Paketlerinin Adı ve Hedefleri	Zaman Aralığı
Teze ilişkin projenin hazırlanması	Nisan- Eylül 2022
Tez önerisinin hazırlanması Etik kurul onayı	Temmuz – Eylül 2022
Projenin kabul edilmesi Malzeme alımı	Mayıs- Kasım 2023
Hücrelerin kültüre edilmesi ön çalışma, Antikor optimizasyonları	Kasım 2023 – Mart 2024
İmmunofloresan analizlerin yapılması	Şubat 2024 – Nisan 2024
Hedef proteinlerin ifade analizlerinin Western blot yöntemi ile yapılması	Mart 2024 – Temmuz 2024
Deneylerin istatistiksel analizlerinin yapılması ve yorumlanması	Temmuz 2024 – Ağustos 2024
Tez yazımı	Ocak-Ağustos 2024

3.8. Araştırmanın Sınırlılıkları:

Araştırmamız kapsamında tek bir kardiyak hücre hattı kullanılmıştır. Çalışma kapsamında yer alan bir diğer kardiyak hücre hattı olan HL-1 soğuk zincir taşımasında yaşanan problemlerden dolayı kültüre edilememiş ve bu sebeple çalışılamamıştır. Çalışmaların farklı hücre hatları kullanılarak da yapılması uygun olacaktır. Çalışma kapsamında tekrar deneyleri yapılmalıdır. İnsülinin pozitif kontrol olduğu deney setleri eklenmelidir, grupların insülinin etkisine göre normalize edilerek istatistiksel analizleri yapılmalıdır. Gerekli durumda Grafpad dışında farklı bir programla veriler tekrar değerlendirilmelidir.

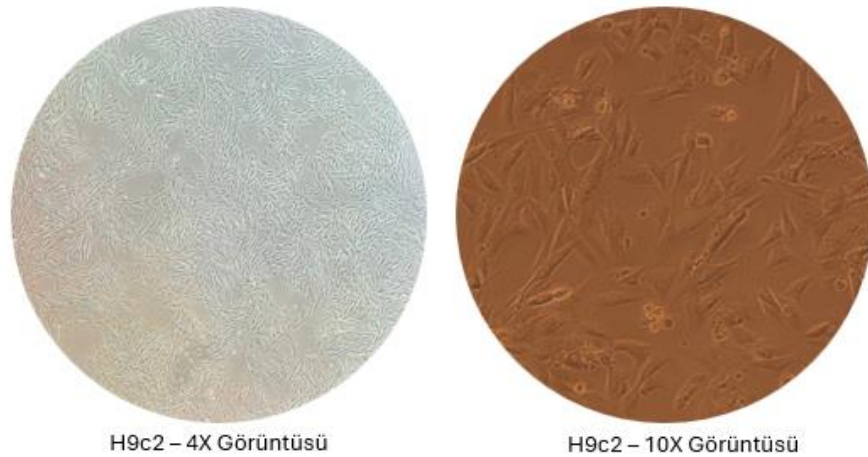
3.9. Etik Kurul Onayı:

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu 26.10.2022 tarih, 7572-GOA protokol numarası ve 2022/34-36 no'lu kararında etik açıdan onaylanmıştır (Ek-1).

4. BULGULAR

4.1. H9c2 Hücrelerinin Kültüre Edilmesinin Mikroskopik Görüntüleri

Çalışmamızda kullanılan H9c2 kardiyak hücre hattı deney düzeneği göz önüne alınarak kültüre edildi. 4x ve 10x büyütmedeki görüntüleri inverted mikroskop yardımı ile çekildi (Şekil 12).



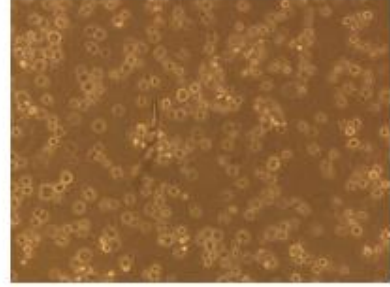
Şekil 12. Mikroskopik görüntüler

HL-1 Hücre Hattının Kültüre Edilmesi

HL-1 kardiyak hücre hattı T25 flasklara ekilekildi. 24 saat ve 48 saat sonraki 4x ve 20x görüntüleri inverted mikroskop yardımı ile çekildi (Şekil 13,14).



HL-1 – 24 Saat 4X Görüntüsü

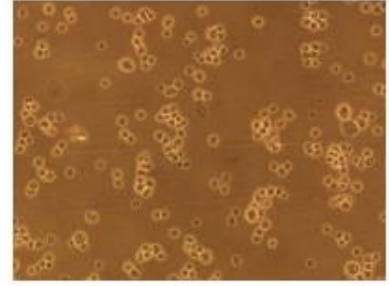


HL-1 – 24 Saat 20X Görüntüsü

Şekil 13. HL-1 hücre hattı ilk ekildiği an ki mikroskopik görüntüleri



HL-1 – 48 Saat 4X Görüntüsü



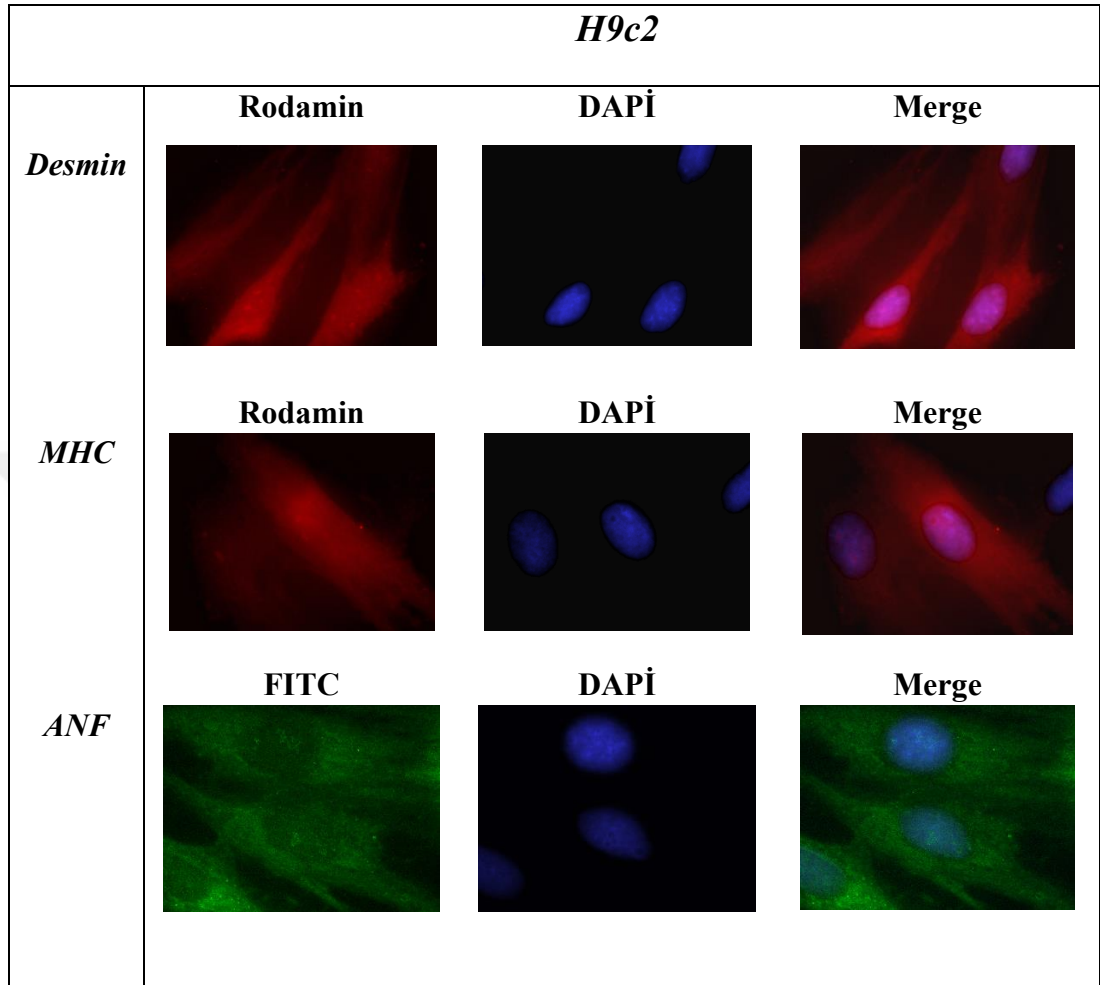
HL-1 – 48 Saat 20X Görüntüsü

Şekil 14. HL-1 hücre hattının 48 saat sonraki mikroskopik görüntüleri

4.2. İmmunofloresan Boyama Sonuçları

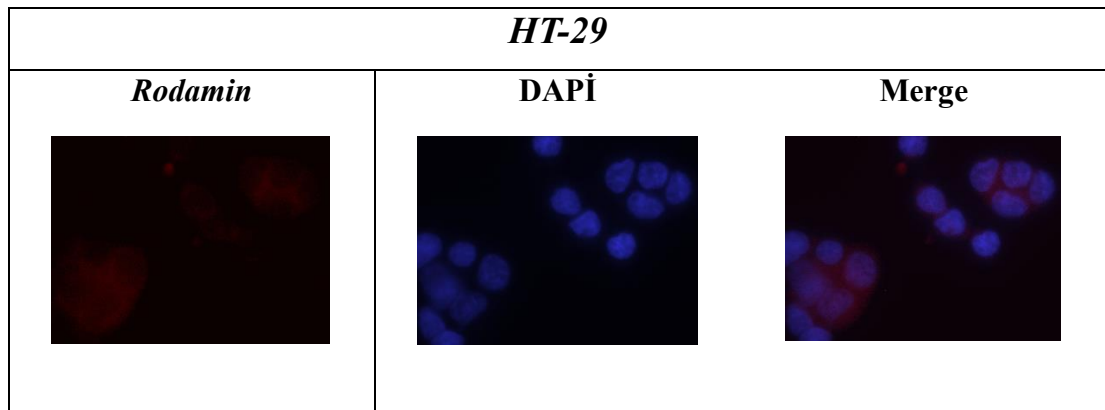
İmmunofloresan boyama ile Tablo7’de belirtilen birincil ve ikincil antikorlar kullanılarak hücrelerin kardiyak özellikte olduğu gösterildi.

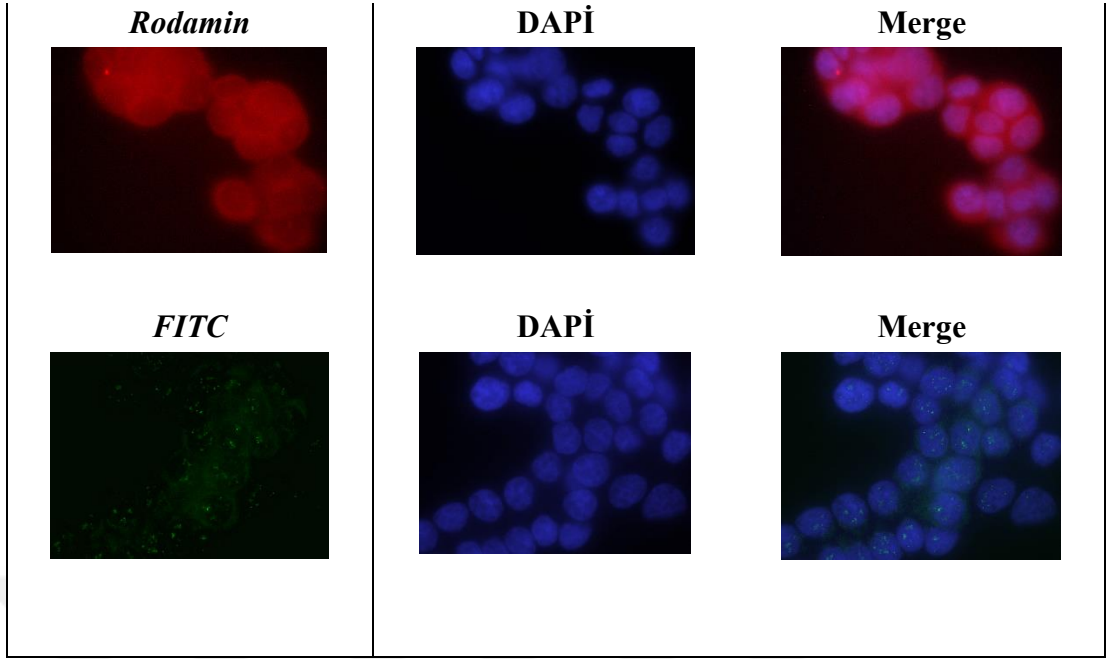
Tablo 15. H9c2 Hücre hattı immunofloresan görüntüleri



Negatif kontrol olarak HT-29 insan kolon kanseri hücre hattı kullanıldı. Bu hücre hattında Dapi çekirdeği boyayarak mavi renk verdi; Desmin ve ANF’de sinyal görülmedi, MHC’de görülen ışıma yalancı sinyal olarak değerlendirildi.

