

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**VİTAMİN E ve ALFA LİPOİK ASİDİN STATİNLERİN NEDEN  
OLDUĞU MİTOKONDRIYAL DİSFONKSİYON ÜZERİNE ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Arş. Gör. Hatice ESER FAKI**

**DOKTORA TEZİ**

**VETERİNERLİK FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Danışman**

**Prof. Dr. Bünyamin TRAŞ**

**KONYA – 2020**

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**VİTAMİN E ve ALFA LİPOİK ASİDİN STATİNLERİN NEDEN  
OLDUĞU MITOKONDRIYAL DİSFONKSİYON ÜZERİNE  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Arş. Gör. Hatice ESER FAKI**

**DOKTORA TEZİ**

**VETERİNERLİK FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Danışman**

**Prof. Dr. Bünyamin TRAŞ**

Bu araştırma ÖYP tarafından 2015-ÖYP-042 proje numarası ile desteklenmiştir.

**KONYA – 2020**

## ÖNSÖZ

Kronik hastalıklarda uzun süre ilaç kullanımı ve polifarmasi ilaçların istenmeyen etkilerinin daha çok ortaya çıkmasına neden olmaktadır. İlaçların istenmeyen etkilerinden korunmak için aynı endikasyonda kullanılan farklı etki mekanizmalı ilaçlar kullanılabilir. Ancak aynı endikasyonda alternatif ilacın olmaması durumlarında, ilaçların uzun süre kullanımına bağlı yan etkileri azaltmak için çeşitli destek / tamamlayıcı uygulamaların yapılması önerilmektedir. Bu amaç için ana ilacın yanında antioksidanlar ve vitamin gibi ürünlerde önerilmektedir.

Kardiyovasküler hastalıkların risklerini azaltmak için kolesterol düşürücü ilaçlar olan statinler kullanılmaktadır. Statinler genellikle iyi tolere edilmelerine rağmen, kas ağrısından rabdomiyolize kadar değişen, bazen tedavinin bırakılmasından birkaç ay sonra bile devam edebilen ciddi iskelet kasına bağlı yan etkilere neden olabilirler. Ayrıca mitokondriyal disfonksiyona bağlı olarak diyabet, transaminaz seviyesinde yükselme, polinöropati, miyoglobinemide ve buna bağlı böbrek yetmezliği gibi diğer yan etkiler de bildirilmektedir. Alfa lipoik asit ve E vitamini gibi maddelerin, statinlerin mitokondri üzerindeki yan etkilerine bağlı olarak kas, karaciğer, böbrek ve beyin ile ilgili istenmeyen etkilerini azaltacağı öngörülerek mevcut çalışma düzenlenmiştir.

Mevcut çalışma verileri, Alfa lipoik asit ve Vitamin E'nin statinlerle eş zamanlı kullanımının, statinlere bağlı mitokondriyal disfonksiyonları düzelttiğini göstermektedir. Çalışma sonuçlarımıza göre, statinler gibi tedavide uzun süre kullanılan ve mitokondri fonksiyonları üzerinde olumsuz etkili olan ilaç ve maddelerin, yan etkilerini azaltmak için Alfa lipoik asit ve Vitamin E ile eş zamanlı olarak kullanılabilirliği öngörülmektedir.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde bana yol gösteren, her türlü bilimsel ve manevi desteğini esirgemeyen tez danışmanım ve Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Bünyamin TRAŞ başta olmak üzere, değerli hocalarım Prof. Dr. Ahmet Levent BAŐ, Prof. Dr. Halis OęUZ, Prof. Dr. Muammer ELMAS, Prof. Dr. Enver YAZAR, Prof. Dr. Kamil NEY, Doç. Dr. Ayře ER, Doç. Dr. Burak DİK ve projenin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen sevgili meslektaşlarım Zeynep ÖZDEMİR KÜTAHYA, Emre BAHÇIVAN, Devran COŐKUN, Rahmi CANBAR, Tuęba Melike PARLAK, Yasemin KORKMAZ ve Ayday ZHUNUSHOVA'ya teŐekkür ederim.

Bugünlere gelmemde katkıları sonsuz olan ve süreç boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme ve eşim Yalçın FAKI'ya sonsuz teŐekkür ediyorum.

Bu tez çalışmasını maddi yönden destekleyen YP Koordinatörlüęüne (2015-YP-042)'ne teŐekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR</b>	vi
<b>1.GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Mitokondri	1
1.2. Mitokondrinin Yapısı	1
1.3. Mitokondriyal DNA (mtDNA)	3
1.4. Mitokondrinin Görevleri	3
1.5. Mitokondriyal Disfonksiyon	6
<b>2. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	<b>11</b>
2.1. Kullanılan alet ve malzemeler	11
2.2. Kimyasal maddeler, solüsyonlar ve ilaçlar	11
2.3. Hayvan materyali	12
2.4. Deneysel uygulamalar	12
2.5. ATP Ölçümü	15
2.6. Mitokondriyal kompleks I ölçümü	16
2.6.1. Yumuşak dokulardan mitokondrilerin izole edilmesi (karaciğer, böbrek ve beyin)	16
2.6.2. Sert dokulardan mitokondrilerin izole edilmesi (iskelet ve kalp kası)	17
2.6.3. Bradford Yöntemi ile Protein Analizi	17
2.7. İstatistik Analiz	20

<b>3. BULGULAR</b>	<b>21</b>
<b>4. TARTIŞMA</b>	<b>24</b>
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	<b>27</b>
<b>6. KAYNAKLAR</b>	<b>28</b>
<b>7. EKLER</b>	<b>34</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>37</b>



## SİMGELER ve KISALTMALAR

A	Atorvastatin
ALA	Alfa lipoik asit
ATP	Adenozin trifosfat
Ca	Kalsiyum
Co-Q10	Koenzim Q10
DMM	Dış mitokondriyal membran
EGTA	Etilen glikol-bis ( $\beta$ -aminoetil eter)-N, N, N', N'-tetraasetik asit
ETZ	Elektron taşıma zinciri
FADH	Flavin adenin dinükleotidin indirgenmiş hali
Fenol-TE	Tris-EDTA ile doyurulmuş fenol
g	Gram
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansulfonik asit
HMG-CoA	3-Hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A
İMM	İç mitokondriyal membran
İ.P.	Periton içi
K	Kontrol
kg	Kilogram
L	Litre
MAA	Membranlar arası alan
MAO	Monoamin oksidaz
mg	Miligram
$\mu$ l	Mikrolitre
MM	Mitokondriyal matriks
MOPS	3-(N-morfolino) propan sülfonik asit

mtERs	Mitokondriyal östrojen reseptörleri
mtDNA	Mitokondriyal DNA
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotidin indirgenmiş hali
NO	Nitrik oksit
OXPHOS	Oksidatif fosforilasyon
ROS	Serbest oksijen radikali
SD	Standart sapma
SOD	Süperoksit dismutaz
TCA	Trikarboksilik asit
tRNA	Taşıyıcı RNA
rRNA	Ribozomal RNA
vit E	Vitamin E
w/w	Ağırlık/ağırlık esasına göre
$\Delta\Psi_m$	Mitokondriyal membran potansiyeli
%	Yüzde

## TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1.	Gruplara uygulanan maddeler ve dozları	14
Tablo 2.2.	Standart Protein çözeltilerinin hazırlanışı	18
Tablo 3.1.	Alfa lipoik asit (100 mg/kg) ve E vitamininin (100 mg/kg), Atorvastatin (10 mg/kg) uygulanmış ratların (ortalama $\pm$ SD) çeşitli dokularında ATP üzerindeki etkileri (mean $\pm$ SD)*	22
Tablo 3.2.	Alfa lipoik asit (100 mg/kg) ve E vitamininin (100 mg/kg), Atorvastatin (10 mg/kg) uygulanan ratların çeşitli dokularındaki mitokondriyal kompleks I (NAD dehidrogenaz) üzerindeki etkileri (mean $\pm$ SD)*	23

## ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 1.1. Mitokondrinin yapısı 2
- Şekil 1.2. Elektron taşıma zinciri 3



# ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

## **Vitamin E ve Alfa Lipoik Asidin Statinlerin Neden Olduğu Mitokondriyal Disfonksiyon Üzerine Etkisinin Araştırılması**

**Arş. Gör. Hatice ESER FAKI**

**Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı**

**DOKTORA TEZİ / KONYA-2020**

Bu çalışmanın amacı Alfa lipoik asit (ALA) ve E vitamini (vit E)'nin statinlerin neden olduğu mitokondriyal disfonksiyon üzerine etkilerini belirlemektir.

Çalışmada 38 adet Wistar Albino erkek rat (6-10 haftalık,  $242\pm 1.92$  g) kullanıldı ve kontrol grubu 6 rattan oluşurken, geriye kalan 32 rat ise 4 eşit gruba ayrılarak toplamda 5 grup oluşturuldu. Kontrol grubuna (K, n=6) 20 gün boyunca ALA çözücüsü olan dimetil sülfoksit (1000 µl/kg, gavaj) günde bir defa uygulandı. Atorvastatin (A, n = 8) grubuna, 20 gün boyunca günde bir defa atorvastatin (10 mg/kg, gavaj) uygulandı. Bu grup pozitif kontrol olarak kullanıldı. Atorvastatin+Alfa lipoik asit (A+ALA, n=8) grubuna, 20 gün boyunca atorvastatin (10 mg/kg, gavaj) ve ALA (100 mg/kg, gavaj) günde bir defa eş zamanlı olarak uygulandı. Atorvastatin+Vitamin E (A+Vit E, n=8) grubuna, 20 gün boyunca atorvastatin (10 mg/kg, gavaj) ve vit E (100 mg/kg, gavaj) günde bir defa eş zamanlı olarak uygulandı. Atorvastatin+Alfa lipoik asit+Vitamin E (A+ALA+Vit E, n = 8) grubuna, 20 gün boyunca atorvastatin (10 mg/kg, gavaj), ALA (100 mg/kg, gavaj) ve vit E (100 mg/kg, gavaj) günde bir defa eş zamanlı olarak uygulandı. Deney süresinin sonunda hayvanlar anestezi altında servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edildi ve atorvastatine bağlı oluşan mitokondriyal disfonksiyonun belirlenmesi için alınan karaciğer, kas (gastroknemius kası), kalp, böbrek ve beyin doku örneklerinden mitokondri izolasyon kiti kullanılarak izole edilen mitokondrilerde, mitokondriyal kompleks I enzimlerinden nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) dehidrogenaz (kompleks I) aktivitesi ve bu dokulardan uygun ekstraksiyon metodu ile ekstraksiyon işleminden sonra ticari ATP kiti kullanılarak adenozin trifosfat (ATP) düzeyleri ölçüldü.

Atorvastatin, kalp ve böbrekte ATP düzeylerini önemli ölçüde azaltırken, karaciğer, kas ve beyinde hafif bir azalma meydana getirdi. Atorvastatin, tüm dokularda kompleks I aktivitesinde önemsiz bir azalmaya neden oldu. ALA uygulaması karaciğer, kalp ve böbrekteki ATP düzeylerini önemli ölçüde iyileştirirken, Vit E atorvastatin grubuna kıyasla kas dışındaki tüm dokularda ATP

düzeylerini iyileştirdi. Hem ALA hem de vit E'nin tek başına uygulanması atorvastatin grubuna göre kas, kalp, böbrek ve beyindeki kompleks I aktivitesini iyileştirdi. ALA ve Vit E'nin kombinasyonu karaciğer, böbrek ve beyindeki ATP seviyelerini Atorvastatin grubuna göre önemli ölçüde iyileştirirken kalpte ise azalmaya neden olmuştur. Ayrıca ALA ve Vit E'nin kombinasyonu tüm dokulardaki kompleks I aktivitesini Atorvastatin grubuna göre önemli ölçüde iyileştirmiştir. Bu çalışmada atorvastatinin mitokondriyal fonksiyonlar üzerindeki istenmeyen etkileri, tek başına ve kombinasyon halinde ALA ve / veya Vit E kullanılarak iyileştirilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Mitokondri, ATP, Kompleks I, Atorvastatin, Alfa lipoik asit, E Vitamini



## **SUMMARY**

REPUBLIC of TURKEY

SELCUK UNIVERSITY

HEALTH SCIENCES INSTITUTE

### **Investigation of the Effect of Vitamin E and Alpha Lipoic Acid on Mitochondrial Dysfunction Caused by Statins**

**Arş. Gör. Hatice ESER FAKI**

**Department of Pharmacology and Toxicology**

**PhD THESIS / KONYA-2020**

To determine the effects of alpha lipoic acid (ALA) and vitamin E (Vit E) on mitochondrial dysfunction caused by statins.

In the study, 38 pieces Wistar Albino male rats (6-10 weeks old,  $242 \pm 1.92$  g) were used and the control group consisted of 6 rats, while the remaining 32 rats were divided into 4 equal groups and a total of 5 groups were formed. Dimethyl sulfoxide (1000  $\mu$ l/kg, gavage), which is ALA solvent was applied to the control group (C, n = 6) for 20 days. Atorvastatin (10 mg/kg, gavage) was administered to the atorvastatin group (A, n = 8) once daily for 20 days. This group was used as a positive control. Atorvastatin (10 mg/kg, gavage) and ALA (100 mg/kg, gavage) were applied simultaneously to the Atorvastatin + Alpha lipoic acid (A + ALA, n = 8) group once daily for 20 days. Atorvastatin (10 mg/kg, gavage) and vit E (100 mg/kg, gavage) were applied simultaneously to the Atorvastatin + Vitamin E (A + vit E, n = 8) group once daily for 20 days. Atorvastatin (10 mg/kg, gavage), ALA (100 mg/kg, gavage) and vit E (100 mg/kg, gavage) were applied simultaneously to the Atorvastatin + Alpha lipoic acid + Vitamin E (A + ALA + vit E, n = 8) group once daily for 20 days. At the end of the experiment period, animals were sacrificed by cervical dislocation method under anesthesia. ATP level and complex I activity were measured from liver, muscle (gastrocnemius muscle), heart, kidney and brain. Atorvastatin significantly decreased the ATP levels in heart and kidney, while a slight decrease was seen in liver, muscle and brain. Atorvastatin caused an insignificant decrease in the

complex I activity in all tissues examined. ALA administration significantly improved the ATP levels in the liver, heart and kidney, while Vit E improved the ATP levels in all tissues except the muscle compared to Atorvastatin group. Single administration of both ALA and vit E ameliorated complex I activity in the muscle, heart, kidney and brain. The combination of ALA and Vit E significantly improved ATP levels in the liver, kidney and brain compared to the Atorvastatin group, while causing a decrease in the heart. In addition, the combination of ALA and Vit E significantly improved complex I activity in all tissues compared to the Atorvastatin group. The undesirable effects of Atorvastatin on mitochondrial functions in this study ameliorated by using ALA and / or Vit E alone and in combination.