Tablo 16. HT-29 Hücre hattı immunofloresan görüntüleri

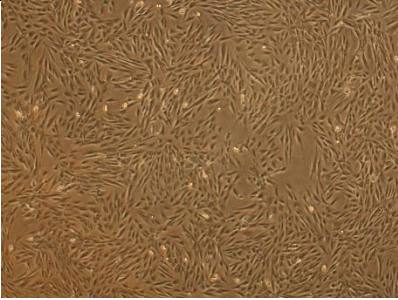
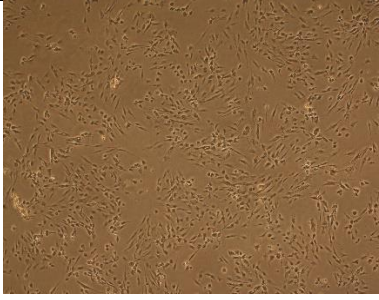


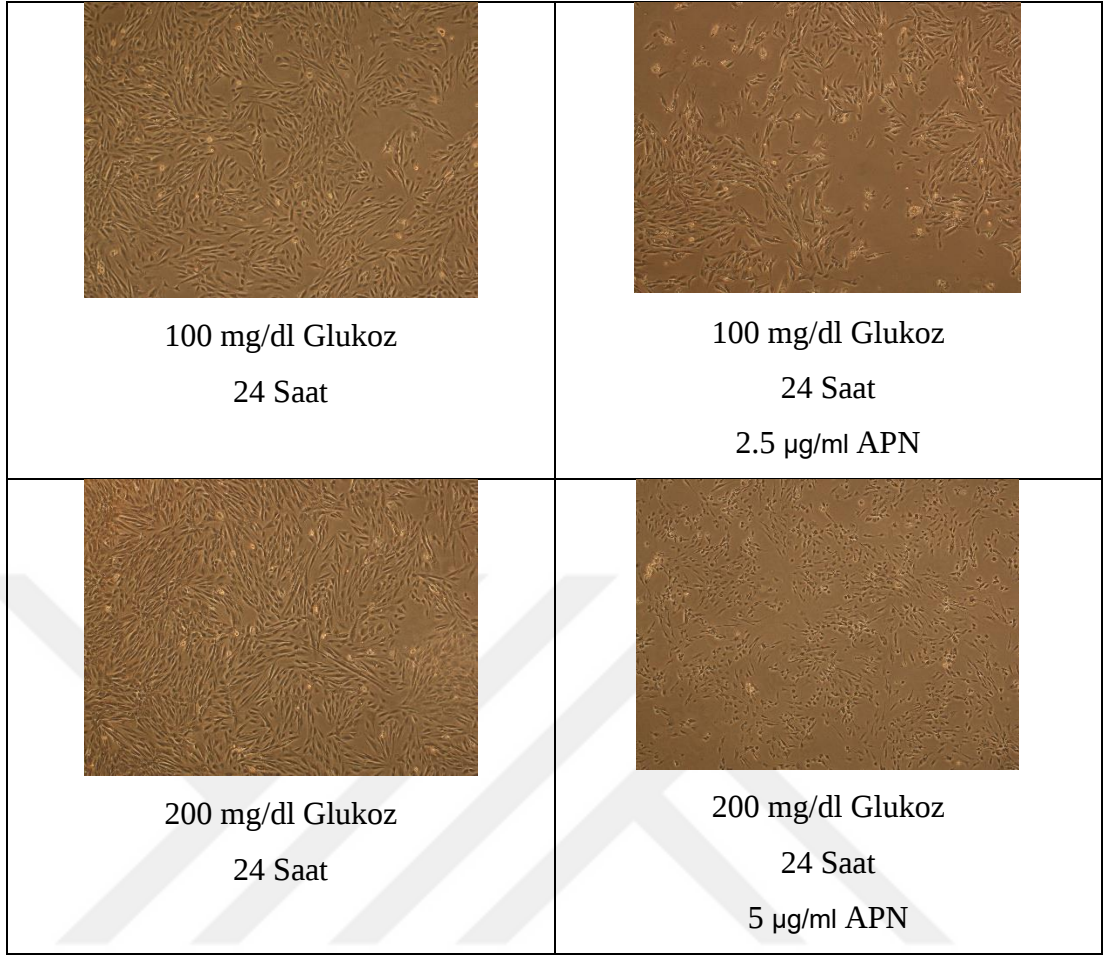


4.3. Adiponektin Uygulanan H9c2 Hücresinin Mikroskopik Görüntüleri

APN uygulamasının ardından hücrelerin inverted mikroskop altında görüntüleri alındı.

Tablo 17. APN uygulamasının mikroskopik görüntüleri

Kontrol Grubu	Deney Grubu
 25 mg/dl Glukoz 24 Saat	 25 mg/dl Glukoz 24 Saat 1.25 µg/ml APN



Mikroskopik görüntüleme ile hücrelerin morfolojilerindeki değişimler saptandı. 30 dk., 1 saat ve 2 saat APN ile inkübasyondan sonra hücrelerin morfolojisinde herhangi bir değişim gözlemlenmedi, 24 saat APN ile inkübasyondan sonra hücrelerin morfolojisinde küçülmeler olduğu saptandı.

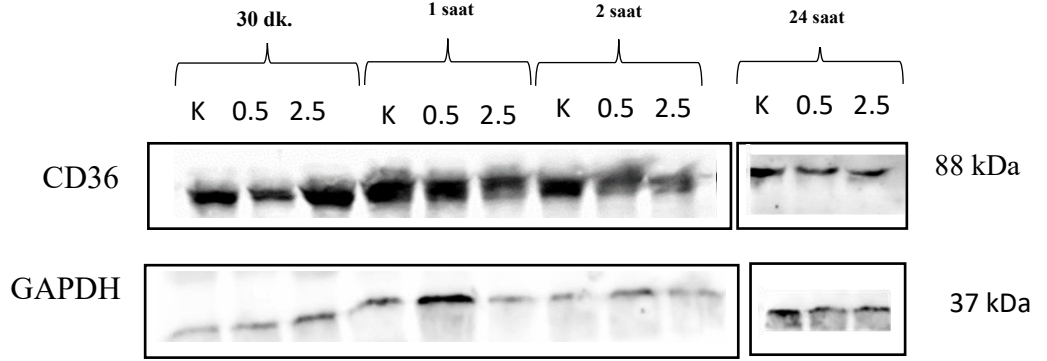
4.4. Adiponektin'in Glukoz ve Yağ Asidi Alınmasından ve Taşınmasından Sorumlu Genlerin İfadeleri Üzerine Etkisinin Protein Düzeyinde Gösterilmesi Western Blot Sonuçları

Ön Veriler

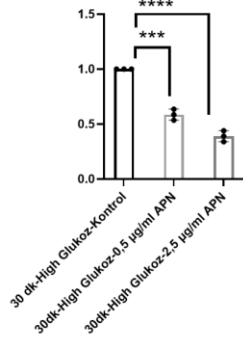
Çalışmamızın ön verilerinde, farklı glukoz konsantrasyonlarında (Yüksek glukoz - Düşük glukoz) kontrol, 0.5 µg/mL ve 2.5 µg/mL APN verilen grupların Western blot analizi ile CD36 proteininin ekspresyon değişimleri gösterildi (Şekil 15, 16).

Yüksek glukoz (450 mg/dL) ortamda 30 dk., 1, 2, 24 saat boyunca 0.5 µg/mL ve 2.5 µg/mL APN uygulama

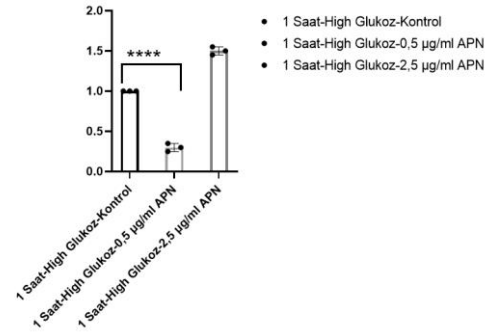
(a)



CD36 - 30dk High Glukoz - Ön Veri

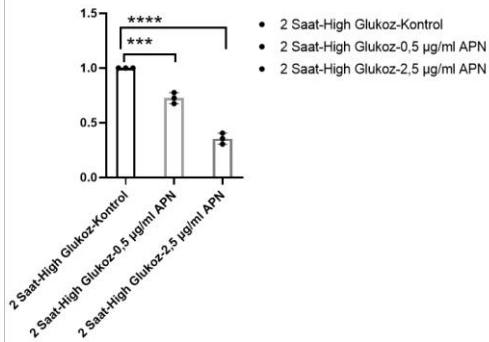


CD36 - 1 Saat High Glukoz - Ön Veri



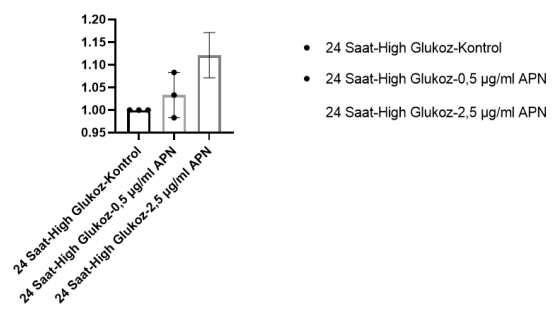
(d)

CD36 - 2 Saat High Glukoz - Ön Veri



(e)

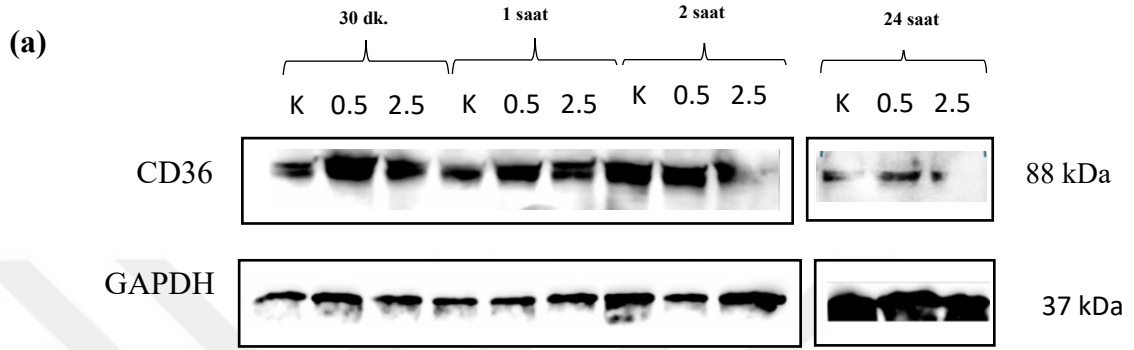
CD36 - 24 Saat High Glukoz - Ön Veri



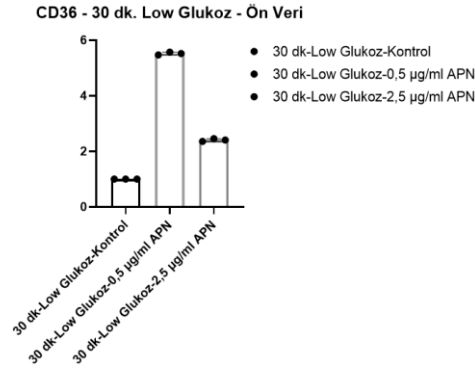
Şekil 15. H9c2 hücrelerinde (a) 30 dk., 1, 2 ve 24 saat boyunca 0.5 ve 2.5 µg/mL APN uygulaması Western blot bant görüntüleri. K: Kontrol. 30 dk., 1, 2 saat grubu ve 24 saat grubu iki farklı jelde yürütüldü. (b) CD36 proteininin 30 dk.'lık istatistiksel analizi (c) CD36 proteininin 1 saatlik istatistiksel analizi (d) CD36 proteininin 2 saatlik istatistiksel

analizi (e) CD36 proteininin 24 saatlik istatistiksel analizi. **** p <0,0001. Tüm istatistiksel analizler Student-t testi kullanılarak yapıldı.

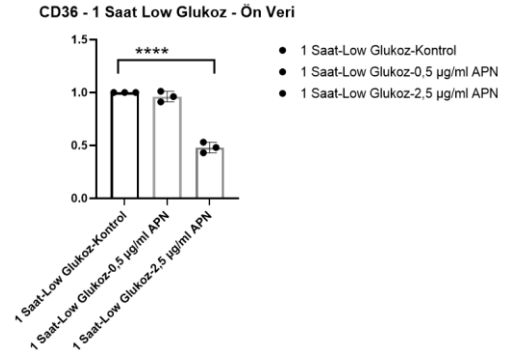
Düşük glukoz (100 mg/dL) ortamda 30 dk., 1, 2, 24 saat boyunca 0.5 µg/mL ve 2.5 µg/mL APN uygulama



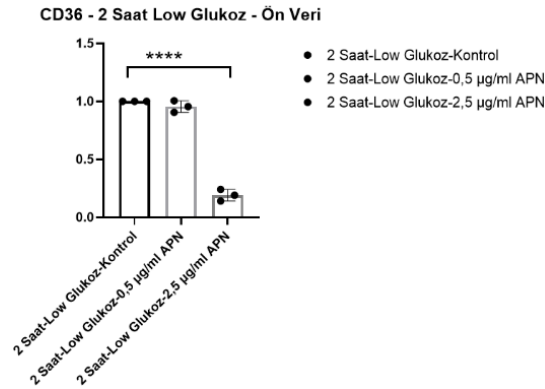
(b)



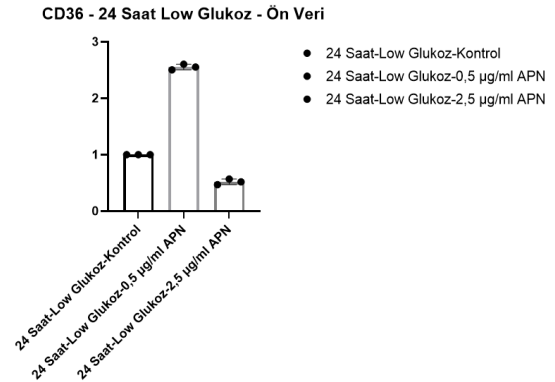
(c)



(d)



(e)



Şekil 16. H9c2 hücrelerinde (a) 30 dk., 1, 2 ve 24 saat boyunca 0.5 µg/mL ve 2.5 µg/mL APN uygulaması Western blot bant görüntüleri. K: Kontrol 30 dk., 1, 2 saat grubu ve 24 saat grubu iki farklı jelde yürütüldü. (b) CD36 proteininin 30 dk.'lık istatistiksel analizi (c) CD36 proteininin 1 saatlik istatistiksel analizi (d) CD36 proteininin 2 saatlik istatistiksel analizi (e) CD36 proteininin 24 saatlik istatistiksel analizi. **** p <0,0001. Tüm istatistiksel analizler Student-t testi kullanılarak yapıldı.

Çalışmamızda Western blot analizi ile CD36 ve GLUT4 gen ekspresyonlarının; Kontrol, 1.25 µg/mL APN, 2.5 µg/mL APN ve 5 µg/mL APN koşullarında protein düzeyinde ekspresyon değişimleri gösterildi.

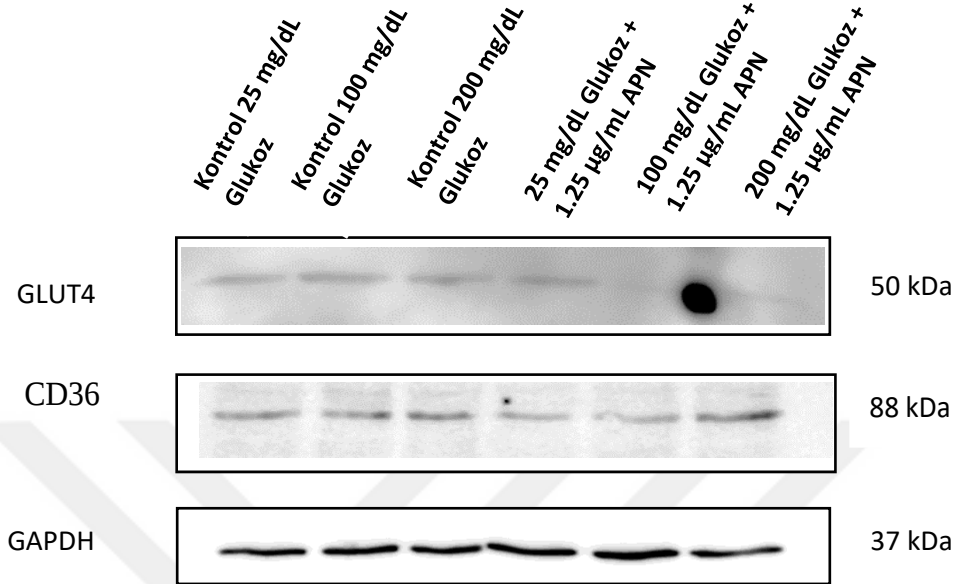
4.4.1. APN Uygulanan H9c2 Hücrelerinde GLUT4 ve CD36 Ekspresyonlarının Gösterilmesi

30 dk. boyunca 1.25 µg/mL APN uygulanan H9c2 hücrelerinde GLUT4 proteininin ekspresyon düzeyinin kontrole göre, 25 mg/dL glukoz konsantrasyonunda 1.25 µg/mL APN uygulanmasında herhangi bir değişim gözlemlenmedi. 100 mg/dL ve 200 mg/dL glukoz konsantrasyonlarında 1.25 µg/mL APN verilen deney gruplarında kontrol grubuna göre azaldığı gözlemlendi (Şekil 17).

30 dk. boyunca 2.5 µg/mL ve 5 µg/mL APN uygulanan H9c2 hücrelerinde GLUT4 proteininin ekspresyon düzeyinin 25 mg/dL glukoz, 100 mg/dL glukoz ve 200 mg/dL glukoz kontrol gruplarına göre anlamlı bir şekilde (**** p<0,0001) arttığı gözlemlendi (Şekil 18,19).

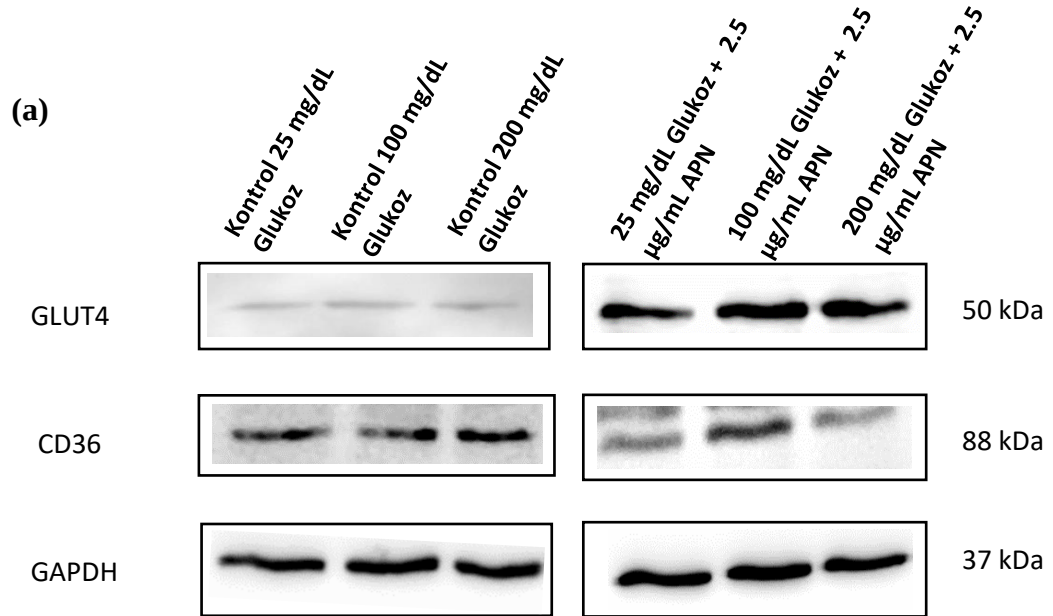
30 dk. boyunca 1.25 µg/mL, 2.5 µg/mL ve 5 µg/mL APN uygulanan H9c2 hücrelerinde CD36 proteininin ekspresyon düzeyinin 25 mg/dL glukoz, 100 mg/dL glukoz ve 200 mg/dL glukoz kontrol gruplarına göre azalma gözlemlendi (Şekil 17-19).

30 dk. boyunca 1.25 µg/mL APN uygulama

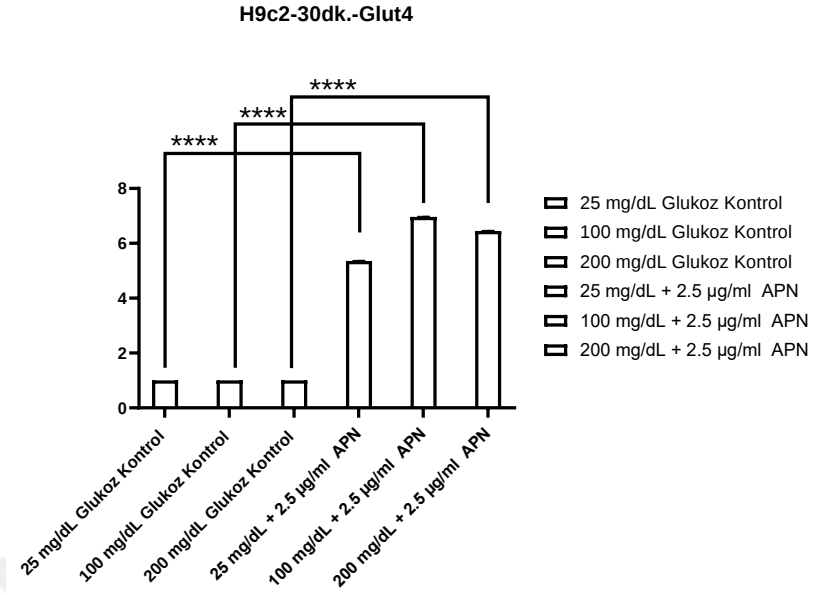


Şekil 17. H9c2 hücrelerinde 30 dk. boyunca 1.25 µg/mL APN uygulaması Western blot bant görüntüleri.

30 dk. boyunca 2.5 µg/mL APN uygulama

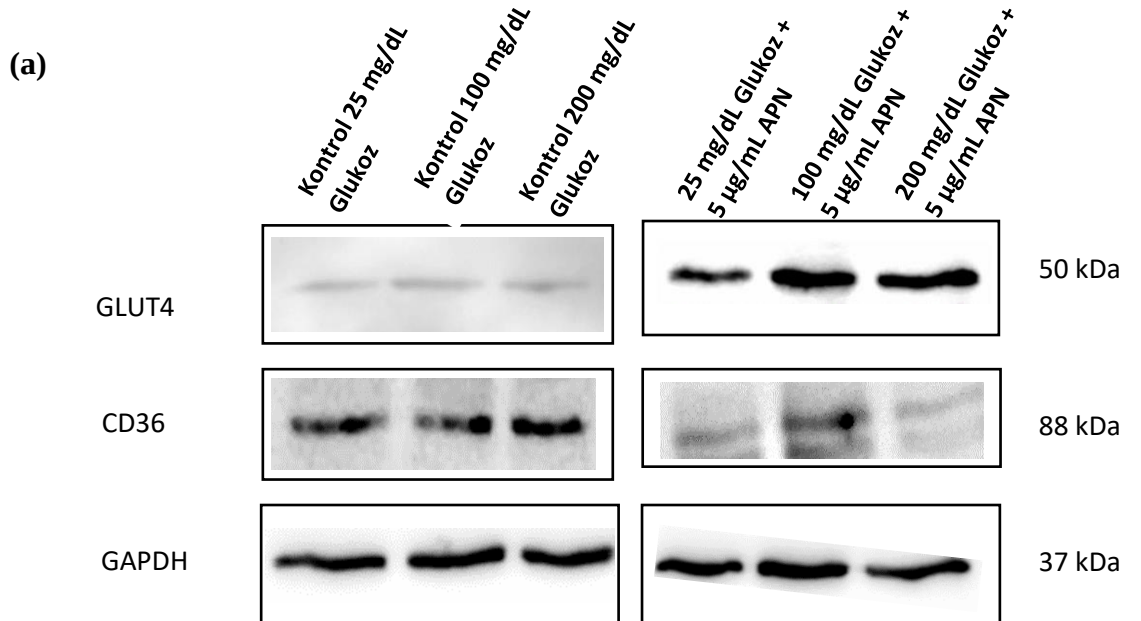


(b)

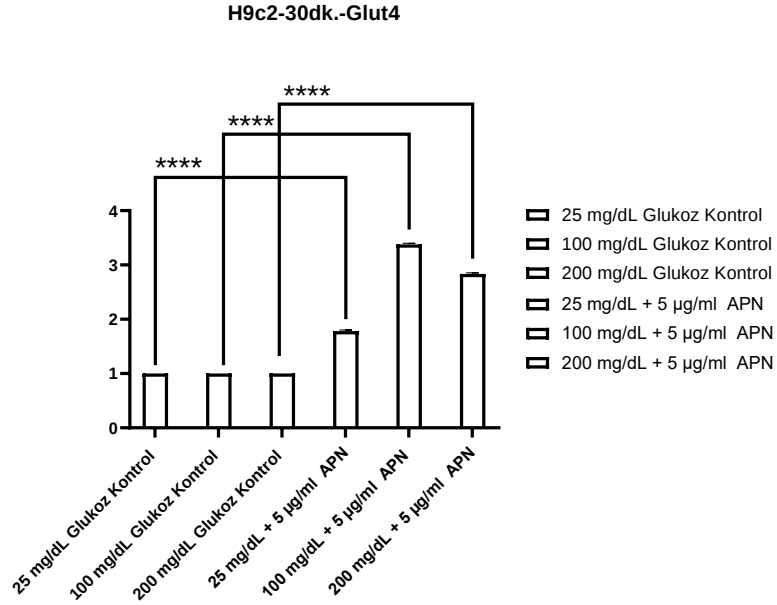


Şekil 18. H9c2 hücrelerinde 30 dk. boyunca 2.5 µg/mL APN uygulaması (a) Western blot görüntüleri. Kontrol grubu ve deney grubu iki farklı jelde yürütüldü. (b) GLUT4 proteininin istatistiksel analizi. **** p < 0,0001. Tüm istatistiksel analizler Student-t testi kullanılarak yapıldı. Ortalama ± standart sapma gösterildi.