**Key words:** Mitochondria, ATP, Complex I, Atorvastatin, Alfa lipoic acid, Vitamin E

## 1.GİRİŞ

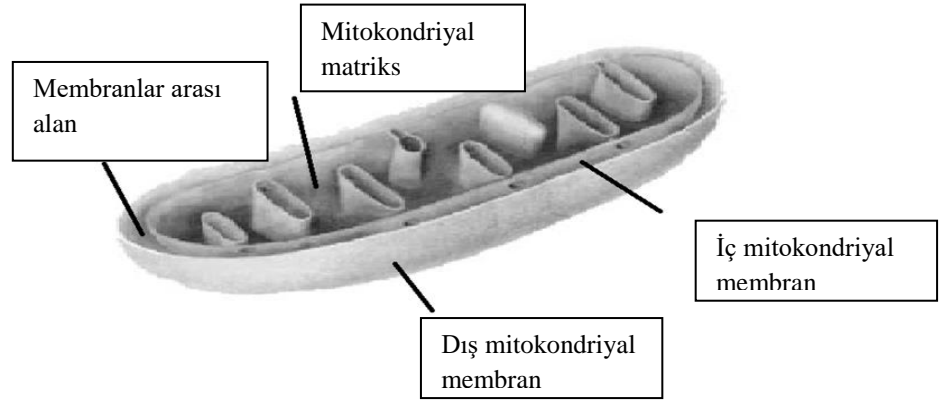
Diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar gibi bazı hastalıkların tedavisinde uzun süreli ilaç kullanımı gerekmektedir. Ancak kronik ilaç kullanımı, ilaçların yan etki insidansını da arttırmaktadır. Uzun süreli ilaç kullanımı durumlarında olumsuz ilaç etkilerini azaltmak için stratejiler geliştirilmektedir. Statinlerin kardiyovasküler hastalıkları önlemek için uzun süreli kullanımı kas, karaciğer ve beyin gibi doku ve organlar üzerinde mitokondriyal disfonksiyon temelli yan etkiler oluşturmaktadır. Bu bilgilere dayanarak bizim çalışmamızın amacı antioksidan etkileri ile öne çıkan Alfa lipoik asit (ALA) ile Vitamin E (vit E)'nin statinlerin yol açtığı mitokondriyal disfonksiyonları düzeltip düzeltmediğini test ederek statinlerin yan etkilerinin önlenmesinde kullanılıp kullanılmayacağını ortaya koymaktır.

### 1.1. Mitokondri

HücreSEL enerji merkezleri olarak bilinen mitokondriler, solunum zinciri (elektron taşıma zinciri, ETZ) içinde oksidatif fosforilasyonla (OXPHOS) adenosin trifosfat (ATP) üretirler (Katsetos ve ark 2013). Eritrositler dışında tüm hücre tipleri mitokondriye sahiptir (Singer 2014). Hücrelerin mitokondri sayısı enerji ihtiyacıyla ilişkilidir. Kalp, kas, beyin ve mide-bağırsak hücreleri çok sayıda mitokondriye sahipken deri hücreleri gibi düşük enerji kullanan hücreler daha az mitokondriye sahiptir (Frye ve Rossignol 2011).

### 1.2. Mitokondrinin Yapısı

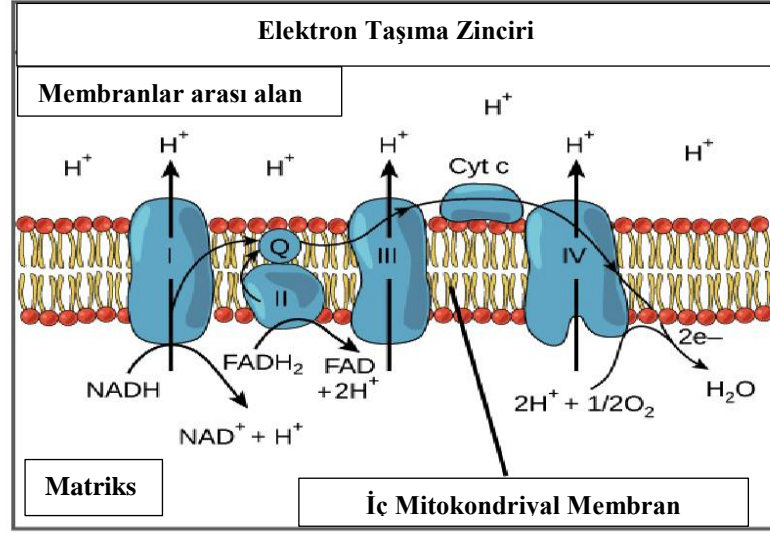
Mitokondri, dış mitokondriyal membran (DMM), membranlar arası alan (MAA), iç mitokondriyal membran (İMM) ve mitokondriyal matriks (MM) olmak üzere dört ana kısımdan oluşur. Hücre zarınıninkine benzer bir protein-fosfolipid oranına sahip olan DMM, toplam proteinlerin %8-10'unu içerir. Porin adı verilen çok sayıda integral membran proteini içerdiği gibi aynı zamanda taşıyıcı proteinler ve mitokondrinin fisyon (parçalanma) ve füzyon (birleşme) proteinlerini de ihtiva etmektedir (Wen ve ark 2016). Dış membran, yağ asitlerinin zincir uzaması, epinefrin oksidasyonu ve triptofan parçalanması gibi çeşitli faaliyetlere katılan enzimleri içerir. Bu enzimler, monoamin oksidaz (MAO), rotenone-insensitive NADH-sitokrom c-redüktaz, kinürenin hidroksilaz ve yağ asidi Co-A ligazdır (Chipuk ve ark 2006).



**Şekil 1.1.** Mitokondrinin yapısı

Önemli metabolik reaksiyonların gerçekleştiği yer olan matriksi çevreleyen İMM, ETZ'nin bulunduğu krista olarak adlandırılan kıvrımları oluşturur. Bu kıvrımlar yüzey alanını genişleterek daha fazla ATP üretimine imkan sağlar. 151 farklı polipeptit içeren ve yüksek protein/fosfolipid oranına sahip olan İMM, mitokondrideki toplam proteinin 1/5'ine sahiptir. Matriks, çok sayıda enzimin yüksek miktarda bulunduğu, ATP üretiminin gerçekleştiği, özel mitokondriyal ribozomlar, taşıyıcı RNA (tRNA), mitokondriyal DNA (mtDNA) genomunun kopyalarının bulunduğu alandır. Ayrıca yağ asidi ve pirüvatın oksidasyonu ve sitrik asit döngüsündeki enzimleri içerir (Alberts ve ark 1994).

Mitokondriyal ETZ aerobik organizmalarda enerji üretiminde önemli rol oynar. ETZ, iç mitokondriyal membranda bulunan beş protein kompleksinden oluşur: Bunlar NAD (nikotinamid adenin dinükleotid) dehidrogenaz (kompleks I), süksinat dehidrogenaz (kompleks II), ubikinon-sitokrom c oksidoredüktaz (kompleks III), sitokrom c oksidaz (kompleks IV) ve ATP-sentazdır (kompleks V) (Paradies ve ark 2011).



Şekil 1.2. Elektron taşıma zinciri

### 1.3. Mitokondriyal DNA (mtDNA)

Mitokondri, matrikste mtDNA adındaki kendi genomunu taşır. Memeli mitokondriyal genomu, çift sarmallı halkasal yapıda olup 16569 baz çiftinden oluşur ve organizmanın fonksiyonunun sürdürülmesine katkı sağlar (Anderson ve ark 1981). Her bir insan mitokondrisi, solunum enzimlerinin sentezi için gerekli olan 2 ribozomal RNA (rRNA), 22 tRNA ve 13 polipeptitleri kodlayan mtDNA'ların yüz ila birkaç bin kopyasını taşır. mtDNA'nın, çekirdek DNA'sından bağımsız replikasyon ve transkripsiyon sistemi vardır. Ancak mtDNA'nın replikasyon ve transkripsiyonu için gerekli enzimler çekirdek DNA'sı tarafından sentezlendiğinden mtDNA tam olarak bağımsız değildir. Ayrıca memelilerde mtDNA gelecek kuşaklara maternal olarak aktarılır (Taanman 1999, Leonard ve Schapira 2000).

### 1.4. Mitokondrinin Görevleri

Mitokondrinin temel görevi trikarboksilik asit (TCA) döngüsü ve OXPHOS yoluyla NADH (nikotin adenin dinükleotidin indirgenmiş hali) ve ATP üretmektir. Ayrıca hücre yaşam siklusunun düzenlenmesi, hücre içi kalsiyum homeostazının sağlanması ve termogenezde görev alır (Eirin ve ark 2014).

Mitokondri dört temel özelliği ile hücre homeostazını düzenler:

- 1) Membran potansiyeli
- 2) Mitokondriyal otofaji (mitofaji)
- 3) Asetil-koenzim A (Asetil-CoA) yapımı
- 4) ROS üretimi

- Bir seri reaksiyonlar sonucu sağlanan besinlerin oksidasyonu ile ATP üretilir. Bu işlem sırasında, matriksteki yüksek negatif yüklere giden protonlar membranlar arası alana matriksten pompalanır. Bu mitokondriyal membran potansiyeli ( $\Delta\Psi_m$ ) olarak adlandırılır (Nunnari ve Suomalainen 2012).

- Mitofaji, otolizozomlar içinde sadece hasarlı mitokondrilerin hücreler tarafından seçici olarak yok edilmesini içeren homeostatik bir süreçtir. Genellikle mitokondriyal membran potansiyeli düşük olduğunda mitofajinin başlatıldığı gösterilmiştir (Kubli ve Gustafsson 2012). Hücrel homeostazın sürdürülmesi dışında, mitofaji hücrel stres yanıtında da önemli rol oynar. Hücrel ATP gereksinimine bağlı olarak mitofaji mitokondri sayısını belirler. Ayrıca mitofaji, hücre içi ağlardan hasarlı mitokondri ve toksik maddeleri ayırarak aşırı ROS üretimini düzenler. Böylece mitofaji hücrenin normal redoks durumunu dengeler. Mitokondriyal ROS ve mitofaji birbirini etkilediği için mitokondriyal ROS ve mitofajinin bir feedback döngü mekanizması oluşturduğu düşünülebilir (Sureshbabu ve Bhandari 2013).

- TCA döngüsü ve ETZ arasındaki koordinasyon ATP üretimi için önemlidir. Başlangıçta glikoliz sonucu üretilen pirüvat molekülleri mitokondriyal membranlardan geçer ve pirüvat dehidrogenaz kompleksi tarafından asetil CoA'ya dönüştürülür. Daha sonra asetil CoA, TCA döngüsüne girer ve hidrojen iyonları ile NADH ve flavin adenin dinükleotid (FADH) substratlarının indirgenmesi sağlanır. NADH, FADH ve hidrojen iyonları, İMM içindeki beş enzim komplekslerinden oluşan mitokondriyal solunum zinciri için elektron ve proton sağlar. Elektronlar elektron taşıyıcı ubikinon (koenzim- Q10) tarafından kompleks I ve II'den kompleks III'e taşınır ve daha sonra matriksten membranlar arası alana protonları pompalamak için kompleks I, III ve IV'ü uyarmak için yeterli enerji biriktiren sitokrom c tarafından kompleks IV'e aktarılır. Elektrokimyasal gradient sayesinde inorganik

fosfat ve adenozin difosfat yoğunlaşmasından ATP üretmek için kompleks V üzerinden protonlar matrikse geri akarlar (Pieczenik ve Neustadt 2007).

- Mitokondri memeli hücrelerinde endojen ROS'un önemli bir kaynağıdır. Solunum zincirinden dışarı sızan elektronlar süperoksit anyonlar üretmek için oksijenle reaksiyona girebilirler. Süperoksit anyonlar çeşitli redoks reaksiyonlarınca hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerine dönüştürülebilir (Wang ve ark 2013). Oksidatif hasarı önlemek için ROS'u inaktive eden enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanları içeren antioksidan sistemleri vardır.

Süperoksit dismutaz (SOD) tarafından  $H_2O_2$ 'ye dönüştürülebilen süperoksit anyonları, katalaz ve glutatyon peroksidaz tarafından da  $H_2O$  ve  $O_2$ 'ye ayrışmayı sağlar (Balaban ve ark 2005). Buna rağmen, ROS'un fazla üretimi hücrelerdeki proteinler, lipidler ve DNA'da oksidatif hasara sebep olabilir ve yaşlanma, kalp-damar hastalıkları, nörolojik hastalıklar ve diyabet de dahil olmak üzere çeşitli hastalıklara yol açabilir (Turrens 2003). Ancak, ROS memeli hücrelerinde önemli fizyolojik olgularda rol oynar. ROS düşük seviyelerde hücre adaptasyon, mitofaji ve hücre iletişiminde ikinci bir haberci olarak hizmet eder (Ray ve ark 2012).

Mitokondriyal füzyon ve fisyon sadece mitokondriyal morfoloji için gerekli olmayıp aynı zamanda mtDNA bütünlüğünün korunması, hücre yaşam siklusunun düzenlenmesi, redoksa duyarlı sinyallerin iletimi ve metabolik süreçlerde de rol oynar (Che ve ark 2014).

Hücrede serbest kalsiyum (Ca) konsantrasyonu reaksiyonların düzenlenmesi ve hücrede sinyal iletimi için önemlidir. Mitokondriler, hücrede Ca homeostazı için geçici olarak Ca depolarlar (Siegel ve ark 1999). Kalsiyum, IMM üzerinde mitokondriyal Ca uniporter ile matrikse alınır (Miller 1998). Bu olay mitokondriyal membran potansiyeli tarafından başlatılır (Siegel ve ark 1999).

Mitokondriler hormonal sinyalizasyonda da rol oynarlar. Mitokondriler, mitokondriyal östrojen reseptörleri (mtERs) aracılığıyla hormonlara karşı duyarlıdır. Bu reseptörler beyin ve kalp gibi çeşitli doku ve hücre tiplerinde bulunurlar (Klinge 2008, Álvarez-Delgado ve ark 2010, Pavón ve ark 2012).

## 1.5. Mitokondriyal Disfonksiyon

Hücrelerin enerji üretim merkezi olan mitokondrilerin fonksiyon bozuklukları, hücre işlevlerinde ciddi bozukluklara yol açtığından çeşitli hastalıkların patogenezesinde önemli rol oynadıkları kabul edilmektedir. Mitokondriyal disfonksiyonlar genel olarak OXPHOS yoluyla ATP üretimi, hücre solunum, ROS üretimi ve detoksifikasyonu, membran potansiyeli, proton sızıntısı, Ca homeostazı ve apoptozisin düzenlenmesi gibi çok sayıda mitokondriyal fonksiyon göstergelerindeki bozukluklarla tanımlanır (Brand ve Nicholls 2011). Ayrıca mitokondriyal disfonksiyon, mitokondriyal içerikte azalma olarak tanımlanabilirken, mitokondriyal aktivite ve oksidatif fosforilasyondaki bir azalma olarak da tanımlanabilmektedir (Montgomery ve Turner 2015).

Mitokondriyal disfonksiyonların nedenleri mitokondriyal ve genomik DNA mutasyonları, süperkompleks destabilizasyonu, mitokondriyal protein birikimleri ve endoplazmik retikulum stresidir (Dudkina ve ark 2010, Tuppen ve ark 2010, Park ve Larsson 2011, Pellegrino ve ark 2013, Vannuvel ve ark 2013). Yaşlanma, çevre ve besin kirlenmesine neden olan çeşitli kimyasal maddeler, statin gibi bazı ilaçlar ve modern yaşam şekillerinin de mitokondriyal disfonksiyonlara neden olduğu belirtilmektedir (Lim ve ark 2010).

Mitokondriyal disfonksiyonlar hem kas hem de sinir sistemi hastalıklarında sık gözlenir ve bu disfonksiyon göstergeleri (ATP üretiminde azalma, elektron taşıma zinciri enzimlerinde değişiklik, biyoenerjetiklerin bozulması, mtDNA içeriğinde azalma, apoptozis, oksidatif stres vb.) bu hastalıkların teşhisinde kullanılabilir. Özellikle iskelet kasının metabolizması glikolitik olduğundan mitokondriyal disfonksiyonlara daha duyarlıyken, oksidatif metabolizmaya sahip kalp ise mitokondriyal disfonksiyonlara karşı dirençlidir (Boutbir ve ark 2011).

### **Statinler**

3-Hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A (HMG-CoA) redüktaz inhibitörleri olan statinler lipid metabolizmasının modülasyonunu sağladıklarından lipid bozukluklarının özellikle hiperkolesteroleminin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Plazma kolesterolünü azaltmak için en sık kullanılan ilaçlardır.

Kolesterol biyosentetik yolundaki önemli bir ara ürün olan mevalonatın sentezini inhibe ederek karaciğerde kolesterol üretimini azaltırlar (Kaufmann ve ark 2006).

Statinler, esterlenmiş kolesterol birikiminin makrofajlara indirgenmesine, endotel nitrik oksit (NO) sentetazının artmasına, yangının azalmasına, trombosit aktivitesinin ve pıhtılaşmanın düzenlenmesini kontrol ettiklerinden anti-inflamatuvar, antiproliferatif ve antitrombotik etkilere de sahiptirler (Bellosta ve ark 2000, Futterman ve Lemberg 2004, Arnaud ve ark 2005, Liao ve Laufs 2005). Ayrıca tümör hücrelerinin büyümesini engelleyebilir ve hücre içi kalsiyum mobilizasyonunu arttırlar (Stancu ve Sima 2001).

Statinlerin keşfedilişi, koroner kalp hastalığının önlenmesinde önemli bir ilerlemeye yol açmıştır. Koroner hastalığı olan ya da olmayan hastalarda kardiyovasküler morbidite ve mortaliteyi azaltırlar (Jasińska ve ark 2007). Ayrıca bu grup ilaçların kardiyovasküler sistemde çok sayıda faydalı etkilere sahip oldukları bildirilmektedir (Giordano ve ark 1997, Bonetti ve ark 2003).

Kardiyovasküler sistem dışında da kontrast nefropati insidansını azaltma gibi faydalı etkileri vardır (Desai ve ark 2014). Genellikle iyi tolere edilmelerine rağmen, kas ağrısından rabdomiyolize kadar değişen, bazen tedavinin bırakılmasından birkaç ay sonra bile devam edebilen ciddi iskelet kasına bağlı yan etkilere neden olabilirler (Echaniz-Laguna ve ark 2010). Ayrıca mitokondriyal disfonksiyona bağlı gelişen diyabet, transaminaz yükselmesi, polinöropati, miyoglobininemi ve buna bağlı böbrek yetmezliği gibi diğer yan etkiler de bildirilmektedir (Sathasivam 2012, Naci ve ark 2013, Ruscica ve ark 2014).

Statinlerin mitokondri üzerindeki etkisinin dozla ilişkili olduğu, düşük mikromolar düzeyde mitokondriyal solunum zincir proteinleri üzerinde koruyucu etki ile mitokondriyal fonksiyonları iyileştirdiği, tioredoksinin S-nitrosilasyonu ile endotel hücrelerinde ROS'u azaltırken, antioksidatif enzimlerin etkinliğini arttırdığı, ayrıca yapılan bir çalışmada daha yüksek konsantrasyonlarda (>10 mM) statinlerin, mitokondriye zarar verdiği ve pro-apoptotik etkinlik gösterdikleri bildirilmektedir (Parihar ve ark 2012).

Statinler mitokondriyal solunum zincirinde önemli bir bileşen olan koenzim Q10'nun (ubikinon) bir prekürsörü olan mevalonatın sentezini inhibe ederler. Bu

sebeple, bu ilaçlar özellikle koenzim Q10 seviyesini düşürerek mitokondriyal fonksiyonlara zarar verirler (Wagner ve ark 2008). Koenzim Q10 azalması ve elektron taşıma blokunun neden olduğu miyopatilerin % 0.5-1'inden statinler sorumlu tutulmaktadır (Dirks ve Jones 2006).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda statinler ile ilişkili kas, karaciğer ve beyinle ilgili yan etkiler için mitokondri sorumlu tutulmaktadır (Kaufmann ve ark 2006, Nadanaciva ve ark 2007, Golomb ve Evans 2008, Galtier ve ark 2012, Sirvent ve ark 2012, Abdoli ve ark 2013). Statinlerle tedavi edilen hastalarda başlıca solunum zincir bozukluğunun sadece kompleks I'de meydana geldiği ifade edilmekte ve bu hastalarda koenzim Q10 içeriğinin azaldığı dolayısıyla statinlerin mitokondriyal fonksiyon üzerindeki yan etkilerinin koenzim Q10 seviyesinin azaltılışı ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (Deichmann ve ark 2010, Larsen ve ark 2013, Vaughan ve ark 2013).

### **Alfa Lipoik Asit**

Alfa lipoik asit [5- (1,2-ditiolan-3-yl) pentanoik asit, ALA] ilk olarak 1951 yılında sığır karaciğerinden izole edilmiştir (Reed ve ark 1951). ALA koenzim Q, vitamin C ve E, glutasyon, demir ve bakır şelatları da dahil olmak üzere diğer hücrel antioksidanların geri dönüşümlerini sağlar (Moini ve ark 2002). Mitokondrilerde birçok multi-enzim kompleksinin koenzimi olan ALA karbonhidratların, proteinlerin ve yağların metabolize edilmesi ve enerjilerinin ATP'ye dönüştürülmesi için gereklidir. Bu önemli koenzim kan glikozunun hücrenin içine normal taşınması için de gereklidir. Bu etkisi glikoz metabolize eden enzimler olan piruvat dehidrojenaz ve alfa-ketoglutarat dehidrojenazdaki işlevleri ile açıklanabilir ancak bazı araştırmacılar hücre zarında hücrel glikoz alımında daha doğrudan bir role sahip olabileceğini düşünmektedirler. Bununla birlikte ALA'nın, serbest radikalleri temizleme, metal şelasyon ve antioksidan rejenerasyonundaki spesifik etkileri olduğu da bildirilmektedir (Data 1995).

ALA uygulaması diyabet, katarakt, HIV aktivasyonu, nörodejenerasyon ve hayvanlarda radyasyon hasarı gibi birçok oksidatif stres gözlenen olgularda faydalıdır. Ayrıca miyogloblin, prolaktin, tioredoksin ve nükleer faktör kappa beta (NF-κB) transkripsiyon faktörü gibi proteinlerin redoks regülatörü olarak işlev görür

(Packer ve ark 1995, Fuchs 1997). Kan beyin bariyerini kolaylıkla geçebilen ALA beyin yaşlanmasına ve nörodejenerasyona ilişkin hücrel ve hayvan modellerde mitokondriyal fonksiyon üzerinde en çok çalışılan mitokondriyal besin öğelerinden biridir (Liu 2008). Mitokondrinin E2 alt birimine bağlı olarak bulunur ve piruvat dehidrojenaz ve  $\beta$ -ketoglutarat dehidrojenaz için koenzim görevi görmektedir (Packer ve ark 1995). İnsanlar lipoik asiti karaciğer ve diğer dokularda yağ asitlerinden ve sisteinden küçük miktarlarda sentezleyebilirler, bu yüzden eksojen kaynaklardan alınması gerekir (Carreau 1979).

Biyolojik etkisi öncelikle antioksidan özelliği ile ilişkili olan ALA aynı zamanda antimutajenik ve antikarsinojenik özelliklere de sahiptir (Miadokova ve ark 2000, Cremer ve ark 2006, Novotny ve ark 2008). Hem hayvansal hem de bitkisel gıdalardan alınan ALA öncelikle kırmızı et, karaciğer, kalp ve böbrek gibi hayvansal kaynaklı gıdalardan alınır. En çok bulunduğu bitkisel kaynaklar ise ıspanak, brokoli, domates, brüksel lahanası, patates, bezelye ve pirinç kepeğidir (Kataoka 1998, Lachman ve ark 2000). Gıda ile birlikte alınımı biyoyararlanımını azalttığı için yemeklerden 30 dakika önce veya 2 saat sonra alınması önerilmektedir (Gleiter ve ark 1996). Öncelikle karaciğerde mitokondriyal  $\beta$ -oksidasyon yoluyla metabolize olmaktadır (Gorça ve ark 2011).

Diyabet, kalp yetmezliği, miyokard enfarktüsü, nöropatik ağrı ve inmeye yol açabilen ateroskleroz ve hipertansiyon gelişiminde önemli bir faktördür (Beckman ve ark 2002). Hiperglisemi mitokondrilerde ROS'un fazla üretilmesi ile bağlantılı olarak hücre içi yolları aktive eder ve nöronal ve endotel hasara neden olur (Clavreul ve ark 2006). ALA'nın insüline duyarlı ve dirençli kas dokularında glikoz alımını iyileştirdiği bildirilmektedir (Eason ve ark 2002, Ghibu ve ark 2009). ALA glikoz kullanımını artırır ve glisemik kontrolü geliştirdiğinden karaciğerde bulunan detoksifikasyon mekanizmalarında kilit rol oynar (Gorça ve ark 2011). PI3K/Akt sinyal yolağı aracılığıyla diyabet aracılı mitokondriyal ve endotel disfonksiyonu önler (Bitar ve ark 2010).

Glikoz kullanımını iyileştirmede etkili olmasına rağmen diyabetik hastalarda nöropatik ağrının azaltılmasında etkisiz olduğu bildirilmektedir (Mijnhout ve ark 2010). Fakat hayvan diyabet modellerinde ALA tedavisinin kan akışını ve sinir iletimini geliştirdiği gösterilmiştir (Coppey ve ark 2001).

## Vitamin E

Tokoferol ve tokotrienol olmak üzere iki ana alt gruba sahip olan E vitamini, 1922 yılında tanımlanmış yağda çözünen bir vitamindir. Bitkisel yağlar, palmiye yağı, pirinç kepeği, buğday tohumu, aspir, zeytin, soya fasulyesi, arpa, fındık ve tahıllarda bulunmaktadır (Wong ve ark 2017). Bu vitamin, lipid peroksidasyonunu ve diğer radikal kaynaklı oksidatif olayları önlemede etkilidir (Tappel 1962, Esterbauer ve ark 1991). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda vitamin E (vit E)'nin anti-obezite, anti-hiperkolesterolemik, anti-diyabetik ve anti-hipertansif etkileri ortaya konulduğundan, bu vitamene ilgi artmıştır (Newaz ve ark 2003, Budin ve ark 2009, Zaiden ve ark 2010, Matough ve ark 2014, Zhao ve ark 2015).

Özellikle membranlar gibi lipitce zengin organellerin bütünlüğünü korumak için önemli rol oynar (Burton ve ark 1982, Burton ve ark 1983, Cheeseman ve ark 1984, Cheeseman ve ark 1986).  $\beta$ -tokoferol çoğunlukla mitokondriyal fraksiyonlarda lokalize olurken,  $\alpha$ -tokoferol mitokondriyal bütünlüğün korunmasında önemli görev alır (Li ve May 2003).

Antioksidan etkisi ile özellikle kardiyovasküler hastalıklar, ateroskleroz ve kanser gibi oksidatif stres kaynaklı kronik hastalıkları önleyebildiği ifade edilmektedir (Rimm ve ark 1993, Stampfer ve ark 1993). Yüksek dozda E vitamininin, yaşlı erkek farelerde hayatta kalmayı, sinirsel performansı ve beyin mitokondriyal fonksiyonu geliştirdiği bildirilmektedir (Navarro ve ark 2005). Vit E'nin mitokondri kaynaklı oksidatif stresle ilişkili hastalıklara karşı koruyucu ve mitokondrilerin dejenerasyonunu azaltıcı etkileri ile farelerin ömrünü uzattığı belirtilmektedir (Navarro ve Boveris 2007).

## 2. GEREÇ ve YÖNTEM

### 2.1. Kullanılan Alet ve Malzemeler

- Derin dondurucu (-80 °C, VWR, ABD)
- Saf su sistemi (aqua Max-Ultra System, Younglin Instrument Co. Ltd, Kore)
- Santrifüj (Sigma, 3K 18, Almanya)
- Mini santrifüj (VWR, 115 V, ABD)
- Hassas terazi (Metler Toledo, AG204, İsviçre)
- Vorteks (VWR, ABD)
- Manyetik karıştırıcı (Gerhardt Bonn, Almanya)
- Orbital çalkalayıcı (PST-60HL-4, Biosan, Letonya)
- Cam homojenizatör (İsolab, Almanya)
- Homojenizatör (Silent Crusher M, Heidolph Instruments, Taiwan)
- Elisa okuyucu (MWGt Lambda Scan 200, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA)
- Elisa okuyucu (Synergy H1, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA)

### 2.2. Kimyasal Maddeler, Solüsyonlar ve İlaçlar

- ATP kiti (Luminescent ATP Detection Assay Kit ab113849, USA)
- Mitokondriyal kompleks I ölçüm kiti (MitoCheck Complex I Activity Assay Kit Cayman 700930, USA)
- Mitokondri izolasyon kiti (Mitochondria Isolation Kit Sigma MITOISO1, Almanya)
- Hayvanlara uygulama için atorvastatin tablet (Cholvast, 10 mg tablet, Biofarma İlaç Endüstrisi Ltd. Sti., Türkiye) suda (1 mg/ml) çözdürüldü, vitamin E enjeksiyonluk süspansiyon (150 mg / ml, IM, Evigen, Aksu Farma Tıbbi Ürünleri ve Eczacılık Ürünleri A.Ş., Türkiye) ve alfa lipoik asit (İlko İlaç San. Ve Tic. A.Ş., Türkiye) dimetil sülfoksit içinde (100 mg/ml) çözdürüldü.
- Ekstraksiyon tamponu A: 1 M mannitol içeren 50 mM HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansulfonik asit), pH 7.5 ve 350 mM sükröz ve 5 mM EGTA (etilen glikol-bis ( $\beta$ -aminoetil eter)-N, N, N', N'-tetraasetik asit) içeren izotonik çözelti.