30 dk. boyunca 5 µg/mL APN uygulama



(b)



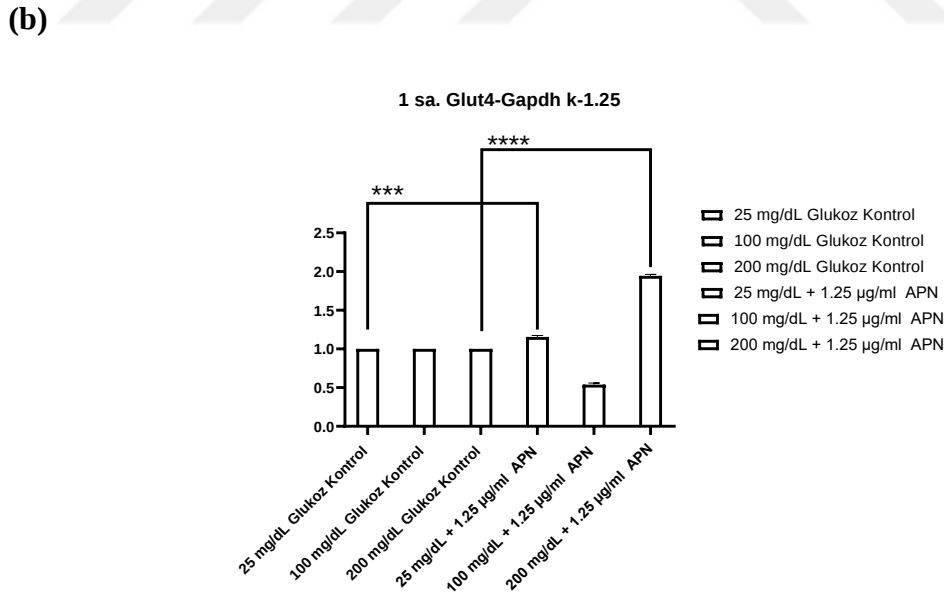
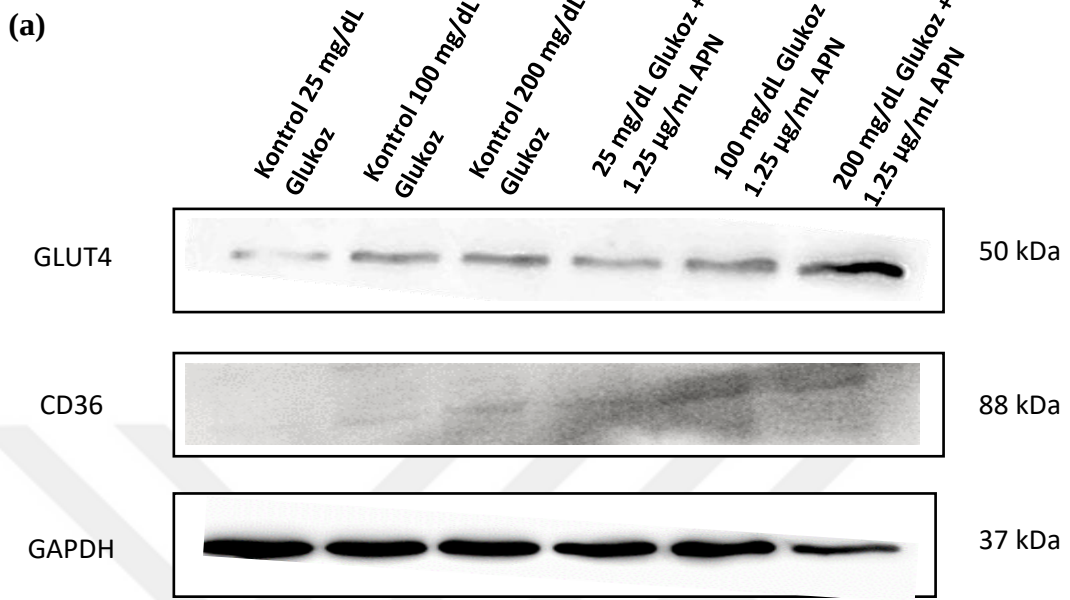
Şekil 19. H9c2 hücrelerinde 30 dk. boyunca 5 µg/mL APN uygulaması (a) Western blot bant görüntüleri. Kontrol grubu ve deney grubu iki farklı jelde yürütüldü. (b) GLUT4 proteininin istatistiksel analizi. **** p <0,0001. Tüm istatistiksel analizler Student-t testi kullanılarak yapıldı. Ortalama ± standart sapma gösterildi.

1 saat boyunca 1.25 µg/mL APN uygulanan H9c2 hücrelerinde GLUT4 proteininin ekspresyon düzeyinin, hipoglisemi (25 mg/dL) ve hiperglisemi (200 mg/dL) şartlarının mimik edildiği kontrol gruplarına göre anlamlı şekilde (****p<0,0001, ***p value 0,0002) artış gösterdiği, 100 mg/dL glukoz koşulunda kontrol grubuna göre azalma gözlemlendi (Şekil 20).

1 saat boyunca 2.5 µg/mL ve 5 µg/mL APN uygulanan H9c2 hücrelerinde GLUT4 proteininin ekspresyon düzeyinin 25 mg/dL glukoz, 100 mg/dL glukoz ve 200 mg/dL glukoz şartlarındaki kontrol gruplarına göre anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi (Şekil 21, 22).

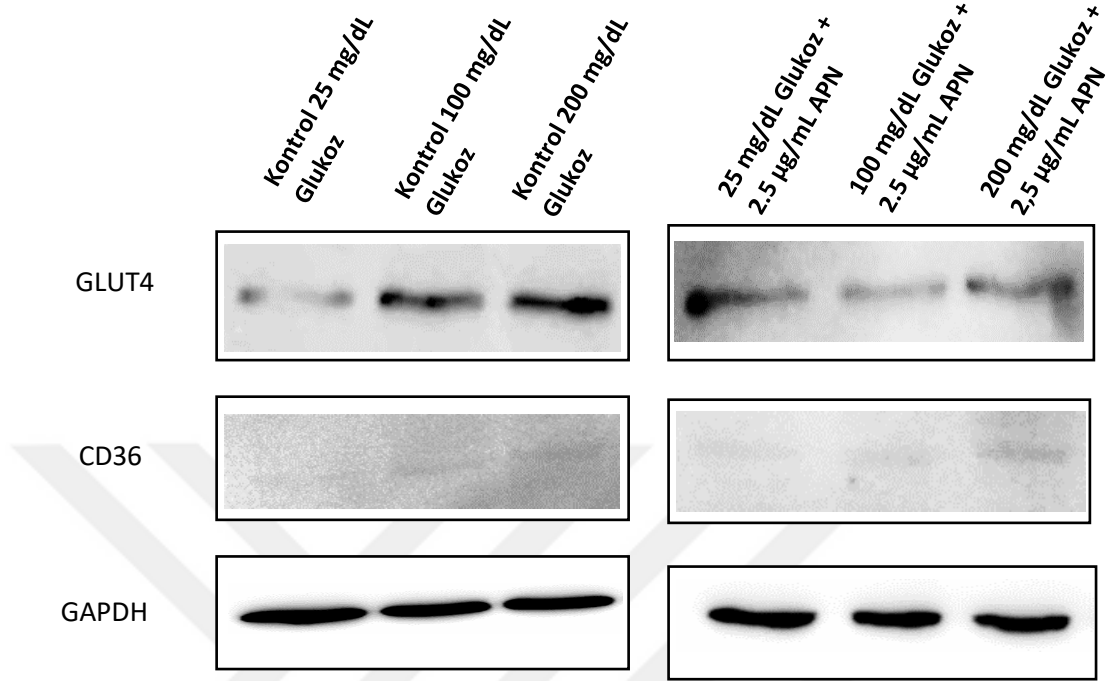
1 saat boyunca 1.25 µg/mL, 2.5 µg/mL ve 5 µg/mL APN uygulanan H9c2 hücrelerinde CD36 proteininin ekspresyon düzeyinin 25 mg/dL glukoz, 100 mg/dL glukoz ve 200 mg/dL glukozdan oluşan kontrol gruplarına göre azaldığı saptandı (Şekil 20-22).

1 saat boyunca 1.25 µg/mL APN uygulama



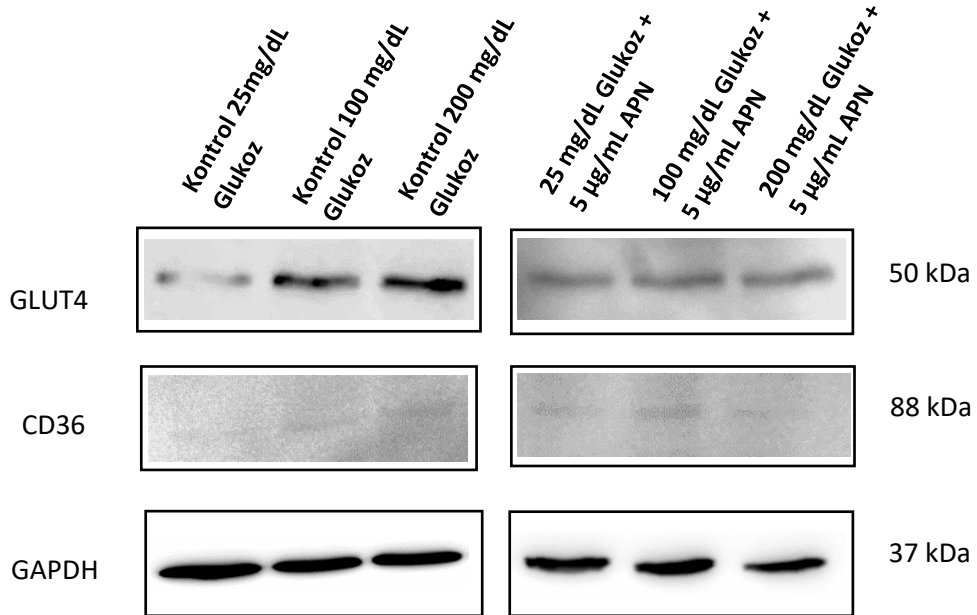
Şekil 20. H9c2 hücrelerinde 1 saat boyunca 1.25 µg/mL APN uygulaması (a) Western blot bant görüntüleri. (b) GLUT4 proteininin istatistiksel analizi. **** p < 0,0001, *** p value 0,0002. Tüm istatistiksel analizler Student-t testi kullanılarak yapıldı. Ortalama ± standart sapma gösterildi.

1 saat boyunca 2.5 µg/mL APN uygulama



Şekil 21. H9c2 hücrelerinde 1 saat boyunca 2.5 µg/mL APN uygulaması Western blot bant görüntüleri. Kontrol grubu ve deney grubu iki farklı jelde yürütüldü.

1 saat boyunca 5 µg/mL APN uygulama



Şekil 21. H9c2 hücrelerinde 1 saat boyunca 5 µg/mL APN uygulaması Western

blot bant görüntüleri. Kontrol grubu ve deney grubu iki farklı jelde yürütüldü.

2 saat boyunca 1.25 µg/mL APN uygulanan H9c2 hücrelerinde GLUT4 proteininin ekspresyon düzeyinin, 25 mg/dL glukoz kontrol grubu ile aynı kalırken, 100 mg/dL glukoz kontrol grubu ve 200 mg/dL glukoz kontrol grubuna göre istatistiksel olarak azalma gözlemlendi (Şekil 23).

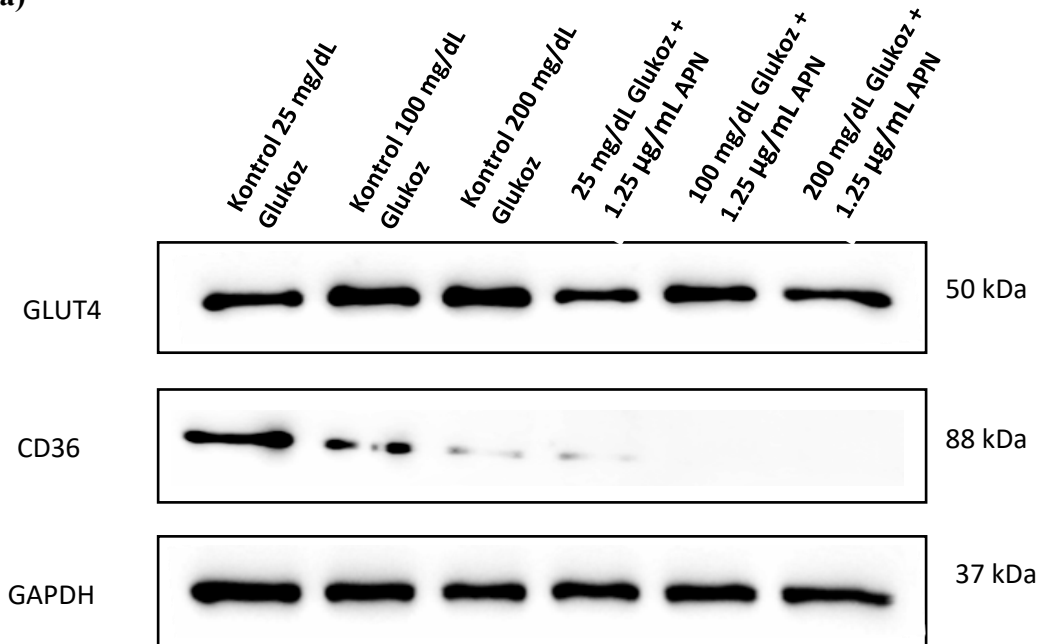
2 saat boyunca 2.5 µg/mL ve 5 µg/mL APN uygulanan H9c2 hücrelerinde GLUT4 proteininin ekspresyon düzeyinin 25 mg/dL glukoz, 100 mg/dL glukoz ve 200 mg/dL glukoz kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak azalma gösterdi (Şekil 24,25).

2 saat boyunca 1.25 µg/mL ve 5 µg/mL APN uygulanan H9c2 hücrelerinde CD36 proteininin ekspresyon düzeyinin 25 mg/dL glukoz, 100 mg/dL glukoz ve 200 mg/dL glukoz kontrol gruplarına göre azalma gösterdi (Şekil 23, 25).

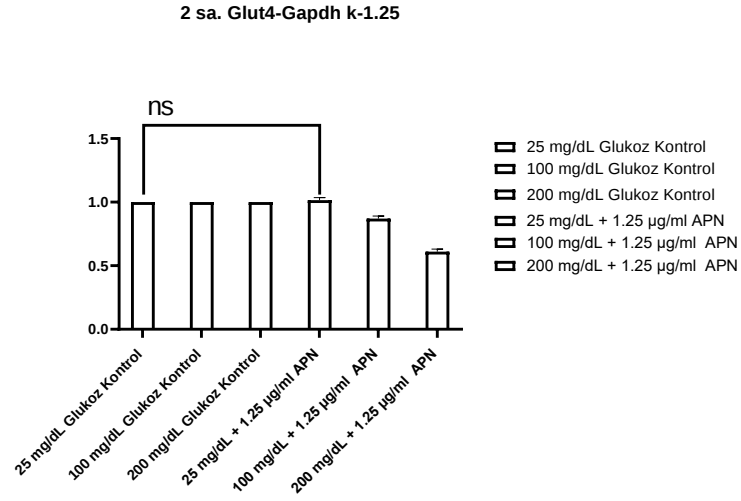
2 saat boyunca 2.5 µg/mL APN uygulanan H9c2 hücrelerinde CD36 proteininin ekspresyon düzeyinin 25 mg/dL glukoz, 100 mg/dL glukoz ve 200 mg/dL glukoz kontrol gruplarına göre artış gösterdi (Şekil 24).