- Ekstraksiyon tamponu B: 100 mM MOPS (3-(N-morfolino) propan sülfonik asit), pH 7.5, 550 mM KCl ve 5 mM EGTA içeren izotonik çözelti.
- Saklama tamponu: 1.25 M sükröz içeren 50 mM HEPES, pH 7.5, 5 mM ATP, 0.4 mM ADP, 25 mM sodyum süksinat, 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 5 mM DTT içeren izotonik çözelti.
- Tampon çözelti A: 910 µl Kompleks I aktivite test tamponu, 20 µl 100 mM KCN (1 mM), 50 µl FF-BSA test reaktifi ve 20 µl Sığır kalbi mitokondri test reaktifi içermektedir.
- Tampon çözelti B: 625 µl kompleks I aktivite test tamponu, 30 µl NADH test reaktifi ve 20 µl ubiquinone test reaktifi içermektedir.

### 2.3. Hayvan Materyali

Çalışma 38 adet Wistar Albino ırkı 6-10 haftalık rat üzerinde gerçekleştirildi. Ratlar çalışmaya dahil edilmeden önce sağlık kontrolleri yapılarak çalışmaya alındı. Yem ve su ihtiyaçları ad libitum olarak giderildi. Hayvanların barındırılacağı ortamın ışık, ısı ve nem düzeyleri kontrol altında bulunduruldu. (12/12 saat ışık/karanlık-7.30/19.30, 22±2°C, %55±5 nem).

Deneyisel uygulamalar Selçuk Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama Merkezi'nde gerçekleştirildi. Çalışmaya başlamadan önce Selçuk Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama Merkezi Etik Kurulu'ndan onay (SUDAM, 2017-42) alındı (Bkz. EK A).

### 2.4. Deneyisel Uygulamalar

Deney grupları oluşturulurken hayvanlar aşağıdaki şekilde gruplandırıldı ve gruplarda bulunan hayvanlara Tablo 2.1.'de gösterildiği gibi ALA ve Vit E, 20 gün boyunca atorvastatin ile eş zamanlı olarak uygulandı. Atorvastatin (Pal ve ark 2015), ALA (Savitha ve ark 2005) ve Vit E (Kuhad ve Chopra 2009) dozları, bu alandaki önceki çalışmalar değerlendirilerek belirlendi.

**1. Grup (K) (Kontrol, n=6):** Kontrol grubuna (K, n=6) 20 gün boyunca ALA çözücüsü olan dimetil sülfoksit (1000 µl/kg, gavaj) günde bir defa uygulandı. Bu grup negatif kontrol olarak kullanıldı.

**2. Grup (A) (10 mg/kg/gün, gavaj, Atorvastatin, n=8):** Bu grupta bulunan hayvanlara gavaj yoluyla 10 mg/kg dozunda 20 gün boyunca günde bir defa Atorvastatin (Cholvast, 10 mg tablet, Biofarma İlaç Endüstrisi Ltd. Sti., Türkiye) uygulaması yapıldı. Bu grup pozitif kontrol olarak kullanıldı.

**3. Grup (A+ALA) (10 mg/kg, gavaj, Atorvastatin + 100 mg/kg, gavaj, Alfa Lipoik Asit, n=8):** Bu grupta bulunan hayvanlara 20 gün boyunca günde bir defa eş zamanlı olarak 10 mg/kg dozunda gavaj yoluyla Atorvastatin (Cholvast, 10 mg tablet, Biofarma İlaç Endüstrisi Ltd. Sti., Türkiye) ve 100 mg/kg dozunda gavaj yoluyla Alfa Lipoik Asit (İlko İlaç San. Ve Tic. A.Ş., Türkiye) uygulaması yapıldı.

**4. Grup (A+Vit E) (10 mg/kg, gavaj, Atorvastatin + 100 mg/kg, gavaj, Vitamin E, n=8):** Bu grupta bulunan hayvanlara 20 gün boyunca günde bir defa eş zamanlı olarak 10 mg/kg dozunda gavaj yoluyla Atorvastatin (Cholvast, 10 mg tablet, Biofarma İlaç Endüstrisi Ltd. Sti., Türkiye) ve 100 mg/kg dozunda gavaj yoluyla Vitamin E (150 mg / ml, IM, Evigen, Aksu Farma Tıbbi Ürünleri ve Eczacılık Ürünleri A.Ş., Türkiye) uygulaması yapıldı.

**5. Grup (A+ALA+Vit E) (10 mg/kg, gavaj, Atorvastatin + 100 mg/kg, gavaj, Alfa Lipoik Asit + 100 mg/kg, gavaj, Vitamin E, n=8):** Bu grupta bulunan hayvanlara 20 gün boyunca günde bir defa eş zamanlı olarak 10 mg/kg dozunda gavaj yoluyla Atorvastatin (Cholvast, 10 mg tablet, Biofarma İlaç Endüstrisi Ltd. Sti., Türkiye), 100 mg/kg dozunda gavaj yoluyla Alfa Lipoik Asit (İlko İlaç San. Ve Tic. A.Ş., Türkiye) ve 100 mg/kg dozunda gavaj yoluyla Vitamin E (150 mg / ml, IM, Evigen, Aksu Farma Tıbbi Ürünleri ve Eczacılık Ürünleri A.Ş., Türkiye) uygulaması yapıldı.

**Tablo 2.1.** Gruplara uygulanan maddeler ve dozları<sup>a</sup>

Grup	Atorvastatin	Alfa Lipoik Asit	Vitamin E
K <sup>b</sup> (n=6)	-	-	-
A (n=8)	10 mg/kg	-	-
A+ALA (n=8)	10 mg/kg	100 mg/kg	-
A+Vit E (n=8)	10 mg/kg	-	100 mg/kg
A+ALA+Vit E (n=8)	10 mg/kg	100 mg/kg	100 mg/kg

K: kontrol, A: atorvastatin, A+ALA: atorvastatin + alfa lipoik asit, A+Vit E: atorvastatin + vitamin E, A+ALA+Vit E: atorvastatin + alfa lipoik asit + vitamin E.

<sup>a</sup> Tüm maddeler gavaj yoluyla uygulandı. Hayvan uygulamaları için atorvastatin (1 mg / ml) ve alfa lipoik asit (100 mg / ml) sırasıyla su ve dimetil sülfoksit içinde çözdürüldü.

<sup>b</sup> Kontrol grubuna dimetil sülfoksit (1000 ul / kg) uygulandı.

Tüm uygulamalar tamamlandıktan sonra 20.günün sonunda hayvanlar anestezi (Rompun, 10 mg/kg, İ.P. ve Ketalar, 90 mg/kg, İ.P.) altında servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edildi ve alınan karaciğer, kas (gastroknemius kası), kalp, böbrek ve beyin doku örnekleri anında sıvı nitrojen içerisinde donduruldu ve ölçüm zamanına kadar -80 °C'de muhafaza edildi.

Atorvastatine bağlı oluşan mitokondriyal disfonksiyonun belirlenmesi için ratların karaciğer, kas (gastroknemius kası), kalp, böbrek ve beyin dokularından Chida ve ark (2012) tarafından bildirilen ekstraksiyon metodu ve ticari ATP kiti (Luminescent ATP Detection Assay Kit (ab113849) Abcam, USA) kullanılarak Elisa okuyucusunda (Synergy H1, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT,USA) ATP düzeyleri belirlendi.

Ayrıca ratların karaciğer, kas (gastroknemius kası), kalp, böbrek ve beyin dokularından mitokondri izolasyon kiti (Mitochondria Isolation Kit Sigma MITOISO1, Almanya) kullanılarak izole edilen mitokondrielerde, mitokondriyal kompleks enzimlerinden NAD dehidrogenaz (kompleks I) aktivitesi ticari mitokondriyal kompleks I aktivite kiti (MitoCheck Complex I Activity Assay Kit

Cayman 700930, USA) kullanılarak Elisa okuyucusunda (MWGt Lambda Scan 200, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA) belirlendi.

## 2.5. ATP Ölçümü

ATP düzeyleri, ratların karaciğer, kas (gastrokinemius kası), kalp, böbrek ve beyin dokularından Chida ve ark (2012) tarafından bildirilen ekstraksiyon metodu ve ticari ATP kiti (Luminescent ATP Detection Assay Kit (ab113849) Abcam, USA) kullanılarak Elisa okuyucusunda (Synergy H1, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA) belirlendi.

ATP ekstraksiyonu için dokudan 100 mg tartıldı ve üzerine 3 mL soğuk fenol-TE (Tris-EDTA ile doyurulmuş fenol) ilave edilerek 30 saniye boyunca 30'ar saniye aralıklarla 3 kez homojenize edildi. Yeni bir ependorfa 1 mL homojenat alındı ve üzerine 200 µL kloroform ve 150 µL distile su ilave edildi. Homojenat 20 saniye boyunca vortekslendi ve 4°C'de 5 dakika 10,000 x g'de santrifüj edildi. Elde edilen süpernatanttan alınan kısım distile su ile 1000 kat seyreltildi ve lusiferin-lusiferaz deneyi için hazır hale getirildi.

ATP kit prosedürüne uygun olarak Elisa pleytinde her kuyucuğa 100 µl homojenat konuldu. Üzerine 50 µl deterjan ilave edildi ve pleyt 600-700 rpm'de orbital çalkalayıcıda 5 dakika boyunca inkübe edildi. Bu adım hücreleri lize eder ve ATP'yi stabilize eder. Kuyucukların her birine 50 µL substrat solüsyonu ilave edildi ve tekrar pleyt 600-700 rpm'de orbital çalkalayıcıda 5 dakika boyunca inkübe edildi ve daha sonra karanlık bir ortamda 10 dakika daha inkübe edildikten sonra lüminesans Elisa okuyucusunda (Synergy H1, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA) okutuldu.

Elde edilen absorbans değerlerinden ATP konsantrasyonu aşağıdaki formül ile hesaplandı.

$$\text{Konsantrasyon} = (B/V)*D$$

**B** = Örnek eğrisindeki standart eğriden (µM) hesaplanan ATP miktarı

**V** = Numune kuyucuklarına eklenen numune hacmi (µL)

**D** = Örnek dilüsyon faktörü

Bu test kiti toplam ATP seviyesini belirlemek için ATP ve lusiferini, oksilusiferin ve ışığa dönüştürmek için ateşböceği lusiferaz kullanmaktadır. Bu reaksiyonda yayılan ışık mevcut ATP konsantrasyonuyla doğrudan orantılıdır. Bu kit, lizis adımı sırasında ATPazları etkisiz hale getirir ve elde edilen ışıklı sinyalin sadece hücrel ATP seviyelerine karşılık gelmesini sağlar.

## **2.6. Mitokondriyal Kompleks I Ölçümü**

Ratların karaciğer, kas (gastroknemius kası), kalp, böbrek ve beyin dokularından mitokondri izolasyon kiti (Mitochondria Isolation Kit Sigma MITOISO1) kullanılarak mitokondriler izole edildi ve Bradford protein analiz yöntemiyle izolasyon teyit edildi. Daha sonra izole edilen mitokondrilerde, mitokondriyal kompleks enzimlerinden NAD dehidrogenaz (kompleks I) aktivitesi Elisa okuyucusuyla (MWGt Lambda Scan 200, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA) ticari mitokondriyal kompleks I aktivite kiti (MitoCheck Complex I Activity Assay Kit Cayman 700930) kullanılarak belirlendi.

### **2.6.1. Yumuşak dokulardan mitokondrilerin izole edilmesi (karaciğer, böbrek ve beyin)**

Alınan doku örneği ekstraksiyon tamponu A ile iki kez yıkandı. Daha sonra doku (60-70 mg) bir ependorf tüpünde tartıldı. Doku cam homojenizatöre alınarak üzerine 10 katı hacminde 2 mg/ml albümin içeren ekstraksiyon tamponu A ilave edildi ve homojenize edildi. Numune 2 mL'lik yeni bir ependorf tüpüne aktarıldı ve 5 dakika  $600 \times g$ 'de santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant yeni bir ependorfa aktarıldı ve 10 dakika boyunca  $11.000 \times g$ 'de santrifüj edildi. Bu işlemden sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve elde edilen pelet tartıldı. Peletin üzerine 10 katı hacminde ekstraksiyon tamponu A ilave edildi ve tekrar 5 dakika boyunca  $600 \times g$ 'de santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant yeni bir ependorfa aktarıldı ve 10 dakika  $11.000 \times g$ 'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve elde edilen pelet tekrar tartıldı ve peletin üzerine 100 mg'a 40 mL olacak şekilde saklama tamponu ilave edildi ve pipetaj yapılarak pelet çözdürüldü. Elde edilen örnek, protein konsantrasyonunu belirlemek için Bradford protein analiz yöntemi ile analiz edildi. Beklenen konsantrasyon yaklaşık 10-25 mg/ml olmalıdır.

### **2.6.2. Sert dokulardan mitokondrilerin izole edilmesi (iskelet ve kalp kası)**

Alınan doku örneği ekstraksiyon tamponu (kalp kası için ekstraksiyon tamponu A ve iskelet kası için ekstraksiyon tamponu B kullanıldı) ile iki kez yıkandı. Daha sonra doku (60-70 mg) bir ependorf tüpünde tartıldı ve üzerine dokunun 10 katı hacminde 0.25 mg/ml tripsin içeren uygun ekstraksiyon tamponu ilave edildi. Numune kırık buz içerisinde 3 dakika boyunca inkübe edildi ve mini santrifüj kullanılarak doku birkaç saniye santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant yeni bir ependorf tüpüne alındı ve üzerine 8 katı hacminde 0,25 mg/ml tripsin içeren uygun ekstraksiyon tamponu ilave edildi ve kırık buz içerisinde 20 dakika boyunca inkübe edildi. Proteolitik reaksiyonu gidermek için 10 mg/ml'lik albümin solüsyonu ilave edildi ve mini santrifüj kullanılarak doku birkaç saniye santrifüj edildi. Bu işlemde sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve elde edilen pelet tartıldı. Peletin üzerine 8 katı hacminde ekstraksiyon tamponu ilave edildi ve cam homojenizatör kullanılarak homojenizasyon işlemi gerçekleştirildi. Homojenize olan numune 5 dakika boyunca  $600 \times g$ 'de santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant yeni bir ependorfa aktarıldı ve 10 dakika boyunca  $11.000 \times g$ 'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve elde edilen pelet tekrar tartıldı ve peletin üzerine 100 mg'a 40 mL olacak şekilde saklama tamponu ilave edildi ve pelet pipetaj yapılarak çözdürüldü. Elde edilen örnek, protein konsantrasyonunu belirlemek için Bradford protein analiz yöntemi ile analiz edildi. Beklenen konsantrasyon yaklaşık 10-25 mg/ml olmalıdır.

### **2.6.3. Bradford Yöntemi ile Protein Analizi**

Bu analiz yönteminde organik boya maddesi olan Commassie brilliant blue G-250'nin proteindeki renklendirme özelliğinden faydalanılmaktadır. Commassie brilliant blue G-250 negatif yüklüdür ve proteinlerdeki pozitif yüklü gruplara bağlanır. Boya kırmızı renktedir ve proteine bağlanınca mavi renk oluşur. Reaksiyon tekrarlanabilir ve hızlıdır. İki dakika içinde renk oluşur ve bir saat kadar stabil kalabilir.

#### **Commassie Brilant Blue G-250 çözeltisinin hazırlanması:**

100 mg Commassie Brilant Blue G-250, 50 mL % 95'lik etanolde çözdürüldü. Üzerine 100 mL % 85'lik fosforik asit ilave edildi ve filtre kağıdı ile süzülerek distile su ile 1L'ye tamamlandı.

### Stok ve standart protein çözeltilerinin hazırlanması:

Sığır serum albümini (BSA), 0,15 M'lık NaCl çözeltisi ile 100 mg/mL olacak şekilde çözdürüldü. Bu stok çözelti kullanılarak Tablo 2.2.'de gösterildiği gibi standart çözeltiler hazırlandı.

**Tablo 2.2.** Standart protein çözeltilerinin hazırlanışı

BSA Stok Çözelti (µl)	0,15 M'lık NaCl (µl)	Standart (mg/ mL)
1000	0	100
800	200	80
600	400	60
400	600	40
200	800	20
100	900	10
50	950	5
0	1000	0

Yukarıda hazırlanan standart çözeltilerden ve izole edilen mitokondri örneklerinden 100 µl alınarak üzerlerine 100 µl Commassie Brilliant Blue G-250 çözeltisi ilave edildi ve spektrofotometrik okuyucuda 595 nm dalga boyunda absorbans değerleri okutuldu.

Yapılan mitokondri izolasyonu, Bradford protein analiz yöntemi ile teyit edildikten sonra izole edilen mitokondri örneklerinde mitokondriyal kompleks enzimlerinden NAD dehidrogenaz (kompleks I) aktivitesini belirlemek için ticari mitokondriyal kompleks I aktivite kiti kullanılarak prosedüre uygun şekilde Elisa pleytinde her kuyucuğa 50 µl tampon çözelti A konuldu. Üzerine izole mitokondri solüsyonundan 20 µl ilave edildi ve 30 dakika oda ısısında inkubasyona bırakıldı. Daha sonra her bir kuyucuğa 30 µl tampon çözelti B eklendi ve hızlı bir şekilde spektrofotometrik okuyucuda 340 nm'de 15 dakika boyunca 30 saniye aralıklarla absorbans değerleri okutuldu. Elde edilen absorbans değerlerinden aşağıdaki formül kullanılarak kompleks I aktivitesi % olarak hesaplandı.

$$\text{Kompleks I Aktivitesi (\%)} = (\text{Absorbans değeri} / \text{Grup içi ortalama absorbans değeri}) \times 100$$

NAD dehidrogenaz (kompleks I), mitokondriyal ETZ'ye elektronun girdiği ana bölgelerden biridir. Kompleks I, NADH'nin 2 elektron oksidasyonunu ve bunu takiben ubikinol (QH<sub>2</sub>) oluşturmak için ubikinonun (Q) azaltılmasını ve sonunda terminal elektron alıcısı O<sub>2</sub>'nin azalmasını katalize eder. Elektronların NADH'den Q'ya geçişi sırasında, dört protonun (H<sup>+</sup>) mitokondriyal matriksten intermembran boşluğa translokasyonu gerçekteşir, bu da oksidatif fosforilasyon için gerekli olan kemiyomotik proton gradyanına katkıda bulunur. Kompleks I'in inhibisyonu, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve ROS üretiminin artmasına neden olur. Bu kit, kompleks I üzerindeki doğrudan inhibitör etkilerin kolayca gözlenebileceği şekildedir. NADH oksidasyon hızı, 340 nm'de absorbanstaki bir azalma ile ölçülür ve kompleks I'in aktivitesiyle orantılıdır.



## 2.7. İstatistik Analiz

Tüm veriler ortalama  $\pm$  SD (standart sapma) olarak sunuldu. Doku ATP düzeyleri ve mitokondriyal kompleks I enzim aktivitesindeki grup farklılıklarını değerlendirmek için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Doku ATP ve mitokondriyal kompleks I seviyeleri kontrol ve diğer gruplar veya atorvastatin grubu ve diğer gruplar arasında karşılaştırıldı. İstatistiksel analiz için SPSS 22.0 programı (IBM Corp, Armonk, NY) kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık  $P < 0,05$  olarak verildi.



### 3. BULGULAR

ALA ve vit E'nin, atorvastatin uygulanmış ratların karaciğer, kas (gastroknemius), kalp, böbrek ve beyin dokularında ATP seviyesi ve mitokondriyal kompleks I aktivitesi üzerindeki etkileri sırasıyla Tablo 3.1. ve Tablo 3.2.'de sunuldu. Atorvastatin, kontrol grubuna kıyasla kalp ve böbrekte ATP seviyesinde azalmaya neden olurken ( $P<0,05$ ), karaciğer, kas ve beyinde istatistiki açıdan önemli bir azalma olmamıştır ( $P>0,05$ ). Atorvastatin tüm dokulardaki kompleks I aktivitesini istatistiki açıdan önemli olmayan bir şekilde azaltmıştır ( $P>0,05$ ).

ALA uygulaması karaciğer, kalp ve böbrekteki ATP düzeylerini önemli ölçüde iyileştirirken, Vit E uygulaması ise Atorvastatin grubuna kıyasla kas dışında tüm dokulardaki ATP düzeylerini iyileştirmiştir ( $P<0,05$ ). Hem ALA hem de vit E'nin tek başına uygulanması, Atorvastatin grubuna kıyasla kas, kalp, böbrek ve beyindeki kompleks I aktivitesini iyileştirmiştir ( $P<0,05$ ). ALA ve Vit E kombinasyonunun uygulanması Atorvastatin grubuna kıyasla karaciğer, kalp, böbrek ve beyindeki ATP seviyelerini önemli ölçüde iyileştirirken, tüm dokulardaki kompleks I aktivitesini de önemli ölçüde iyileştirmiştir ( $P<0,05$ ). Bu çalışmada atorvastatinin mitokondriyal fonksiyonlar üzerindeki istenmeyen etkileri, tek başına ve kombinasyon halinde ALA ve / veya Vit E kullanılarak iyileştirilmiştir.

**Tablo 3.1.** Alfa lipoik asit (100 mg/kg) ve E vitamininin (100 mg/kg), Atorvastatin (10 mg/kg) uygulanmış ratların çeşitli dokularında ATP üzerindeki etkileri (mean  $\pm$  SD)\*

Grup	Karaciğer	Kas	Kalp	Böbrek	Beyin
K (n=6)	0,0293 $\pm$ 0,0372 <sup>d</sup>	4.9224 $\pm$ 0.3846 <sup>a</sup>	2.7270 $\pm$ 0.5829 <sup>b</sup>	0,0206 $\pm$ 0,0096 <sup>c</sup>	0.7047 $\pm$ 0.1714 <sup>c</sup>
A (n=8)	0,0172 $\pm$ 0,0178 <sup>d</sup>	4.7252 $\pm$ 0.3846 <sup>a</sup>	2.4238 $\pm$ 0.3683 <sup>c</sup>	0,0085 $\pm$ 0,0096 <sup>d</sup>	0.6493 $\pm$ 0,0366 <sup>c</sup>
A+ALA (n=8)	0.3228 $\pm$ 0.1240 <sup>a</sup>	5.3519 $\pm$ 0.9384 <sup>a</sup>	4.5044 $\pm$ 0.4847 <sup>a</sup>	0.2500 $\pm$ 0.1268 <sup>b</sup>	0.8438 $\pm$ 0.2947 <sup>bc</sup>
A+Vit E (n=8)	0.1001 $\pm$ 0,0374 <sup>c</sup>	5.4006 $\pm$ 0.3469 <sup>a</sup>	3.2661 $\pm$ 1.0230 <sup>b</sup>	0.4128 $\pm$ 0,0606 <sup>a</sup>	1.1019 $\pm$ 0.1909 <sup>ab</sup>
A+ALA+Vit E (n=8)	0.2002 $\pm$ 0,0968 <sup>b</sup>	5.0549 $\pm$ 1.0800 <sup>a</sup>	0.3243 $\pm$ 0.1633 <sup>b</sup>	0.3243 $\pm$ 0.1633 <sup>ab</sup>	1.7431 $\pm$ 0.8190 <sup>a</sup>

\* Değerler nM olarak sunulmuştur.

<sup>a,b,c</sup>: Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlıdır (P<0,05).

K: kontrol, A: atorvastatin, A+ALA: atorvastatin + alfa lipoik asit, A+Vit E: atorvastatin + vitamin E, A+ALA+Vit E: atorvastatin + alfa lipoik asit + vitamin E.

**Tablo 3.2.** Alfa lipoik asit (100 mg/kg) ve E vitamininin (100 mg/kg), Atorvastatin (10 mg/kg) uygulanan ratların çeşitli dokularındaki mitokondriyal kompleks I (NAD dehidrogenaz) üzerindeki etkileri (mean  $\pm$  SD)\*

Grup	Karaciğer	Kas	Kalp	Böbrek	Beyin
K (n=6)	100 $\pm$ 34 <sup>b</sup>	99 $\pm$ 14 <sup>b</sup>	99 $\pm$ 55 <sup>ab</sup>	100 $\pm$ 22 <sup>bc</sup>	100 $\pm$ 21 <sup>b</sup>
A (n=8)	89 $\pm$ 13 <sup>bc</sup>	93 $\pm$ 6 <sup>b</sup>	91 $\pm$ 10 <sup>b</sup>	94 $\pm$ 13 <sup>c</sup>	94 $\pm$ 19 <sup>b</sup>
A+ALA (n=8)	124 $\pm$ 11 <sup>ab</sup>	136 $\pm$ 20 <sup>a</sup>	136 $\pm$ 15 <sup>a</sup>	123 $\pm$ 21 <sup>ab</sup>	138 $\pm$ 13 <sup>a</sup>
A+Vit E (n=8)	127 $\pm$ 12 <sup>ab</sup>	138 $\pm$ 13 <sup>a</sup>	130 $\pm$ 16 <sup>a</sup>	125 $\pm$ 7 <sup>a</sup>	144 $\pm$ 16 <sup>a</sup>
A+ALA+Vit E (n=8)	131 $\pm$ 9 <sup>a</sup>	134 $\pm$ 11 <sup>a</sup>	128 $\pm$ 6 <sup>a</sup>	136 $\pm$ 23 <sup>ab</sup>	152 $\pm$ 23 <sup>a</sup>

\* Değerler % aktivite olarak sunulmuştur.

<sup>a,b,c</sup>: Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlıdır (P<0,05).

K: kontrol, A: atorvastatin, A+ALA: atorvastatin + alfa lipoik asit, A+Vit E: atorvastatin + vitamin E, A+ALA+Vit E: atorvastatin + alfa lipoik asit + vitamin E.

#### 4. TARTIŞMA

Diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar gibi bazı hastalıkların tedavisinde uzun süreli ilaç kullanımı gerekmektedir. Ancak kronik ilaç kullanımı ilaçların yan etki insidansını da arttırmaktadır. Uzun süreli ilaç kullanımı vakalarında, olumsuz ilaç etkilerini azaltmak için stratejiler geliştirilmektedir. Statinlerin hiperkolesterolemi ve kardiyovasküler hastalıkları önlemek için uzun süreli kullanımı, kas, karaciğer ve beyin gibi dokular ve organlar üzerinde mitokondriyal disfonksiyon tabanlı yan etkilere sahiptir. Bu çalışmada ALA, vit E ve bunların kombinasyonlarının atorvastatine bağlı mitokondriyal disfonksiyon üzerindeki etkileri ATP ve kompleks I biyobelirteçleri ile belirlenmiştir.

Bu çalışmada atorvastatin, kalp ve böbrekteki ATP düzeylerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalmaya neden olmuştur ( $P < 0,05$ ); ancak karaciğer, kas ve beyindeki ATP düzeyleri ile ölçüm yapılan tüm dokulardaki kompleks I enzim aktivitesinde önemli değişikliklere neden olmamıştır. ALA, vit E ve bunların kombinasyonları, kas hariç tüm dokularda ATP seviyelerinde atorvastatin kaynaklı azalmaları önlemiştir. Bu maddelerin her birinin karaciğer hariç tüm dokularda atorvastatinin neden olduğu kompleks I aktivitesindeki azalmaları önlediği ayrıca bu maddelerin kombine kullanımı da karaciğerin kompleks I aktivitesini iyileştirdiği ortaya konulmuştur.

Bizim çalışmamızın bulgularına benzer şekilde, 15 günlük seriovastatinin (0.1, 0.5 ve 1.0 mg/kg/gün) ratlara uygulanmasının 5. ve 10. günlerinde mitokondriyal fonksiyon biyobelirteçlerinde (mitokondriyal membran potansiyeli, ATP sentezi, sitokrom c oksidaz ve sitrat sentaz aktivitesi ve mitokondriyal solunum fonksiyonları) istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmadığı ancak dozun 15. gününde istatistiksel olarak anlamlı olmayan zayıf değişiklikler olduğu bildirilmiştir (Schaefer ve ark 2004). Mohammadi-Bardbori ve ark. (2015)'nin yaptıkları çalışmada bulgularımızın aksine, simvastatin (30 mg/kg/bw/gün) ve atorvastatinin (30 mg/kg/bw/gün) ratlarda karaciğer mitokondrilerinde bazı mitokondriyal disfonksiyon biyobelirteçlerini (kompleks II aktivitesi, ATP seviyesi, mitokondriyal membran potansiyeli ve mitokondriyal permeabilite transisyon porları) önemli ölçüde değiştirdiği bulunmuştur. Söz konusu çalışmanın bulguları ile çalışmamız

arasındaki fark, dozaj rejimindeki farklılıklar (doz ve uygulama süresi) ve ölçülen parametrelerin ilaçlara duyarlılığından kaynaklanabilir.