2 saat boyunca 1.25 µg/mL APN uygulama

(a)



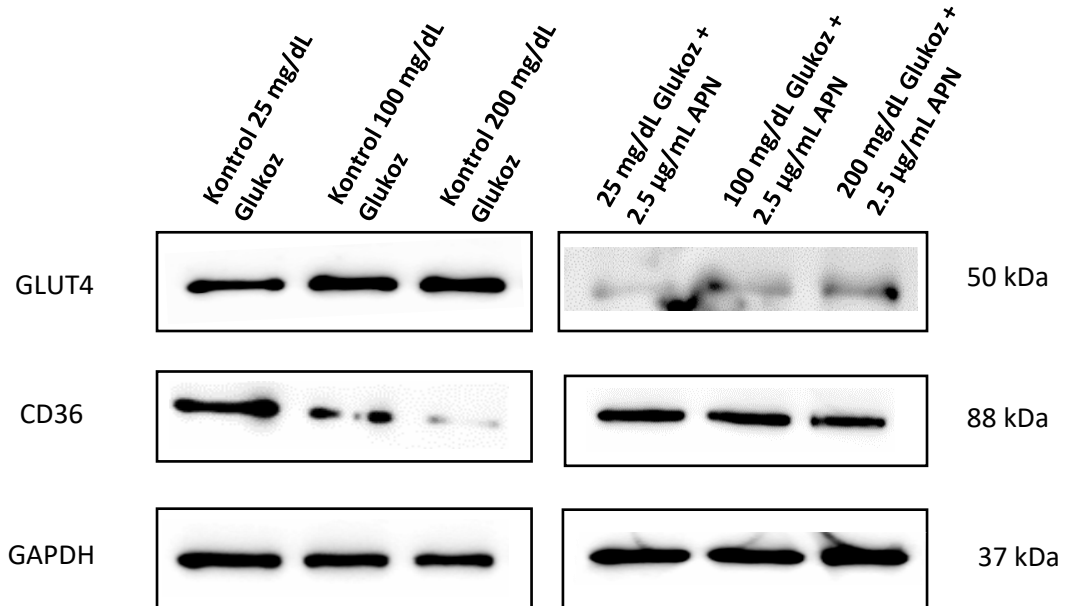
(b)



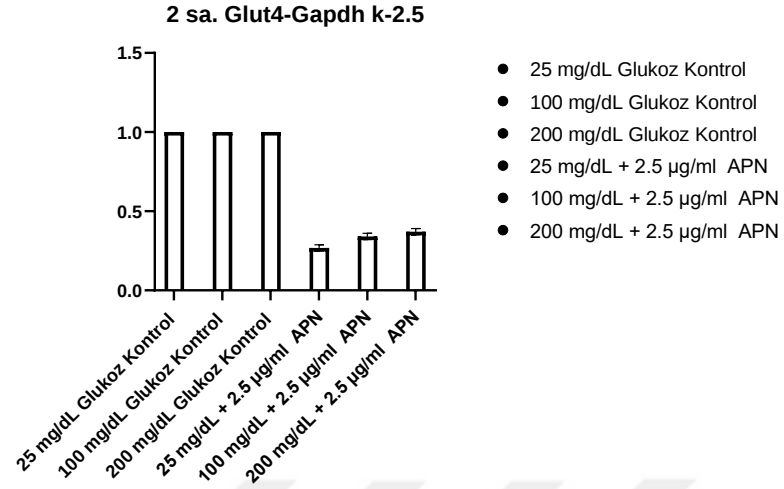
Şekil 23. H9c2 hücrelerinde 2 saat boyunca 1.25 µg/mL APN uygulaması (a) Western blot bant görüntüleri. (b) GLUT4 proteininin istatistiksel analizi. Tüm istatistiksel analizler Student-t testi kullanılarak yapıldı. Ortalama $\pm$ standart sapma gösterildi.

2 saat boyunca 2.5 µg/mL APN uygulama

(a)



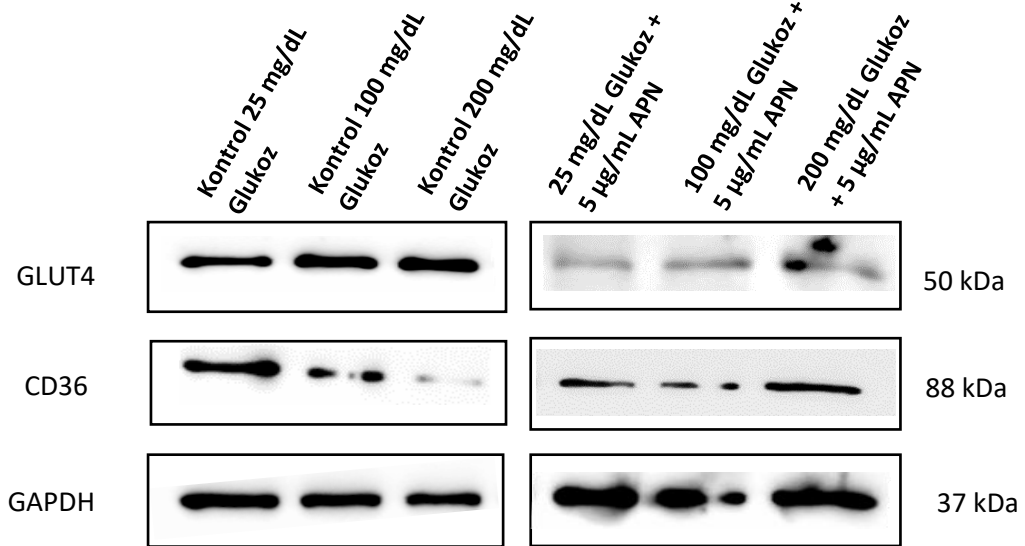
(b)



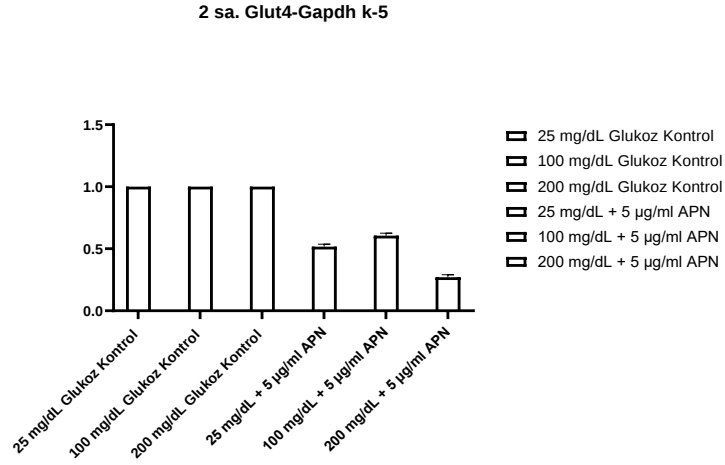
Şekil 24. H9c2 hücrelerinde 2 saat boyunca 2.5 µg/mL APN uygulaması (a) Western blot bant görüntüleri. Kontrol grubu ve deney grubu iki farklı jelde yürütüldü. (b) GLUT4 proteininin istatistiksel analizi. Tüm istatistiksel analizler Student-t testi kullanılarak yapıldı. Ortalama $\pm$ standart sapma gösterildi.

2 saat boyunca 5 µg/mL APN uygulama

(a)



(b)



Şekil 25. H9c2 hücrelerinde 2 saat boyunca 2.5 µg/mL APN uygulaması (a) Western blot bant görüntüleri. Kontrol grubu ve deney grubu iki farklı jelde yürütüldü. (b) GLUT4 proteininin istatistiksel analizi. Tüm istatistiksel analizler Student-t testi kullanılarak yapıldı. Ortalama $\pm$ standart sapma gösterildi.

24 saat boyunca 1.25 µg/mL APN uygulanan H9c2 hücrelerinde GLUT4 proteininin ekspresyon düzeyinin 25 mg/dL glukoz, 100 mg/dL glukoz ve 200 mg/dL glukoz kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak azalma gösterdi (Şekil 26).

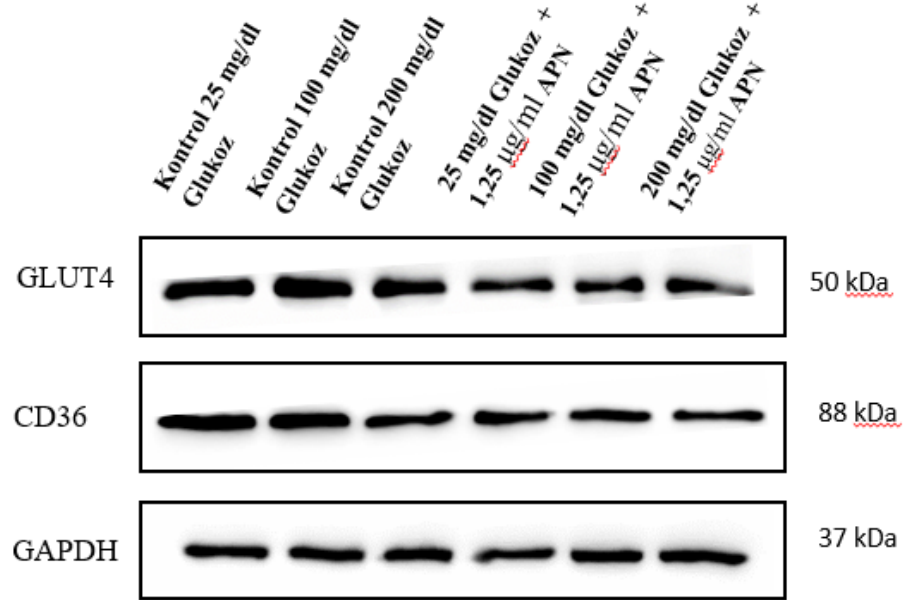
24 saat boyunca 2.5 µg/mL APN uygulanan H9c2 hücrelerinde GLUT4 proteininin ekspresyon düzeyinin 25 mg/dL glukoz, 100 mg/dL glukoz istatistiksel olarak azalma gösterirken, 200 mg/dL glukoz kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde (**** p < 0,0001) arttığı gözlemlendi (Şekil 27).

24 saat boyunca 5 µg/mL APN uygulanan H9c2 hücrelerinde GLUT4 proteininin ekspresyon düzeyinin 25 mg/dL glukoz, 100 mg/dL glukoz ve 200 mg/dL glukoz kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak azalma gösterdi (Şekil 28).

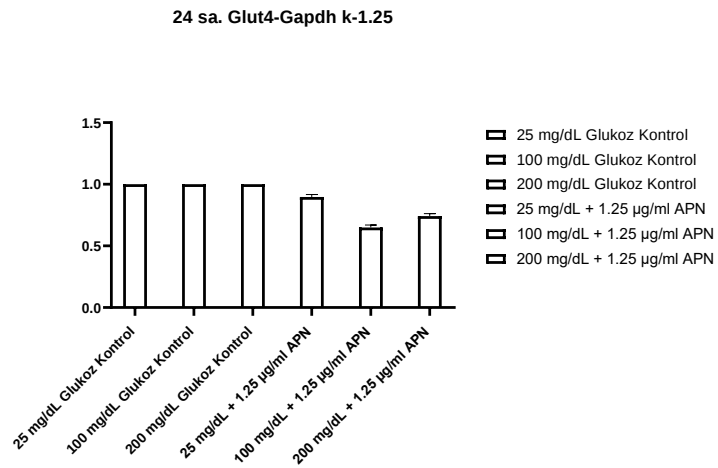
24 saat boyunca 1,25 µg/ml, 2,5 µg/mL ve 5 µg/mL APN uygulanan H9c2 hücrelerinde CD36 proteininin ekspresyon düzeyinin 25 mg/dL glukoz, 100 mg/dL glukoz ve 200 mg/dL glukoz kontrol gruplarına göre azalma gösterdi (Şekil 26-28).

24 saat boyunca 1.25 µg/mL APN uygulama

(a)

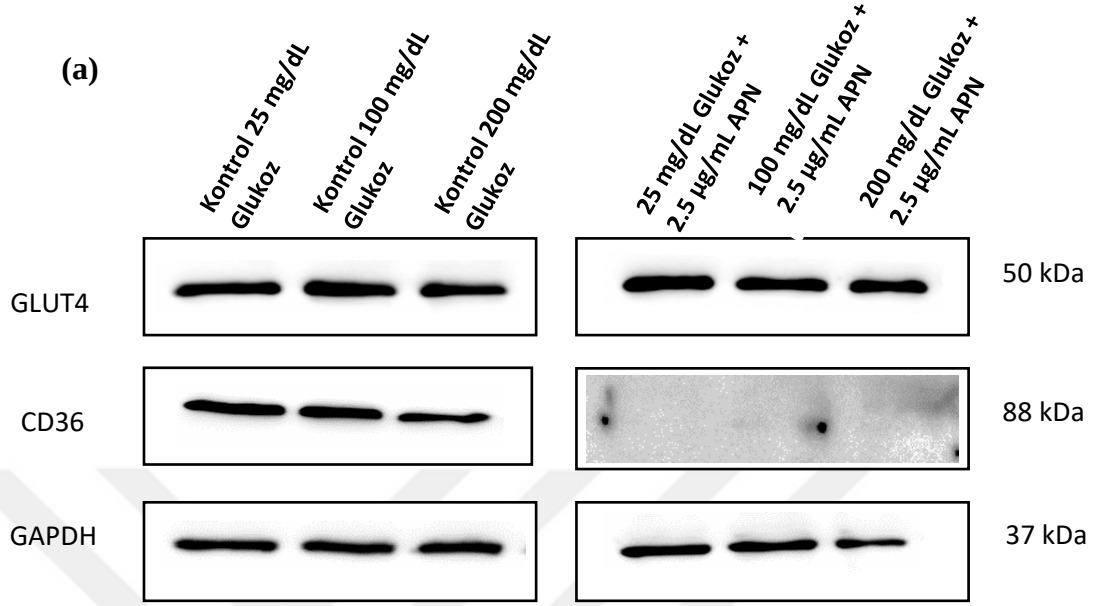


(b)



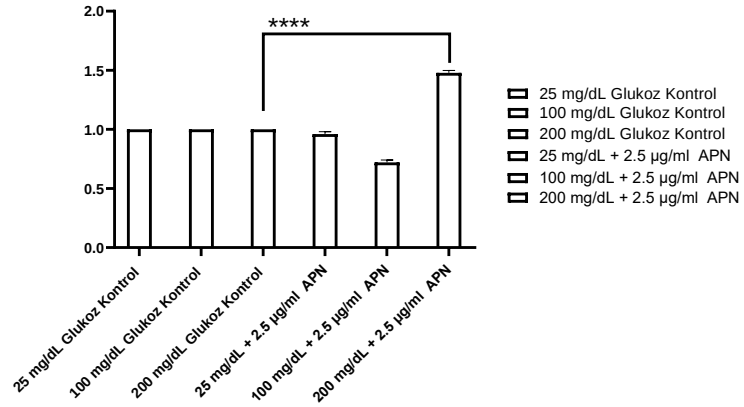
Şekil 26. H9c2 hücrelerinde 24 saat boyunca 1.25 µg/mL APN uygulaması (a) Western blot bant görüntüleri. (b) GLUT4 proteininin istatistiksel analizi. Tüm istatistiksel analizler Student-t testi kullanılarak yapıldı. Ortalama ± standart sapma gösterildi.