Rat iskelet kas hücre kültürlerinde (L6 hücreleri) statinlerin toksisitesinin incelendiği bir çalışmada, serivastatin, fluvastatin, atorvastatin, simvastatin ve pravastatin (100 µmol/l) uygulanmıştır. Çalışma sonunda serivastatin, fluvastatin ve atorvastatinin mitokondriyal membran potansiyelini % 49-65 oranında azaltırken diğer ikisinin azaltmadığı belirlenmiştir. Ayrıca lipofilik statinlerin mitokondriyal şişme, sitokrom c salınımı ve DNA fragmantasyonuna neden olduğu ve sonuçta lipofilik statinlerin iskelet kası mitokondri fonksiyonları üzerinde hidrofiliklerden (pravastatinin) daha toksik olduğu ortaya konmuştur (Kaufmann ve ark 2006).

Günümüze kadar, ilaçların ve çeşitli kimyasalların neden olduğu mitokondriyal disfonksiyonu iyileştirmek ve mitokondriyal disfonksiyonun neden olduğu öngörülen hastalıklara karşı kullanılabilecek maddeleri tanımlamak için farklı organizmaların farklı doku ve organları üzerinde birçok in vitro ve in vivo çalışma yürütülmüştür. Bahsedilen çalışmalar farklı hücre dizileri ve farklı organizmaların organları üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda araştırılan maddelerin etkinliği çalışmamızda olduğu gibi mitokondriyal disfonksiyon biyomarkırları üzerinden değerlendirilmiştir.

Mevcut çalışmada atorvastatin ile indüklenen karaciğer mitokondri ATP seviyesindeki azalma, Vit E ve ALA'nın ayrı ve kombine uygulanmasıyla iyileştirilirken, karaciğer mitokondrisinde kompleks I aktivitesindeki azalma, sadece bu maddelerin birlikte uygulanmasıyla iyileştirildi. Mohammadi-Bardbori ve ark (2015) ratlara koenzim Q10'nun (Co-Q10) simvastatin (30 mg/kg/bw/gün) ve atorvastatin (30 mg/kg/bw/gün) ile 30 gün süreyle eşzamanlı uygulanmasının belirtilen ilaçların karaciğer mitokondrisinde kompleks II aktivitesi, ATP seviyeleri, mitokondriyal membran potansiyeli ve mitokondriyal permeabilite transisyon porlarında neden olduğu değişiklikleri düzelttiğini tespit etmişlerdir.

Yapılan bir çalışmada ratlara günde bir defa ALA (100 mg/kg, İ.P.) uygulanmış ve lipid peroksidasyon seviyeleri, okside glutasyon, enzimatik olmayan antioksidanlar ve mitokondriyal enzimlerin aktiviteleri lipoik asit uygulaması öncesi ve sonrasında genç ve yaşlı ratların karaciğer ve böbrek mitokondrilerinde

ölçülmüştür. Hem karaciğerde hem de böbreklerde mitokondriyal lipid peroksidasyon ve okside glutasyon seviyelerinde artış ve yaşlı ratlarda antioksidanların ve mitokondriyal enzimlerin aktivitelerinde azalma gözlenmiştir. Lipoik asit uygulamasının mitokondriyal enzimlerdeki yaşa bağlı düşüşü tersine çevirdiği ve antioksidan durumun aktivitelerini arttırdığı ve böylece mitokondriyi yaşlanmaya karşı koruduğu ortaya konmuştur (Arivazhagan ve ark 2001).

Palaniappan ve Dai (2007) yaşlı ratların beyinlerinde, 30 gün süreyle ALA (100 mg/kg, İ.P.) uygulamasının artan lipid peroksidasyonu ve okside glutasyon seviyelerini azalttığını ve ATP, TCA döngüsü enzimleri ve ETZ kompleksi aktivitelerini arttırdığını ortaya koymuşlardır.

Yaşlı ratların 2 hafta süreyle ALA (% 0.5, w/w) takviyeli diyetle beslenmesinin, karaciğer parankimal hücre mitokondrilerinde membran potansiyelini arttırdığı, mitokondriyal fonksiyonlarda iyileşme sağladığı, oksidatif hasarı azalttığı ve metabolik hızı arttırdığı belirlenmiştir (Hagen ve ark 1999).

LPS kaynaklı hipotermi oluşturulan farelere, ALA (LPS uygulamasından 30 dakika önce ve sonra tek uygulama, 40 mg/kg, İ.P.) uygulaması sepsis sırasında inhibe edilen mitokondriyal enzimlerin aktivitelerini arttırarak ve enzimleri nitrik oksit hasarından koruyarak hipotermiyi hafiflettiği bildirilmektedir (Hiller ve ark 2014).

ALA'nın karaciğer üzerindeki koruyucu etkisini belirlemek için farelerde yapılan bir çalışmada, karaciğer mitokondrilerinde ATP ve NADH seviyeleri, mtDNA ekspresyon seviyeleri ve kompleks I, IV ve V aktiviteleri ölçülmüş ve ALA (100 mg/kg, İ.P., 5 gün) ile tedavi edilen grupta bu parametrelerde artış olduğu ortaya konulmuştur (Liu ve ark 2015).

Kheir-Eldin ve ark (2001) tarafından yapılan çalışmada rat beyin mitokondrilerinde LPS'nin neden olduğu ATP/ADP oranındaki azalmanın ve mitokondri/sitosolik heksokinaz oranındaki artışın vit E, beta karoten, selenyum ve N-asetilsisteinin LPS'den önce uygulanması ile iyileştirildiği ve en etkilisinin Vit E ile selenyumun birlikte kullanılmasının olduğu bildirilmektedir.

Rat karaciğeri mitokondrilerinde metanol ve etiyoninin (metiyonin analogu) neden olduğu hasarın (NADH dehidrojenaz, süksinat sitokrom c redüktaz, sitokrom oksidaz aktivitesi ve ATP seviyesinde azalma), vit E'nin 20-28 gün süreyle oral yoldan uygulanmasıyla iyileştirildiği ortaya konulmuştur (Padma ve Setty 1997, El-Sayed ve ark 2002). Bizim çalışmamızda ise vit E'nin karaciğer mitokondrilerinde atorvastatinin yaptığı ATP azalmasını düzeltirken, tek başına kompleks I aktivitesindeki azalmayı iyileştirmediğini, ancak ALA ile kombinasyonunun kompleks I aktivitesindeki azalmayı iyileştirdiği bulundu.

Çalışma sonuçlarımızla uyumlu olarak, Zhou ve ark (2018) ratlarda 6-hidroksidopaminle indüklenen parkinson hayvan modelinde alfa lipoamidin (lipoik asidin nötr amid türevi) beyin ATP seviyesini arttırdığı ve sinir hücrelerindeki mitokondri morfolojisini iyileştirdiğini bildirmişlerdir. Farelerde endosulfonla eş zamanlı uygulanan vit E'nin endosulfonun neden olduğu testis dokusundaki ATP azalışı ve spermatogenik hücre morfolojisindeki değişimi önlediği belirlenmiştir (Wang ve ark 2012). Benzer şekilde ratlara gossipolle eşzamanlı uygulanan vit E, testis hücre mitokondrilerindeki gossipolün neden olduğu azalmayı düzeltmiştir (Santana ve ark 2015).

Bu alanda çeşitli hücre kültürleriyle yapılan in vitro çalışmalarda ALA, vit E, melatonin ve ginsenosidin, amiloid beta, S-nitrosilasyon, akrilamid ve tunikamisin ile oluşturulan mitokondri disfonksiyonlarını (mitokondri membran potansiyali, ATP seviyesi, sitokrom c oksidaz aktivitesi) düzelttiği ortaya konmuştur (Cardoso ve ark 2001, Huang ve ark 2012, Hiller ve ark 2016, Lei ve ark 2016, Song ve ark 2017).

## **5. SONUÇ ve ÖNERİLER**

Sonuç olarak, i) statinlerin mitokondri üzerindeki etkilerinin organlara göre değiştiği (kalp ve böbrek; karaciğer, kas ve beyinden daha duyarlı), ii) ATP seviyesinin mitokondriyal disfonksiyon için kompleks I aktivitesinden daha hassas bir biyobelirteç olabileceği ve iii) ALA ve vit E'nin tek başlarına ve kombine halde, statinler gibi mitokondriyal disfonksiyona neden olan ve uzun süreli kullanılan ilaçların yan etkilerini azaltmak için eş zamanlı olarak kullanılabilmesi öngörülmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- Abdoli N, Heidari R, Azarmi Y, Eghbal MA, 2013. Mechanisms of the statins cytotoxicity in freshly isolated rat hepatocytes. *J Biochem Mol Toxicol*, 27, 6, 287-94.
- Alberts B, Dennis B, Lewis J, (1994). *Molecular biology of the cell*. New York: Garland-Puglisshing, Inc.
- Álvarez-Delgado C, Mendoza-Rodríguez CA, Picazo O, Cerbón M, 2010. Different expression of  $\alpha$  and  $\beta$  mitochondrial estrogen receptors in the aging rat brain: Interaction with respiratory complex V. *Exp Gerontol*, 45, 7, 580-5.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290, 5806, 457.
- Arivazhagan P, Ramanathan K, Panneerselvam C, 2001. Effect of DL- $\alpha$ -lipoic acid on mitochondrial enzymes in aged rats. *Chem Biol Interact*, 138, 2, 189-98.
- Arnaud C, Burger F, Steffens S, Veillard NR, Nguyen TH, Trono D, Mach F, 2005. Statins reduce interleukin-6-induced C-reactive protein in human hepatocytes: new evidence for direct antiinflammatory effects of statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25, 6, 1231-6.
- Balaban RS, Nemoto S, Finkel T, 2005. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, 120, 4, 483-95.
- Beckman JA, Creager MA, Libby P, 2002. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Jama*, 287, 19, 2570-81.
- Bellosta S, Bernini F, Paoletti R, Corsini A, 2000. Non-lipid-related effects of statins. *Ann Med*, 32, 3, 164-76.
- Bitar MS, Ayed AK, Abdel-Halim SM, Isenovic ER, Al-Mulla F, 2010. Inflammation and apoptosis in aortic tissues of aged type II diabetes: amelioration with  $\alpha$ -lipoic acid through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent mechanism. *Life sci*, 86, 23, 844-53.
- Bonetti P, Lerman LO, Napoli C, Lerman A, 2003. Statin effects beyond lipid lowering—are they clinically relevant? *Eur heart j*, 24, 3, 225-48.
- Boutbir J, Charles A-L, Echaniz-Laguna A, Kindo M, Daussin F, Auwerx J, Piquard F, Geny B, Zoll J, 2011. Opposite effects of statins on mitochondria of cardiac and skeletal muscles: a 'mitohormesis' mechanism involving reactive oxygen species and PGC-1. *Eur heart j*, 33, 11, 1397-407.
- Brand MD, Nicholls DG, 2011. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J*, 435, 2, 297-312.
- Budin SB, Othman F, Louis SR, Bakar MA, Das S, Mohamed J, 2009. The effects of palm oil tocotrienol-rich fraction supplementation on biochemical parameters, oxidative stress and the vascular wall of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clinics*, 64, 3, 235-44.
- Burton G, Joyce A, Ingold K, 1982. First proof that vitamin E is major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma. *Lancet*, 320, 8293, 327.
- Burton GW, Joyce A, Ingold KU, 1983. Is vitamin E the only lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes? *Arch Biochem Biophys*, 221, 1, 281-90.
- Cardoso SM, Santos S, Swerdlow RH, Oliveira CR, 2001. Functional mitochondria are required for amyloid  $\beta$ -mediated neurotoxicity. *FASEB J*, 15, 8, 1439-41.
- Carreau J, 1979. Biosynthesis of lipoic acid via unsaturated fatty acids [Rats]. *Method Enzymol (USA)*.
- Che R, Yuan Y, Huang S, Zhang A, 2014. Mitochondrial dysfunction in the pathophysiology of renal diseases. *Am J Physiol Renal Physiol*, 306, 4, F367-78.

- Cheeseman K, Collins M, Proudfoot K, Slater T, Burton G, Webb A, Ingold K, 1986. Studies on lipid peroxidation in normal and tumour tissues. The Novikoff rat liver tumour. *Biochem J*, 235, 2, 507-14.
- Cheeseman KH, Burton GW, Ingold KU, Slater TF, 1984. Lipid peroxidation and lipid antioxidants in normal and tumor cells. *Toxicol Pathol*, 12, 3, 235-9.
- Chida J, Yamane K, Takei T, Kido H, 2012. An efficient extraction method for quantitation of adenosine triphosphate in mammalian tissues and cells. *Anal Chim Acta*, 727, 8-12.
- Chipuk J, Bouchier-Hayes L, Green D, 2006. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death Differ*, 13, 8, 1396-402.
- Clavreul N, Bachschmid MM, Hou X, Shi C, Idrizovic A, Ido Y, Pimentel D, Cohen RA, 2006. S-glutathiolation of p21ras by peroxynitrite mediates endothelial insulin resistance caused by oxidized low-density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26, 11, 2454-61.
- Coppey LJ, Gallett JS, Davidson EP, Dunlap JA, Lund DD, Yorek MA, 2001. Effect of antioxidant treatment of streptozotocin-induced diabetic rats on endoneurial blood flow, motor nerve conduction velocity, and vascular reactivity of epineurial arterioles of the sciatic nerve. *Diabetes*, 50, 8, 1927-37.
- Cremer D, Rabeler R, Roberts A, Lynch B, 2006. Safety evaluation of  $\alpha$ -lipoic acid (ALA). *Regul Toxicol Pharmacol*, 46, 1, 29-41.
- Data P, 1995. Alpha-lipoic acid. *Arzneimittelforschung*, 45, 872-4.
- Deichmann R, Lavie C, Andrews S, 2010. Coenzyme q10 and statin-induced mitochondrial dysfunction. *Ochsner J*, 10, 1, 16-21.
- Desai CS, Martin SS, Blumenthal RS, 2014. Non-cardiovascular effects associated with statins. *Bmj*, 349, g3743, 1-10.
- Dirks AJ, Jones KM, 2006. Statin-induced apoptosis and skeletal myopathy. *Am J Physiol Cell Physiol*, 291, 6, C1208-C12.
- Dudkina NV, Kouril R, Peters K, Braun HP, Boekema EJ, 2010. Structure and function of mitochondrial supercomplexes. *Biochim Biophys Acta*, 1797, 6-7, 664-70.
- Eason R, Archer H, Akhtar S, Bailey C, 2002. Lipoic acid increases glucose uptake by skeletal muscles of obese-diabetic ob/ob mice. *Diabetes Obes Metab*, 4, 1, 29-35.
- Echaniz-Laguna A, Mohr M, Tranchant C, 2010. Neuromuscular symptoms and elevated creatine kinase after statin withdrawal. *N Engl J Med*, 362, 6, 564-5.
- Eirin A, Lerman A, Lerman LO, 2014. Mitochondrial injury and dysfunction in hypertension-induced cardiac damage. *Eur Heart J*, 35, 46, 3258-66.
- El-Sayed NK, Gaafar KM, El-Ansary AK, Osman AI, 2002. The protective potency of vitamins E and C in methanol-induced oxidative stress and retinotoxicity. *J Toxicol Cutaneous Ocul Toxicol*, 21, 4, 307-27.
- Esterbauer H, Dieber-Rotheneder M, Striegl G, Waeg G, 1991. Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein. *Am J Clin Nutr*, 53, 1, 314S-21S.
- Frye RE, Rossignol DA, 2011. Mitochondrial dysfunction can connect the diverse medical symptoms associated with autism spectrum disorders. *Pediatr Res*, 69, 5 Pt 2, 41R-7R.
- Fuchs J, 1997. Lipoic acid in health and disease, CRC Press, p.
- Futterman LG, Lemberg L, 2004. Statin pleiotropy: fact or fiction? *Am J Crit Care*, 13, 3, 244-9.
- Galtier F, Mura T, de Mauverger ER, Chevassus H, Farret A, Gagnol J-P, Costa F, Dupuy A, Petit P, Cristol J, 2012. Effect of a high dose of simvastatin on muscle mitochondrial metabolism and calcium signaling in healthy volunteers. *Toxicol Appl Pharm*, 263, 3, 281-6.
- Ghibu S, Richard C, Vergely C, Zeller M, Cottin Y, Rochette L, 2009. Antioxidant properties of an endogenous thiol: alpha-lipoic acid, useful in the prevention of cardiovascular diseases. *J Cardiovasc Pharm*, 54, 5, 391-8.

- Giordano N, Senesi M, Mattii G, Battisti E, Villanova M, Gennari C, 1997. Polymyositis associated with simvastatin. *Lancet*, 349, 9065, 1600-1.
- Gleiter C, Schug B, Hermann R, Elze M, Blume H, Gundert-Remy U, 1996. Influence of food intake on the bioavailability of thioctic acid enantiomers. *Eur J Clin Pharmacol*, 50, 6, 513-4.
- Golomb BA, Evans MA, 2008. Statin adverse effects. *Am J Cardiovasc Drug*, 8, 6, 373-418.
- Goraça A, Huk-Kolega H, Piechota A, Kleniewska P, Ciejka E, Skibska B, 2011. Lipoic acid–biological activity and therapeutic potential. *Pharmacol Rep*, 63, 4, 849-58.
- Hagen TM, Ingersoll RT, Lykkesfeldt J, Liu J, Wehr CM, Vinarsky V, Bartholomew JC, AMES, N B, 1999. (R)- $\alpha$ -Lipoic acid-supplemented old rats have improved mitochondrial function, decreased oxidative damage, and increased metabolic rate. *FASEB J*, 13, 2, 411-8.
- Hiller S, DeKroon R, Hamlett ED, Xu L, Osorio C, Robinette J, Winnik W, Simington S, Maeda N, Alzate O, 2016. Alpha-lipoic acid supplementation protects enzymes from damage by nitrosative and oxidative stress. *Biochim Biophysica Acta-General Subjects*, 1860, 1, 36-45.
- Hiller S, DeKroon R, Xu L, Robinette J, Winnik W, Alzate O, Simington S, Maeda N, Yi X, 2014.  $\alpha$ -Lipoic acid protects mitochondrial enzymes and attenuates lipopolysaccharide-induced hypothermia in mice. *Free Radic Biol Med*, 71, 362-7.
- Huang T, Fang F, Chen L, Zhu Y, Zhang J, Chen X, Shidu Yan S, 2012. Ginsenoside Rg1 attenuates oligomeric A $\beta$ 1-42-induced mitochondrial dysfunction. *Curr Alzheimer Res*, 9, 3, 388-95.
- Jasińska M, Owczarek J, Orszulak-Michalak D, 2007. -Statins: A new insight into their mechanisms of action and consequent pleiotropic effects. *Pharmacol Rep*, 59, 5, 483.
- Kataoka H, 1998. Chromatographic analysis of lipoic acid and related compounds. *J Chromator B: Biomed Sci Appl*, 717, 1, 247-62.
- Katsetos CD, Koutzaki S, Melvin JJ, 2013. Mitochondrial dysfunction in neuromuscular disorders. *Semin Pediatr Neurol*, 20, 3, 202-15.
- Kaufmann P, Török M, Zahno A, Waldhauser K, Brecht K, Krähenbühl S, 2006. Toxicity of statins on rat skeletal muscle mitochondria. *Cell Mol Life Sci*, 63, 19, 2415-25.
- Kaufmann P, Török M, Zahno A, Waldhauser K, Brecht K, Krähenbühl S, 2006. Toxicity of statins on rat skeletal muscle mitochondria. *Cell Mol Life Sci*, 63, 19-20, 2415-25.
- Kheir-Eldin AA, Motawi TK, Gad MZ, Abd-ElGawad HM, 2001. Protective effect of vitamin E,  $\beta$ -carotene and N-acetylcysteine from the brain oxidative stress induced in rats by lipopolysaccharide. *Int J Biochem Cell Biol*, 33, 5, 475-82.
- Klinge CM, 2008. Estrogenic control of mitochondrial function and biogenesis. *J Cell Biochem*, 105, 6, 1342-51.
- Kubli DA, Gustafsson AB, 2012. Mitochondria and mitophagy: the yin and yang of cell death control. *Circ Res*, 111, 9, 1208-21.
- Kuhad A, Chopra K, 2009. Attenuation of diabetic nephropathy by tocotrienol: involvement of NF $\kappa$ B signaling pathway. *Life Sci*, 84, 9-10, 296-301.
- Lachman J, Hamouz K, Orsak M, Pivec V, 2000. Potato tubers as a significant source of antioxidants in human nutrition. *Rost Vyroba*, 46, 5, 231-6.
- Larsen S, Stride N, Hey-Mogensen M, Hansen CN, Bang LE, Bundgaard H, Nielsen LB, Helge JW, Dela F, 2013. Simvastatin effects on skeletal muscle: relation to decreased mitochondrial function and glucose intolerance. *J Am Coll Cardiol*, 61, 1, 44-53.
- Lei L, Zhu Y, Gao W, Du X, Zhang M, Peng Z, Fu S, Li X, Zhe W, Li X, 2016. Alpha-lipoic acid attenuates endoplasmic reticulum stress-induced insulin resistance by improving mitochondrial function in HepG2 cells. *Cell Signal*, 28, 10, 1441-50.
- Leonard J, Schapira AH, 2000. Mitochondrial respiratory chain disorders I: mitochondrial DNA defects. *Lancet*, 355, 9200, 299-304.
- Li X, May JM, 2003. Location and recycling of mitochondrial  $\alpha$ -tocopherol. *Mitochondrion*, 3, 1, 29-38.

- Liao JK, Laufs U, 2005. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 45, 89-118.
- Lim S, Cho YM, Park KS, Lee HK, 2010. Persistent organic pollutants, mitochondrial dysfunction, and metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci*, 1201, 166-76.
- Liu J, 2008. The effects and mechanisms of mitochondrial nutrient  $\alpha$ -lipoic acid on improving age-associated mitochondrial and cognitive dysfunction: an overview. *Neurochem Res*, 33, 1, 194-203.
- Liu Z, Guo J, Sun H, Huang Y, Zhao R, Yang X, 2015.  $\alpha$ -Lipoic acid attenuates LPS-induced liver injury by improving mitochondrial function in association with GR mitochondrial DNA occupancy. *Biochimie*, 116, 52-60.
- Matough FA, Budin SB, Hamid ZA, Abdul-Rahman M, Al-Wahaibi N, Mohammed J, 2014. Tocotrienol-rich fraction from palm oil prevents oxidative damage in diabetic rats. *Sultan Qaboos Univ Med J*, 14, 1, e95.
- Miadokova E, Vlckova V, Duhova V, 2000. Antimutagenic effect of  $\alpha$ -lipoic acid on three model test systems. *Pharmazie*, 55, 11, 862-3.
- Mijnhout G, Alkhalaf A, Kleefstra N, Bilo H, 2010. Alpha lipoic acid: a new treatment for neuropathic pain in patients with diabetes. *Neth J Med*, 68, 4, 158-62.
- Miller RJ, 1998. Mitochondria—the Kraken wakes! *Trends Neurosci*, 21, 3, 95-7.
- Mohammadi-Bardbori A, Najibi A, Amirzadegan N, Gharibi R, Dashti A, Omidi M, Saeedi A, Ghafarian-Bahreman A, Niknahad H, 2015. Coenzyme Q10 remarkably improves the bioenergetic function of rat liver mitochondria treated with statins. *Eur J Pharmacol*, 762, 270-4.
- Moini H, Packer L, Saris N-EL, 2002. Antioxidant and prooxidant activities of  $\alpha$ -lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Toxicol Appl Pharm*, 182, 1, 84-90.
- Montgomery MK, Turner N, 2015. Mitochondrial dysfunction and insulin resistance: an update. *Endocr Connect*, 4, 1, R1-R15.
- Naci H, Brughts J, Ades T, 2013. Comparative tolerability and harms of individual statins. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes, CIRCUITCOMES*. 111.000071.
- Nadanaciva S, Dykens JA, Bernal A, Capaldi RA, Will Y, 2007. Mitochondrial impairment by PPAR agonists and statins identified via immunocaptured OXPHOS complex activities and respiration. *Toxicol Appl Pharm*, 223, 3, 277-87.
- Navarro A, Boveris A, 2007. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292, 2, C670-C86.
- Navarro A, Gomez C, Sanchez-Pino MJ, Gonzalez H, Bandez MJ, Boveris AD, Boveris A, 2005. Vitamin E at high doses improves survival, neurological performance, and brain mitochondrial function in aging male mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 289, 5, R1392-9.
- Newaz M, Yousefipour Z, Nawal N, Adeeb N, 2003. Nitric oxide synthase activity in blood vessels of spontaneously hypertensive rats: antioxidant protection by gamma-tocotrienol. *J Physiol Pharmacol*, 54, 3, 319-27.
- Novotny L, Rauko P, Cojocel C, 2008.  $\alpha$ -Lipoic acid-the potential for use in cancer therapy Minireview. *Neoplasma (Bratislava)*, 55, 2, 81.
- Nunnari J, Suomalainen A, 2012. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*, 148, 6, 1145-59.
- Packer L, Witt EH, Tritschler HJ, 1995. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med*, 19, 2, 227-50.
- Padma P, Setty O, 1997. Protective effect of vitamin E against ethionine toxicity. *IUBMB Life*, 41, 4, 785-95.
- Pal S, Ghosh M, Ghosh S, Bhattacharyya S, Sil PC, 2015. Atorvastatin induced hepatic oxidative stress and apoptotic damage via MAPKs, mitochondria, calpain and caspase12 dependent pathways. *Food Chem Toxicol*, 83, 36-47.






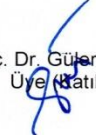


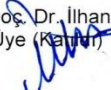

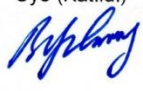
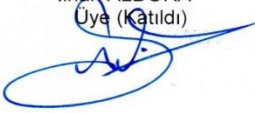
- Palaniappan A, Dai A, 2007. Mitochondrial ageing and the beneficial role of  $\alpha$ -lipoic acid. *Neurochem Res*, 32, 9, 1552-8.
- Paradies G, Petrosillo G, Paradies V, Ruggiero FM, 2011. Mitochondrial dysfunction in brain aging: role of oxidative stress and cardiolipin. *Neurochem Int*, 58, 4, 447-57.
- Parihar A, Parihar M, Zenebe W, Ghafourifar P, 2012. Statins lower calcium-induced oxidative stress in isolated mitochondria. *Hum Exp Toxicol*, 31, 4, 355-63.
- Park CB, Larsson NG, 2011. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *J Cell Biol*, 193, 5, 809-18.
- Pavón N, Martínez-Abundis E, Hernández L, Gallardo-Pérez JC, Alvarez-Delgado C, Cerbón M, Pérez-Torres I, Aranda A, Chávez E, 2012. Sexual hormones: Effects on cardiac and mitochondrial activity after ischemia-reperfusion in adult rats. Gender difference. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 132, 1, 135-46.
- Pellegrino MW, Nargund AM, Haynes CM, 2013. Signaling the mitochondrial unfolded protein response. *Biochim Biophys Acta*, 1833, 2, 410-6.
- Pieczenik SR, Neustadt J, 2007. Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease. *Exp Mol Pathol*, 83, 1, 84-92.
- Ray PD, Huang BW, Tsuji Y, 2012. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*, 24, 5, 981-90.
- Reed LJ, DeBusk BG, Gunsalus IC, Hornberger CS, 1951. Crystalline  $\alpha$ -lipoic acid: a catalytic agent associated with pyruvate dehydrogenase. *Science*, 114, 2952, 93-4.
- Rimm EB, Stampfer MJ, Ascherio A, Giovannucci E, Colditz GA, Willett WC, 1993. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med*, 328, 20, 1450-6.
- Ruscica M, Macchi C, Morlotti B, Sirtori CR, Magni P, 2014. Statin therapy and related risk of new-onset type 2 diabetes mellitus. *Eur J Intern Med*, 25, 5, 401-6.
- Santana AT, Guelfi M, Medeiros HC, Tavares MA, Bizerra PF, Mingatto FE, 2015. Mechanisms involved in reproductive damage caused by gossypol in rats and protective effects of vitamin E. *Biol Res*, 48, 1, 43.
- Sathasivam S, 2012. Statin induced myotoxicity. *Eur J Intern Med*, 23, 4, 317-24.
- Savitha S, Sivarajan K, Haripriya D, Kokilavani V, Panneerselvam C, 2005. Efficacy of levo carnitine and alpha lipoic acid in ameliorating the decline in mitochondrial enzymes during aging. *Clin Nutr*, 24, 5, 794-800.
- Schaefer WH, Lawrence JW, Loughlin AF, Stoffregen DA, Mixson LA, Dean DC, Raab CE, Nathan XY, Lankas GR, Frederick CB, 2004. Evaluation of ubiquinone concentration and mitochondrial function relative to cerivastatin-induced skeletal myopathy in rats. *Toxicol Appl Pharm* 194, 1, 10-23.
- Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD, 1999. *Basic neurochemistry*.
- Singer M, 2014. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. *Virulence*, 5, 1, 66-72.
- Sirvent P, Fabre O, Bordenave S, Hillaire-Buys D, De Mauverger ER, Lacampagne A, Mercier J, 2012. Muscle mitochondrial metabolism and calcium signaling impairment in patients treated with statins. *Toxicol Appl Pharm*, 259, 2, 263-8.
- Song G, Liu Z, Wang L, Shi R, Chu C, Xiang M, Tian Q, Liu X, 2017. Protective effects of lipoic acid against acrylamide-induced neurotoxicity: involvement of mitochondrial energy metabolism and autophagy. *Food & function*, 8, 12, 4657-67.
- Stampfer MJ, Hennekens CH, Manson JE, Colditz GA, Rosner B, Willett WC, 1993. Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *N Engl J Med*, 328, 20, 1444-9.
- Stancu C, Sima A, 2001. Statins: mechanism of action and effects. *J Cell Mol Med*, 5, 4, 378-87.
- Sureshbabu A, Bhandari V, 2013. Targeting mitochondrial dysfunction in lung diseases: emphasis on mitophagy. *Front Physiol*, 4, 384.