24 saat boyunca 2.5 µg/mL APN uygulama



(b)

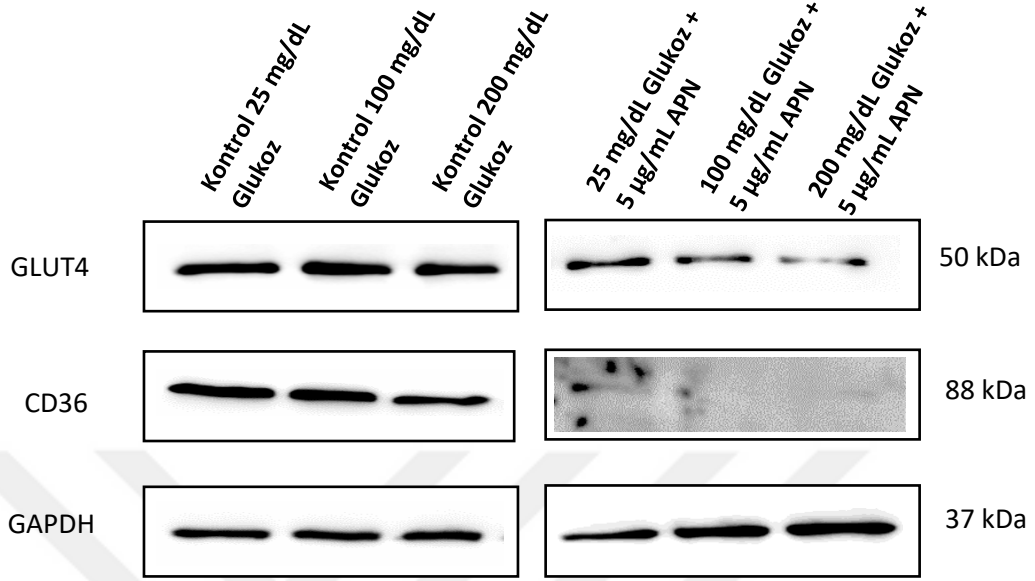
24 sa. Glut4-Gapdh k-2.5



Şekil 27. H9c2 hücrelerinde 24 saat boyunca 2.5 µg/mL APN uygulaması (a) Western blot bant görüntüleri. Kontrol grubu ve deney grubu iki farklı jelde yürütüldü. (b) GLUT4 proteininin istatistiksel analizi. Tüm istatistiksel analizler Student-t testi kullanılarak yapıldı. Ortalama ± standart sapma gösterildi.

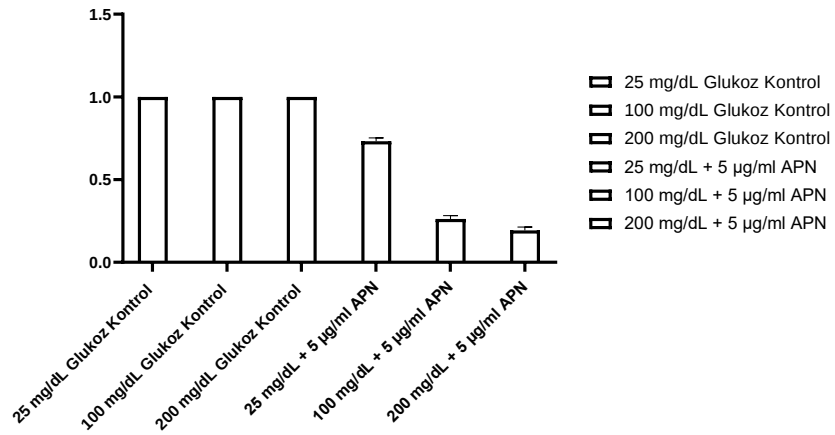
24 saat boyunca 5 µg/mL APN uygulama

(a)



(b)

24 sa. Glut4-Gapdh k-5



Şekil 28. H9c2 hücrelerinde 24 saat boyunca 5 µg/mL APN uygulaması (a) Western blot bant görüntüleri. Kontrol grubu ve deney grubu iki farklı jelde yürütüldü. (b) GLUT4 proteininin istatistiksel analizi. Tüm istatistiksel analizler Student-t testi kullanılarak yapıldı. Ortalama ± standart sapma gösterildi.

4.4.2 Western blot Verilerinin Birlikte Değerlendirilmesi

Tablo 18. APN uygulaması sonucu Western blot gen ekspresyon değişimleri. (↔: Değişmedi.

↓: Azalma ↑: Artma)

30 dk. APN Uygulama Sonuçları	GLUT4 Ekspresyonu	CD36 Ekspresyonu
25 mg/dL glukoz / 1.25 µg/mL APN	↔	↓
100 mg/dL glukoz/1.25 µg/mL APN	↓	↓
200 mg/dL glukoz/1.25 µg/mL APN	↓	↑
25 mg/dL glukoz /2.5 µg/mL APN	↑	↓
100 mg/dL glukoz /2.5 µg/mL APN	↑	↓
200 mg/dL glukoz /2.5 µg/mL APN	↑	↓
25 mg/dL glukoz /5 µg/mL APN	↑	↓
100 mg/dL glukoz /5 µg/mL APN	↑	↓
200 mg/dL glukoz /5 µg/mL APN	↑	↓
1 Saat APN Uygulama Sonuçları		
25 mg/dL glukoz / 1.25 µg/mL APN	↑	↔
100 mg/dL glukoz/1.25 µg/mL APN	↓	↔
200 mg/dL glukoz/1.25 µg/mL APN	↑	↑
25 mg/dL glukoz /2.5 µg/mL APN	↓	↓
100 mg/dL glukoz /2.5 µg/mL APN	↓	↓
200 mg/dL glukoz /2.5 µg/mL APN	↓	↓
25 mg/dL glukoz /5 µg/mL APN	↓	↓
100 mg/dL glukoz /5 µg/mL APN	↓	↓
200 mg/dL glukoz /5 µg/mL APN	↓	↓
2 Saat APN Uygulama Sonuçları		
25 mg/dL glukoz / 1.25 µg/mL APN	↔	↓
100 mg/dL glukoz/1.25 µg/mL APN	↓	↓
200 mg/dL glukoz/1.25 µg/mL APN	↓	↓
25 mg/dL glukoz /2.5 µg/mL APN	↓	↑
100 mg/dL glukoz /2.5 µg/mL APN	↓	↑
200 mg/dL glukoz /2.5 µg/mL APN	↓	↑
25 mg/dL glukoz /5 µg/mL APN	↓	↓
100 mg/dL glukoz /5 µg/mL APN	↓	↓
200 mg/dL glukoz /5 µg/mL APN	↓	↓
24 Saat APN Uygulama Sonuçları		
25 mg/dL glukoz / 1.25 µg/mL APN	↓	↓
100 mg/dL glukoz/1.25 µg/mL APN	↓	↓
200 mg/dL glukoz/1.25 µg/mL APN	↓	↓

25 mg/dL glukoz /2.5 µg/mL APN	↓	↓
100 mg/dL glukoz /2.5 µg/mL APN	↓	↓
200 mg/dL glukoz /2.5 µg/mL APN	↑	↓
25 mg/dL glukoz /5 µg/mL APN	↓	↓
100 mg/dL glukoz /5 µg/mL APN	↓	↓
200 mg/dL glukoz /5 µg/mL APN	↓	↓

Tablo incelendiğinde, APN uygulamasının özellik 30 dk.'lık kısa dönem uygulamalarında hipogliseminin mimik edildiği 1.25 µg/mL APN uygulamasında GLUT4 ekspresyonunda değişim gözlemlenmezken CD36 ekspresyonunda azalmalar olmuş, 1.25 µg/mL APN uygulamasının bazal ve hiperglisemi durumunda böyle bir ekspresyon değişimi gözlemlenmemiştir. 2.5 ve 5 µg/mL APN uygulamasının bazal ve hiperglisemi şartının mimik edildiği durumda GLUT4 ekspresyonlarında artış, CD36 ekspresyonlarında ise azalmalar meydana geldiği saptanmıştır. 2 saat ve 24 saatlik uzun dönem APN uygulamalarında ise bu durumun tersine döndüğü GLUT4 ekspresyonlarında azalmalar olurken, CD36 ekspresyonlarında ise artışların olduğu gözlemlenmiştir.

5.TARTIŞMA

Diyabetik kardiyomiyopati, diyabete bağlı ölümlerin başlıca nedenlerinden biri olan spesifik bir miyokardiyal hastalıktır. Hiperinsülinemi ve azalmış insülin duyarlılığı ile sol ventrikül hipertrofisine neden olur; metabolik bozukluk, endoplazmik retikulum stresine neden olur ve apoptozis sinyal yolunu başlatarak kardiyomiyosit apoptozuna yol açar (45). İnsülin direnci ve hiperinsülinemi koşullarında diyabetik kalp daha düşük glukoz alımı ve GLUT4 ekspresyonunda azalma gösterirken (51,52), dolaşımdaki serbest yağ asitleri ana enerji substratları olarak artış gösterir (53,54). Sağlıklı kalpte bu iki enerji substratları arasında denge olduğu bilinmektedir.

CD36, yağ asitlerinin alımında önemli bir rol oynayan reseptördür. Anormal CD36 dağılımı miyokardiyal enerji ihtiyacını değiştirir ve kardiyak disfonksiyona neden olmaktadır. Hiperglisemi ve hiperlipidemi, hücre zarına CD36 translokasyonunu teşvik ederek FA alımının artmasına neden olur (55-57). Yapılan birkaç çalışmada da CD36'nın lipid metabolizması üzerinden DCM'de görev adığı ve etkili olduğu bilinmektedir. Yapılan bir araştırmada yüksek eksprese olan MHC-PPAR α farelerinin CD36 eksikliği olan farelerle (MHC-PPAR α /CD36 $^{-/-}$ fareler) çaprazlanmasıyla üretilen yavrular, temel koşullar altında yüksek yağlı bir diyetle beslenmiş. Böylece çaprazlama diyet ile beslenen hayvanlarda azalmış trigliserit birikimi ve kalp fonksiyon bozukluğu gözlemlenmiştir. Glukagon benzeri peptid-1, protein kinaz A'nın (PKA) CD36 yolunun inhibisyonunu uyararak DCM'nin lipotoksitesini ortadan kaldırmıştır (58).

GLUT4, kasılan kalpte miyokardiyal glukoz alımının başlıca taşıyıcısıdır. GLUT4'ün iskelet kası, yağ dokusu ve kalpte aşırı ekspresyonu, DCM'nin karakteristik metabolik anormalliklerini önlemektedir ancak bu etkiye doğrudan kardiyomiyositlerdeki GLUT4'ün mü etki ettiği yoksa iyileştirilmiş metabolik homeostazın mı etki gösterdiği bilinmemektedir (59). Tip2 diyabet hastalarının insülin sinyalindeki azalma, GLUT4 translokasyonunda ve glukoz alımında azalmaya yol açmaktadır (60).