- Taanman J-W, 1999. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophysica Acta Bioenerg*, 1410, 2, 103-23.
- Tappel A, 1962. Vitamin E as the biological lipid antioxidant. *Vitam Horm*, 20, 493-510.
- Tuppen HA, Blakely EL, Turnbull DM, Taylor RW, 2010. Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochim Biophys Acta*, 1797, 2, 113-28.
- Turrens JF, 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*, 552, 2, 335-44.
- Vannuvel K, Renard P, Raes M, Arnould T, 2013. Functional and morphological impact of ER stress on mitochondria. *J Cell Physiol*, 228, 9, 1802-18.
- Vaughan RA, Garcia-Smith R, Bisoffi M, Conn CA, Trujillo KA, 2013. Ubiquinol rescues simvastatin-suppression of mitochondrial content, function and metabolism: implications for statin-induced rhabdomyolysis. *Eur J Pharmacol*, 711, 1, 1-9.
- Wagner BK, Kitami T, Gilbert TJ, Peck D, Ramanathan A, Schreiber SL, Golub TR, Mootha VK, 2008. Large-scale chemical dissection of mitochondrial function. *Nat Biotechnology*, 26, 3, 343.
- Wang CH, Wu SB, Wu YT, Wei YH, 2013. Oxidative stress response elicited by mitochondrial dysfunction: implication in the pathophysiology of aging. *Exp Biol Med*, 238, 5, 450-60.
- Wang N, Qian H-Y, Zhou X-Q, Li Y-B, Sun Z-W, 2012. Mitochondrial energy metabolism dysfunction involved in reproductive toxicity of mice caused by endosulfan and protective effects of vitamin E. *Ecotoxicol Environ Saf*, 82, 96-103.
- Wen R, Banik B, Pathak RK, Kumar A, Kolishetti N, Dhar S, 2016. Nanotechnology inspired tools for mitochondrial dysfunction related diseases. *Adv Drug Deliv Rev*, 99, 52-69.
- Wong SK, Chin KY, Suhaimi FH, Ahmad F, Ima-Nirwana S, 2017. Vitamin E As a Potential Interventional Treatment for Metabolic Syndrome: Evidence from Animal and Human Studies. *Front Pharmacol*, 8, 444.
- Zaiden N, WN Y, Ong S, VH T, Nesaretnam K, Shiba S, 2010. Gamma delta tocotrienols reduce hepatic triglyceride synthesis and VLDL secretion. *J Atheroscler Thromb*, 17, 10, 1019-32.
- Zhao L, Kang I, Fang X, Wang W, Lee M, Hollins R, Marshall M, Chung S, 2015. Gamma-tocotrienol attenuates high-fat diet-induced obesity and insulin resistance by inhibiting adipose inflammation and M1 macrophage recruitment. *Int J Obes*, 39, 3, 438.
- Zhou B, Wen M, Lin X, Chen Y-H, Gou Y, Li Y, Zhang Y, Li H-W, Tang L, 2018. Alpha Lipoamide Ameliorates Motor Deficits and Mitochondrial Dynamics in the Parkinson's Disease Model Induced by 6-Hydroxydopamine. *Neurotox Res*, 33, 4, 759-67.

## 7. EKLER

### EK A: Etik Kurul Kararı

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ DENEYSEL TIP UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ  
HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL KARARI

Karar Sayısı: 2017-42	Toplantı Tarihi: 21.11.2017	
<p>Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Bünyamin TRAŞ ve Arş.Gör. Hatice ESER FAKI tarafından sunulan "<b>Vitamin E ve alfa lipoik asitin statinlerin neden olduğu mitokondriyal disfonksiyon üzerine etkisinin araştırılması</b>" başlıklı doktora tezi projesi kurul tarafından değerlendirildi.</p> <p>Projede belirtilen anesteziik maddenin (Rompun10 mg/kg, Ketalar 90 mg/kg) kullanılması uygun görülmüştür. Projede belirtilen ve istatistiksel olarak en güvenilir sonuç elde edilebilecek asgari sayıda kullanılacak olan (38 adet sıçan) hayvan sayısı uygun görülmüştür.</p> <p>Projenin hayvan deneylerine ilişkin yönlerinin Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesinde belirtilen "Etik Kurallar" dikkate alınarak hazırlandığı belirlenmiştir.</p> <p>Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesinde yer alan kurallar ve belirtilen "Hayvan Deneyleri İle İlgili Etik İlkeler" saklı kalmak koşulu ile projenin hazırlanmasında "Etik Kurul Yönergesi İlkelerine Uyulduğuna", çalışmanın deneysel kısmını yapacak çalışmacının "Deney Hayvanları Kullanım Sertifikasına" sahip olduğu dikkate alınarak projenin hayvan kullanım etiği açısından "<b>uygun</b>" olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.</p>		
 Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK Başkan v. (Katıldı)	 Doç. Dr. İlhan ÇİFTÇİ Başkan (Katıldı)	 Prof. Dr. Ercan DURMUŞ Üye (Katıldı)
 Prof. Dr. Kamil ÜNEY Üye (Katıldı)	 Prof. Dr. Banu BOZKURT Üye (Katıldı)	 Doç. Dr. Güler YAVAŞ Üye (Katıldı)
 Doç. Dr. Zafer SAYIN Üye (Katılmadı)	 Yrd. Doç. Dr. Fatih KARA Üye (Katıldı)	 Yrd. Doç. Dr. İlhan ECE Üye (Katılmadı)
 Vet. Hekim S. Metin GÖKYAPRAK Üye (Katıldı)	 Burhan YILMAZ Üye (Katıldı)	 İlhan ALDORA Üye (Katıldı)

## EK B: Tezden Üretilmiş Yayın / Yayınlar



### 2<sup>nd</sup> International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2019)

28-29 June 2019, Ankara, Turkey  
[www.EurasianBioChem.org](http://www.EurasianBioChem.org)

#### ➤ ORAL PRESENTATION

##### Investigation of the effect of vitamin E and alpha lipoic acid on mitochondrial dysfunction caused by statins

H. Eser Faki<sup>a</sup>, B. Tras<sup>a</sup>, K. Uney<sup>a</sup>

[haticeeser@selcuk.edu.tr](mailto:haticeeser@selcuk.edu.tr)

<sup>a</sup>Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Selcuk, 42031 Konya, Turkey

#### Abstract

The aim of this study was to test whether alfa lipoic acid (ALA) and vitamin E (vit E), which are prominent with their antioxidant effects, corrected mitochondrial dysfunction caused by statins and to determine whether they can be used to prevent side effects of statins and other substances causing mitochondrial dysfunction. Wistar Albino male rats (38 in total) were used in this study and were divided into 5 groups with a control group (C) consisting of 6 rats and the remaining 32 rats divided into 4 equal groups. The control group (n=6) received only DMSO by gavage during the experimental period. The atorvastatin (A) group (n=8) only received atorvastatin (10 mg/kg, gavage) once a day for 20 days. This group was used as a positive control. The A+ALA group (n=8) received simultaneously atorvastatin (10 mg/kg, bw) and ALA (100 mg/kg, bw) by gavage once a day during the experimental period. The A+Vit E group (n=8) was administered simultaneously by gavage atorvastatin (10 mg/kg, bw) and vit E (100 mg/kg, bw) during the experimental period. The A+ALA+Vit E group (n=8) was administered simultaneously by gavage atorvastatin (10 mg/kg, bw), ALA (100 mg/kg, bw) and vit E (100 mg/kg, bw) during the experimental period. To determine mitochondrial dysfunction caused by atorvastatin, ATP and complex I levels were measured from tissues. It was determined that ALA and vit E healed statin induced changes in ATP and complex I. The curative effects of these agents were detected to be tissue dependent.

**Keywords:** Atorvastatin, Alpha Lipoic Acid, Vitamin E, Rat, ATP, Complex I

\*This abstract was summarized from the PhD thesis of the first named author. This study is supported by ÖYP (2015-ÖYP-042).



## Alpha lipoic acid and vitamin E improve atorvastatin-induced mitochondrial dysfunctions in rats

Hatice Eser Faki<sup>a,1</sup>, Bunyamin Tras, Kamil Uney

<sup>a</sup>Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Selçuk, 42031 Konya, Turkey



### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Mitochondria  
ATP  
Complex I  
Atorvastatin  
Alfa lipoic acid  
Vitamin E

### ABSTRACT

To determine the effects of alpha lipoic acid (ALA) and vitamin E (Vit E) on mitochondrial dysfunction caused by statins. A total of 38 Wistar Albino rats were used in this study. The control group received dimethyl sulfoxide. The atorvastatin (A) group received atorvastatin (10 mg/kg). The A + ALA group received atorvastatin (10 mg/kg) and ALA (100 mg/kg). The A + Vit E group was administered atorvastatin (10 mg/kg) and Vit E (100 mg/kg). The A + ALA + Vit E group was administered atorvastatin (10 mg/kg), ALA (100 mg/kg) and Vit E (100 mg/kg). All applications were administered simultaneously by gavage for 20 days. ATP level and complex I activity were measured from liver, muscle, heart, kidney and brain. Atorvastatin significantly decreased the ATP levels in heart and kidney, while a slight decrease was seen in liver, muscle and brain. Atorvastatin caused an insignificant decrease in the complex I activity in all tissues examined. ALA administration significantly improved the ATP levels in the liver, heart and kidney, while Vit E improved the ATP levels in all tissues except the muscle compared to Atorvastatin group. Single administration of both ALA and vit E ameliorated complex I activity in the muscle, heart, kidney and brain. The combination of ALA and Vit E significantly improved the ATP levels in the liver, heart, kidney and brain and also provided significant improvements the complex I activity in all tissues. The undesirable effects of Atorvastatin on mitochondrial functions in this study ameliorated by using ALA and/or Vit E alone and in combination.

### 1. Introduction

Mitochondria, known as cellular energy centers and found in most eukaryotic organism, produce adenosine triphosphate (ATP) by oxidative phosphorylation (OXPHOS) in the respiratory chain (electron transport chain, ETC). All cell types have mitochondria, except for erythrocytes. The number of mitochondria of the cells is associated with their energy need. Heart, muscle, brain and gastrointestinal cells have a large number of mitochondria, whereas cells using low energy such as skin cells have less mitochondria (Frye and Rossignol, 2011). The mitochondrion consists of four main parts: the outer mitochondrial membrane (OMM), the intermembrane space (IMS), the inner mitochondrial membrane (IMM) and the mitochondrial matrix (MM). The ETC, which plays an important role in energy production in aerobic organisms, consists of five protein complexes in IMM: NADH dehydrogenase (complex I), succinate dehydrogenase (complex II), ubiquinone cytochrome *c* oxidoreductase (complex III), cytochrome *c* oxidase (complex IV) and ATP-synthase (complex V) (Paradies et al., 2011). The complex I, which is measured to determine mitochondrial dysfunction

in this study, catalyzes the 2 electron oxidation of NADH followed by the reduction of ubiquinone (Q) to form ubiquinol (QH<sub>2</sub>), and ultimately the reduction of the terminal electron acceptor, O<sub>2</sub>. The inhibition of complex I causes mitochondrial dysfunction and increases ROS production (Paradies et al., 2002; Papa et al., 2012).

Mitochondrial dysfunction is a prominent factor in various metabolic diseases, intoxications, aging process and especially in muscle and nervous system diseases due to its effect in cell metabolism (Cardinali et al., 2013; Jang et al., 2017; Johannsen and Ravussin, 2009). The ATP level, ETC enzyme activities, mitochondrial DNA (mtDNA), mitochondrial content, mitochondrial membrane potential, ROS production, deteriorated apoptosis, lactate level and intracellular calcium content are considered as biomarkers of this organelle dysfunction (Brand and Nicholls, 2011; Delbarba et al., 2016; Montgomery and Turner, 2015). The causes of mitochondrial dysfunction are mitochondrial and genomic DNA mutations, supercomplex destabilization, mitochondrial protein accumulations, endoplasmic reticulum stress, aging, exposure to xenobiotics such as statins, and modern lifestyle (Dudkina et al., 2010; Lim et al., 2010; Park and Larsson, 2011; Tuppen et al., 2010;

\* Corresponding author.

E-mail address: [haticeeser@selcuk.edu.tr](mailto:haticeeser@selcuk.edu.tr) (H. Eser Faki).

<sup>1</sup> ORCID: 0000-0002-6124-7168.

<https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.02.011>

Received 20 September 2019; Received in revised form 12 December 2019; Accepted 27 February 2020

Available online 28 February 2020

1567-7249/ © 2020 Elsevier B.V. and Mitochondria Research Society. All rights reserved.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Konya'da doğdu. İlkokulu İstiklâl İlköğretim Okulu'nda, ortaokulu Karma Ortaokulu'nda ve lise eğitimini ise Cemil Keleşoğlu Lisesi'nde tamamladıktan sonra 2007 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ni kazandı. Bir yıl hazırlık ve 5 yıl lisans eğitiminden sonra 2013 yılında mezun oldu. Aynı sene Aralık ayında Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) kapsamında Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı'na araştırma görevlisi olarak atandı. Altı aylık İngilizce eğitiminden sonra atandığı kurumda ilgili bölümde doktora programı bulunmadığı için, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimini almak için görevlendirildi.