Adiponektin gibi bazı adipokinler, glukoz ve lipid metabolizmasını düzenleyerek; inflamasyonu ve oksidatif stresi azaltır, kardiyovasküler homeostazı

kolaylaştırır böylece kardiyovasküler hastalığı iyileştirdiği gösterilmiştir (61). Yapılan sınırlı çalışmalarda Adiponektin'in DCM'deki etkisinin insülin sinyal yolağı üzerinden etkili olduğu anlaşılmıştır. Azalmış AdipoR1 ekspresyonunun insülin direncini kötüleştirdiği ve diyabetik sıçanlarda DCM mekanizmalarında rol oynadığı ifade edilmiştir (46). Yapılan çalışmada azalan Adiponektin seviyeleri ve artmış insülin direnci, miyokardiyal enerji disfonksiyonuna, lipid birikimine ve ardından gelen kontraktıl disfonksiyona neden olarak DMC'nin gelişimini hızlandırdığı gösterilmiştir (62). Adiponektin ile yapılan çalışmada, *in vivo* erkek Sprague Dawley sıçanlarında, streptozotosin (STZ) verilerek T2DM modeli oluşturulmuştur. T2DM grubunda AdipoR1'in ekspresyonunun düştüğü ve DCM oluşturulan sıçanlarda APN düzeyinin de azaldığı gösterilmiştir (46). Yapılan bir diğer çalışmada, *in vivo* Wistar erkek sıçanlarında, STZ verilerek T2DM modeli oluşturulmuş ve farklı sürelerde yüksek yağlı diyet uygulanmıştır. 4-5 hafta uygulanan yüksek yağlı diyet grubunda kalp hasarının arttığı ve kalp dokularında APN ekspresyonunun azaldığı gözlemlenmiştir (65). *In vivo* bir çalışmada, erkek yabani tip ve AdipoR1 transgenik farelere yüksek yağlı diyet uygulanmasının kalpte metabolik işlevi bozduğu, AdipoR1'in ise bu duruma direnç gösterdiği ifade edilmiştir. AdipoR1'in CD36 ve karnitin palmitoiltransferaz I'nın mRNA ekspresyonunu, GLUT4 ekspresyonunu, kardiyak lipid birikimini ve oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir (63). Yapılan çalışmada, *in vitro* H9c2 hücrelerinde, lipopolisakkarit (LPS) uygulamasının, hücre canlılığını azalttığı ve 30dk. boyunca 1.25, 2.5 veya 5 µg /mL APN uygulamasının AMPK sinyal yolağını etkileyerek bu durumu tersine çevirdiği/hücre canlılığını prolifer ettiği gösterilmiştir. Adiponektin'in, LPS kaynaklı apoptozu ortadan kaldırdığı ve inflamasyonu hafiflettiği ifade edilmiştir (49). Bu çalışmadan yola çıkarak H9c2 hücre hattına uygulanan APN dozları referans alındı. Çalışmamız kapsamında H9c2 hücre hattına aynı konsantrasyonlarda APN verilerek (1.25, 2.5, 5 µg/mL) hücre içerisine glukoz ve yağ asidi alımında-taşınmından sorumlu GLUT4 ve CD36 genlerinin ekspresyonlarına etkisi incelendi.

HL-1 hücrelerinde Adiponektin'in, murin kardiyomiyositlerinde sentezlenip salgılandığı; AMPK aktivasyonu aracılığıyla kardiyomiyositlerde metabolizmanın düzenlendiği gösterilmiştir. 5, 30, 120 dk APN uygulamasının AMPK'in aktivasyonunun kalp kasında glukoz alımına aracılık ettiği ve GLUT4

translokasyonuna etki ettiği saptanmıştır (50). Literatürdeki bu çalışmalar, araştırmamızda APN'nin daha etkili olması için konsantrasyonunun ve inkübasyon sürelerinin değiştirilerek uygulanılabileceğini dūřündürmüřtür. Bu nedenle alışmamızda, APN'nin GLUT4 ve CD36 ekspresyonları üzerinde daha etkin olabileceği zaman aralıkları seçilerek (30 dk., 60 dk., 120 dk, 24 saat) hücreler belirlenen saatlerde farklı dozlarda APN ile inkübe edilmiştir.

Literatürde APN'nin glukoz ve yađ asidi metabolizmalarında etkili olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur (46, 49, 50, 63, 69) ancak H9c2 kardiyak hücre hattında farklı doz ve inkübasyon süresinde uygulama açısından sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Çalışmamız da elde ettiğimiz veriler, 30 dk. APN ile inkübasyon süresinde hipoglisemi (25 mg/dL) ve hiperglisemi (200 mg/dL) ortam koşullarının taklit edildiği durumlarda 2.5 µg/mL ve 5 µg/mL APN uygulamasında GLUT4 ekspresyonunda artış gözlemlenirken CD36'nın ekspresyonunda azalma saptanmıştır. Literatürde bazal glukoz koşulunda 30 dk. 2.5 µg /mL APN uygulamasının sonucu GLUT4 ekspresyonu çalışmamızın bulgularıyla benzer olarak arttığı saptanmıştır (49). Çalışmamız, APN'nin GLUT4 ve CD36 ekspresyonuna etkisinin birlikte gösterildiği ilk deneysel çalışmadır, bu yönüyle literatüre yeni katkılar yapılabilecektir. Araştırmamızda, hipoglisemi ve hipergliseminin taklit edildiği modellerin oluşturularak APN uygulamasının, GLUT4-CD36 ekspresyonuna farklı zaman dilimlerinde ve doz bağımlı etkisinin birlikte gösterilmesiyle literatüre yenilik katacağı dūřünölmektedir. Literatür incelendiğinde 1 saat APN uygulamasına dair H9c2 hücre hatları üzerinde yapılan bir çalışmaya ulaşılamamıştır. Çalışmamız kapsamında, 1 saat hipoglisemi ve hiperglisemi şartlarında 1.25 µg/mL APN uygulanmasında GLUT4 ekspresyonlarında artış gözlemlenirken, 2.5 ve 5 µg/mL APN uygulamasında GLUT4 ekspresyonunda azalmalar saptandı bu yönüyle çalışmamızın literatüre yenilik katacağını dūřünmekteyiz. Hipoglisemi-bazal-hiperglisemi şartlarında 2 saatlik 1.25, 2.5 ve 5 µg/mL APN uygulanan şartlarda GLUT4 ekspresyonunda azalmalar olduğu gözlemlendi; bu verilerimizden yola çıkarak hücre içerisine APN kaynaklı GLUT4 girişinin kısa dönemli olduğunu dūřünmekteyiz.

24 saatlik 1.25 µg /mL ve 5 µg /mL APN uygulamasının GLUT4 ekspresyonunu azalttığı, hipoglisemi ve bazal koşullarda 2.5 µg/mL APN uygulamasında azalma gözlemlenirken hiperglisemi koşullarında ise artma gözlemlendi, APN'nin

24 saat uygulanmasının literatürde başka bir çalışması ulaşamadığı için yenilik katacağı düşünülmektedir. Yağ asidi alımında ve taşınmasından sorumlu CD36'nın ekspresyon değişimleri incelediğinde; hipoglisemi-bazal-hiperglisemi şartlarında 2 saatlik 2.5 µg /mL APN uygulamasında artış gözlemlenirken diğer tüm saat ve APN konsantrasyonlarındaki uygulamalarda azalma gözlemlenmiştir. CD36 ekspresyonundaki azalma hücre içerisindeki enerji ihtiyacının glukoz yönüne kaydığını göstermektedir, bu da hipotezimizi doğrular niteliktedir. Literatürde CD36 ekspresyonundaki değişimin saptandığı sınırlı çalışma bulunmaktadır, araştırmamız bu yönüyle literatüre özgün katkı sağlayacaktır. Hipoglisemi ve hipergliseminin taklit edildiği ortam koşullarında, farklı dozlarda ve zaman diliminde APN uygulamasıyla CD36 ekspresyon değişimlerinin saptandığı bir çalışma bulunmamaktadır, çalışmamız bu yönüyle literatüre ilk katkı sağlayacak araştırma özelliğindedir.

Çalışmamızla birlikte, kardiyak enerji metabolizmasının yağ asitleri yönüne kayarak bozulmasında APN'nin etkili doz ve zamanlarda uygulamasının hücre içerisine GLUT4 girişlerini arttırarak; yağ asidi oksidasyonunda etkili olacağı saptanmıştır. Bu sebeple APN uygulamasının DCM tedavisinde destekleyici olarak etkili olabileceği bulgularımızla saptanmıştır.

6.SONUÇ ve ÖNERİLER

Kardiyak enerji metabolizması üzerine yaptığımız *in vitro* çalışmamızda; sağlıklı kalp hücre hattı olan H9c2 üzerinde farklı ortam koşullarında, farklı konsantrasyonlarda ve farklı zamanlarda uyguladığımız APN'nin kardiyak enerji metabolizması üzerine etkisine bakılmıştır. Çalışmamızda hipoglisemi ve hiperglisemi şartlarının taklit edilmesi, farklı zaman ve konsantrasyonlarda APN uygulamasının GLUT4 ve CD36 ekspresyonları üzerine etkisinin incelenmesi literatüre farklı bir bakış açısı kazandıracak ön veri niteliğindedir. Çalışmadaki modellemenin farklı hücre hatlarında denenmesi ve tekrar deneylerinin yapılmasıyla bulguların doğrulanması literatüre önemli katkı sağlayacaktır. Planlanacak *in vivo* çalışmalar için araştırma bulgularımız önemli ön veri niteliğindedir, bu bulgular ışığında sonuçların *in vivo* deney modellerinde gösterilmesi önerilmektedir.

Farklı ortam ve zaman koşullarında GLUT4 ekspresyonlarında gerçekleşen artışlar ile CD36 ekspresyonundaki azalmalar göz önüne alınarak APN'nin kardiyak enerji metabolizması üzerinde oluşan enerji dengesizliğini düzeltmeye yönelik etkisi olabileceği bu çalışmayla gösterilmiş oldu. Böylece çalışmamız Diyabetik kardiyomiyopati patogenezinin iyileştirilmesi yönündeki çalışmalara katkı sağlayacaktır.

7.KAYNAKLAR

1. Akoumianakis, I., Polkinghorne, M., & Antoniadou, C. (2022). Non-canonical WNT signalling in cardiovascular disease: mechanisms and therapeutic implications. *Nature Reviews Cardiology*, 19(12), 783-797.
2. Kalayinia, S., Arjmand, F., Maleki, M., Malakootian, M., & Singh, C. P. (2021). MicroRNAs: roles in cardiovascular development and disease. *Cardiovascular Pathology*, 50, 107296.
3. Khursheed, R., Singh, S. K., Wadhwa, S., Kapoor, B., Gulati, M., Kumar, R., Dua, K. ve ark. (2019). Treatment strategies against diabetes: Success so far and challenges ahead. *European journal of pharmacology*, 862, 172625.
4. Cole, J. B., & Florez, J. C. (2020). Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications. *Nature reviews nephrology*, 16(7), 377-390.
5. Classification of Diabetes Mellitus. 2019. World Health Organization.
Erişim adresi: https://www.who.int/health-topics/diabetes#tab=tab_1
6. Karwi, Q. G., Uddin, G. M., Ho, K. L., & Lopaschuk, G. D. (2018). Loss of metabolic flexibility in the failing heart. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 5, 68.
7. DiMeglio, L. A., Evans-Molina, C., & Oram, R. A. (2018). Type 1 diabetes. *The Lancet*, 391(10138), 2449-2462.
8. Katsarou, A., Gudbjörnsdóttir, S., Rawshani, A., Dabelea, D., Bonifacio, E., Anderson, B. J., Lernmark, Å. ve ark. (2017). Type 1 diabetes mellitus. *Nature reviews Disease primers*, 3(1), 1-17.
9. Batista, T. M., Haider, N., & Kahn, C. R. (2021). Defining the underlying defect in insulin action in type 2 diabetes. *Diabetologia*, 64, 994-1006.
10. Klip, A., McGraw, T. E., & James, D. E. (2019). Thirty sweet years of GLUT4. *Journal of Biological Chemistry*, 294(30), 11369-11381.
11. Artasensi, A., Pedretti, A., Vistoli, G., & Fumagalli, L. (2020). Type 2 diabetes mellitus: a review of multi-target drugs. *Molecules*, 25(8), 1987.

12. American Diabetes Association. (2014). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*, 37(Supplement_1), S81-S90.
13. Jia, G., Whaley-Connell, A., & Sowers, J. R. (2018). Diabetic cardiomyopathy: a hyperglycaemia-and insulin-resistance-induced heart disease. *Diabetologia*, 61(1), 21-28.
14. Bugger, H., & Abel, E. D. (2014). Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy. *Diabetologia*, 57, 660-671.
15. Galis, P., Bartosova, L., Farkasova, V., Bartekova, M., Ferenczyova, K., & Rajtik, T. (2024). Update on clinical and experimental management of diabetic cardiomyopathy: addressing current and future therapy. *Frontiers in Endocrinology*, 15, 1451100.
16. Jia, G., DeMarco, V. G., & Sowers, J. R. (2016). Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy. *Nature Reviews Endocrinology*, 12(3), 144-153.
17. Sun, A., Simsek Papur, O., Dirkx, E., Wong, L., Sips, T., Wang, S., Luiken, J. J. F. P. ve ark. (2021). Phosphatidylinositol 4-kinase III β mediates contraction-induced GLUT4 translocation and shows its anti-diabetic action in cardiomyocytes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78, 2839-2856.
18. Glatz, J. F., Nabben, M., & Luiken, J. J. (2020). Myocardial Fatty Acid-Glucose Fuel Balance as Target to Treat Cardiac Diseases. *Cardiol. Cardiovasc. Med*, 4, 584-590.
19. Nakamura, M., & Sadoshima, J. (2020). Cardiomyopathy in obesity, insulin resistance and diabetes. *The Journal of physiology*, 598(14), 2977-2993.
20. Karwi, Q. G., Sun, Q., & Lopaschuk, G. D. (2021). The contribution of cardiac fatty acid oxidation to diabetic cardiomyopathy severity. *Cells*, 10(11), 3259.
21. Karwi, Q. G., Uddin, G. M., Ho, K. L., & Lopaschuk, G. D. (2018). Loss of metabolic flexibility in the failing heart. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 5, 68.

22. Li, D. T., Habtemichael, E. N., Julca, O., Sales, C. I., Westergaard, X. O., DeVries, S. G., Bogan, J. S. ve ark. (2019). Focus: Organelles: Glut4 storage vesicles: Specialized organelles for regulated trafficking. *The Yale journal of biology and medicine*, 92(3), 453.
23. Joost, H. G., & Thorens, B. (2001). The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members. *Molecular membrane biology*, 18(4), 247-256.
24. Joost, H. G., Bell, G. I., Best, J. D., Birnbaum, M. J., Charron, M. J., Chen, Y. T., Thorens, B. ve ark. (2002). Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 282(4), E974-E976.
25. Koepsell, H. (2020). Glucose transporters in brain in health and disease. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 472(9), 1299-1343.
26. van Gerwen, J., Shun-Shion, A. S., & Fazakerley, D. J. (2023). Insulin signalling and GLUT4 trafficking in insulin resistance. *Biochemical Society Transactions*, 51(3), 1057-1069.
27. Ashaq, M. S., Zhang, S., Xu, M., Li, Y., & Zhao, B. (2024). The regulatory role of CD36 in hematopoiesis beyond fatty acid uptake. *Life Sciences*, 122442.
28. Pepino, M. Y., Kuda, O., Samovski, D., & Abumrad, N. A. (2014). Structure-function of CD36 and importance of fatty acid signal transduction in fat metabolism. *Annual review of nutrition*, 34(1), 281-303.
29. Zhou, X., Su, M., Lu, J., Li, D., Niu, X., & Wang, Y. (2024). CD36: the bridge between lipids and tumors. *Molecules*, 29(2), 531.
30. Luo DongMei, L. D., Wang ShuiPing, W. S., Zhao XueLi, Z. X., & Han XueFeng, H. X. (2019). Fatty acid translocase CD36/SR-B2 and its mediation in transmembrane transportation of long-chain fatty acids.
31. Choi, H. M., Doss, H. M., & Kim, K. S. (2020). Multifaceted physiological roles of adiponectin in inflammation and diseases. *International journal of molecular sciences*, 21(4), 1219.

32. Nguyen, T. M. D. (2020). Adiponectin: role in physiology and pathophysiology. *International journal of preventive medicine*, 11.
33. Han, W., Yang, S., Xiao, H., Wang, M., Ye, J., Cao, L., & Sun, G. (2022). Role of adiponectin in cardiovascular diseases related to glucose and lipid metabolism disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24), 15627.
34. Wong, G. W., Wang, J., Hug, C., Tsao, T. S., & Lodish, H. F. (2004). A family of Acrp30/adiponectin structural and functional paralogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(28), 10302-10307.
35. Han, Y., Sun, Q., Chen, W., Gao, Y., Ye, J., Chen, Y., Yang, Y. ve ark. (2023). New advances of adiponectin in regulating obesity and related metabolic syndromes. *Journal of Pharmaceutical Analysis*.
36. Liu, L., Yan, M., Yang, R., Qin, X., Chen, L., Li, L., Ma, K. ve ark. (2021). Adiponectin attenuates lipopolysaccharide-induced apoptosis by regulating the Cx43/PI3K/AKT pathway. *Frontiers in pharmacology*, 12, 644225.
37. Brochu-Gaudreau, K., Rehfeldt, C., Blouin, R., Bordignon, V., Murphy, B. D., & Palin, M. F. (2010). Adiponectin action from head to toe. *Endocrine*, 37, 11-32.
38. Hug, C., Wang, J., Ahmad, N. S., Bogan, J. S., Tsao, T. S., & Lodish, H. F. (2004). T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(28), 10308-10313.
39. Achari, A. E., & Jain, S. K. (2017). Adiponectin, a therapeutic target for obesity, diabetes, and endothelial dysfunction. *International journal of molecular sciences*, 18(6), 1321.
40. Zhou, L., Deepa, S. S., Etzler, J. C., Ryu, J., Mao, X., Fang, Q., Dong, L. Q. ve ark. (2009). Adiponectin activates AMP-activated protein kinase in muscle cells via APPL1/LKB1-dependent and phospholipase C/Ca²⁺/Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-dependent pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 284(33), 22426-22435.

41. Sharma, A., Mah, M., Ritchie, R. H., & De Blasio, M. J. (2022). The adiponectin signalling pathway-A therapeutic target for the cardiac complications of type 2 diabetes. *Pharmacology & Therapeutics*, 232, 108008.
42. Khoramipour, K., Chamari, K., Hekmatikar, A. A., Ziyaiyan, A., Taherkhani, S., Elguindy, N. M., & Bragazzi, N. L. (2021). Adiponectin: Structure, physiological functions, role in diseases, and effects of nutrition. *Nutrients*, 13(4), 1180.
43. Caselli, C., D'amico, A., Cabiati, M., Prescimone, T., Del Ry, S., & Giannessi, D. (2014). Back to the heart: the protective role of adiponectin. *Pharmacological research*, 82, 9-20.
44. Jee, S. H., Ahn, C. W., Park, J. S., Park, C. G., Kim, H. S., Lee, S. H., Huh, K. B. & ark. (2013). Serum adiponectin and type 2 diabetes: a 6-year follow-up cohort study. *Diabetes & metabolism journal*, 37(4), 252-261.
45. Lei, X., Qiu, S., Yang, G., & Wu, Q. (2023). Adiponectin and metabolic cardiovascular diseases: Therapeutic opportunities and challenges. *Genes & Diseases*, 10(4), 1525-1536.
46. Li, J., Su, S., & Zong, X. (2014). Analysis of the association between adiponectin, adiponectin receptor 1 and diabetic cardiomyopathy. *Experimental and therapeutic medicine*, 7(4), 1023-1027.
47. Quiroz, N., Rivas, N., Del Pozo, T., Burkhead, J., Suazo, M., González, M., & Latorre, M. (2015). Transcriptional activation of glutathione pathways and role of glucose homeostasis during copper imbalance. *Biometals*, 28, 321-328.
48. Steinbusch, L. K., Dirkx, E., Hoebers, N. T., Roelants, V., Foretz, M., Viollet, B., Luiken, J. J. & ark. (2013). Overexpression of AMP-activated protein kinase or protein kinase D prevents lipid-induced insulin resistance in cardiomyocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 55, 165-173.
49. Hao, R., Su, G., Sun, X., Kong, X., Zhu, C., & Su, G. (2019). Adiponectin attenuates lipopolysaccharide-induced cell injury of H9c2 cells by regulating AMPK pathway. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 51(2), 168-177.

50. Piñeiro, R., Iglesias, M. J., Gallego, R., Raghu, K., Eiras, S., Rubio, J., Lago, F. ve ark. (2005). Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes. *FEBS letters*, 579(23), 5163-5169.
51. Desrois, M., Sidell, R. J., Gauguier, D., King, L. M., Radda, G. K., & Clarke, K. (2004). Initial steps of insulin signaling and glucose transport are defective in the type 2 diabetic rat heart. *Cardiovascular research*, 61(2), 288-296.
52. Fischer, Y., Thomas, J., Sevilla, L., Muñoz, P., Becker, C., Holman, G., Zorzano, A. ve ark. (1997). Insulin-induced recruitment of glucose transporter 4 (GLUT4) and GLUT1 in isolated rat cardiac myocytes: evidence of the existence of different intracellular GLUT4 vesicle populations. *Journal of Biological Chemistry*, 272(11), 7085-7092.
53. Stanley, W. C., Lopaschuk, G. D., & McCormack, J. G. (1997). Regulation of energy substrate metabolism in the diabetic heart. *Cardiovascular research*, 34(1), 25-33.
54. Rodrigues, B., Cam, M. C., & McNeill, J. H. (1998). Metabolic disturbances in diabetic cardiomyopathy. *Molecular and cellular biochemistry*, 180, 53-57.
55. Li, H., Fan, J., Zhao, Y., Zhang, X., Dai, B., Zhan, J., Wang, D. W. ve ark. (2019). Nuclear miR-320 mediates diabetes-induced cardiac dysfunction by activating transcription of fatty acid metabolic genes to cause lipotoxicity in the heart. *Circulation research*, 125(12), 1106-1120.
56. Shu, H., Peng, Y., Hang, W., Nie, J., Zhou, N., & Wang, D. W. (2022). The role of CD36 in cardiovascular disease. *Cardiovascular research*, 118(1), 115-129.
57. Zeng, Y., Li, Y., Jiang, W., & Hou, N. (2024). Molecular mechanisms of metabolic dysregulation in diabetic cardiomyopathy. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 11, 1375400.
58. Yang, J., Sambandam, N., Han, X., Gross, R. W., Courtois, M., Kovacs, A., Kelly, D. P. ve ark. (2007). CD36 deficiency rescues lipotoxic cardiomyopathy. *Circulation research*, 100(8), 1208-1217.

59. Belke, D. D., Larsen, T. S., Gibbs, E. M., & Severson, D. L. (2000). Altered metabolism causes cardiac dysfunction in perfused hearts from diabetic (db/db) mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 279(5), E1104-E1113.
60. Sylow, L., Tokarz, V. L., Richter, E. A., & Klip, A. (2021). The many actions of insulin in skeletal muscle, the paramount tissue determining glycemia. *Cell Metabolism*, 33(4), 758-780.
61. Nakamura, K., Fuster, J. J., & Walsh, K. (2014). Adipokines: a link between obesity and cardiovascular disease. *Journal of cardiology*, 63(4), 250-259.
62. Nanayakkara, G., Kariharan, T., Wang, L., Zhong, J., & Amin, R. (2012). The cardio-protective signaling and mechanisms of adiponectin. *American journal of cardiovascular disease*, 2(4), 253.
63. Chou, I. P., Chiu, Y. P., Ding, S. T., Liu, B. H., Lin, Y. Y., & Chen, C. Y. (2014). Adiponectin receptor 1 overexpression reduces lipid accumulation and hypertrophy in the heart of diet-induced obese mice—possible involvement of oxidative stress and autophagy. *Endocrine research*, 39(4), 173-179.
64. Claycomb, W. C., Lanson Jr, N. A., Stallworth, B. S., Egeland, D. B., Delcarpio, J. B., Bahinski, A., & Izzo Jr, N. J. (1998). HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(6), 2979-2984.
65. Gupta, C., ve ark. "Adiponectin in onset and progression of T2DM with cardiac dysfunction in rats." *Human & Experimental Toxicology* 39.11 (2020): 1463-1474.

Ek 1.Etik Kurul Onayı

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARARI

Sayın Dr.Öğr.Üyesi Özlenen Şimşek Papur

Araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
TELEFON	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
FAKS	0 232 412 22 43
E-POSTA	goaek@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	7572-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ MÜNFERİT ARAŞTIRMA ☐ ÖÇM ☐ YÜKSEKLİSANS ☒ DOKTORA ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Adiponektin'in Glukoz ve Yağ Asidi Alınmasından ve Taşınmasından Sorumlu Genlerin İfadeleri Üzerine Etkisinin in vitro Kardiyak Hücre Modellerinde Araştırılması
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Dr.Öğr.Üyesi Özlenen Şimşek Papur SBE Moleküler Tıp A.D.
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2022/34-36	Tarih:26.10.2022				
	Dr.Öğr.Üyesi Özlenen Şimşek Papur'un sorumlusu olduğu "Adiponektin'in Glukoz ve Yağ Asidi Alınmasından ve Taşınmasından Sorumlu Genlerin İfadeleri Üzerine Etkisinin in vitro Kardiyak Hücre Modellerinde Araştırılması" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmanın mevcut haliyle etik yönden uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.					
ETİK KURUL BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyî Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
ETİK KURUL ÜYELERİ						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Mehmet Birhan Yılmaz (Başkan)	Kardiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Emel Çalikoğlu (Başkan Yardımcısı)	Preventif Onkoloji	Onkoloji Enstitüsü	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Ahmet Okay Çağlayan	Moleküler Tıp	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Suna Asilsoy	Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları	DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Seher Özyürek	Muskuloskeletal Fizyoterapi	DEÜ Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Fakültesi	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Nil Hocaoglu Aksay	Tıbbi Farmakoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr. Meryem Öztürk Haney	Halk Sağlığı Hemşireliği	Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr. Aylin Özgen Alpaydın	Göğüs Hastalıkları	DEÜ Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr. Aliye Akcalı	Periodontoloji	Diş Hekimliği Fakültesi	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr. Şule Özbilgin	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	DEÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü	Kadın	E ☐	H ☒	
Dr.Öğr.Üyesi Özlenen Şimşek Papur	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Kadın	E ☒	H ☐	
Dr.Öğr.Üyesi Tolga Şahin	Spor Yönetim Bilimleri	Necat-Hepkon Spor Bilimleri Fakültesi	Erkek	E ☐	H ☒	
Öğr.Gör.Dr.Kıvanç Yüksel	Biyostatistik ve Tıbbi Bilişim	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Bilişim A.D	Erkek	E ☐	H ☒	

Dr.Öğr.Üyesi Özlenen Şimşek Papur çalışmada sorumlu araştırmacı olduğu için çalışma görüşülürken toplantıda bulunmamıştır.

EK 2. ÖZGEÇMİŞ



MİNEL CAN EKİN

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

İletişim Adresi

Telefon

E-posta

İnternet Sayfası

Öğrenim Durumları

16 Eylül 2021 - Şu anda (3 yıl)
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, MOLEKÜLER TIP (YL) (TEZLİ)
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.38 / 4.0

15 Eylül 2017 - 09 Temmuz 2021 (3 yıl 10 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, ÜSKÜDAR ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
MÜHENDİSLİK VE DOĞA BİLİMLERİ FAKÜLTESİ, MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE
GENETİK PR. (ÜCRETLİ)
Diploma Numarası: 02-00741
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.25 / 4.0

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Proje Bilgileri

122Z903, Glukoz ve Yağ Asidi Alımının Düzenlenmesinde Bakar ve İlişkili Genlerin Rolünün In Vitro Kardiyak Hücre Modellerinde Araştırılması, Burslu, Yürürlükte, KBAG - Kimya Biyoloji Araştırma Destek Grubu, 1001 - Araştırma, ARDEB, Projeye Katılma/Aynılma Tarihleri: 01.04.2023 - 01.04.2025, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.04.2023 - 01.04.2025.

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Görev	ARDEB	BİDEB	BİLİM TOPLUM	ÜİDB	TEYDEB	Toplam
Hakemlik/Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	0	0	0	0	0	0
Moderatorlük Sayısı	0	0	0	0	0	0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	0	0	0	0	0	0
Raportörlük Sayısı	0	0	0	0	0	0
Katılmadığı Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	0	0	0	0	0	0