



T.C.

SIVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**C6 GLİOMA HÜCRE HATTINDA TOSİLİZUMAB'IN
GLUTAMAT EKŞİTOKSİSİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

RÜMEYSA KILIÇER

ORCID: 0000-0002-5810-8415

FİZYOLOJİ ANA BİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SİVAS

TEMMUZ 2024

T.C.
SİVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**C6 GLİOMA HÜCRE HATTINDA TOSİLİZUMAB'IN
GLUTAMAT EKŞİTOTOKSİSİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

RÜMEYSA KILIÇER

FİZYOLOJİ ANA BİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
DOÇ. DR. AHMET ŞEVKİ TAŞKIRAN

SİVAS
2024



Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 2023 tarihli ve 2/9 sayılı kararı ile kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna göre hazırlanmıştır.

ÖZET

C6 GLİOMA HÜCRE HATTINDA TOSİLİZUMAB'IN GLUTAMAT EKŞİTOTOKSİSİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ

Rümeysa KILIÇER

Yüksek Lisans Tezi

Fizyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ahmet Şevki Taşkıran

2024, xiv, 54 sayfa

Amaç: Bu çalışmada amaç; İnterlökin-6 (IL-6) reseptör inhibisyonunun glutamat ile oluşturulan eksitotoksistite sonucu oluşturulan hasarın etkisini göstermek ve IL-6 reseptör antagonisti Tosilizumab'ın glutamat ile eksitotoksistite ile oluşturulan üzerine etkisini nöroinflamasyon sistem üzerine etkilerini gösterip aralarındaki ilişkiyi aydınlatmaktır.

Materyal ve Metot: Çalışmada C6 sıçan glioma hücre hattı kullanıldı. Glutamat ile oluşturulan eksitotoksistite üzerine IL-6 reseptör antagonisti tosilizumab'ın etkisini değerlendirmek için hücreler dört gruba ayrıldı. Kontrol grubuna tedavi uygulanmadı, glutamat grubuna glutamat 10 mM, tosilizumab grubuna farklı konsantrasyonlar da (3, 6, 12, 25 ve 50 µM) tosilizumab ve tosilizumab+glutamat grubuna hücrelere farklı konsantrasyonlarda (3, 6, 12, 25 ve 50 µM) tosilizumab uygulandı 1 saat sonra 10 mM glutamat eklendi. Tüm gruplar toplamda 24 saat inkübe edildi. Sonrasında hücre canlılığı için XTT testi kullanıldı, total oksidan seviyeleri (TOS), total antioksidan seviyeleri (TAS), indiklenmiş oksit sentaz (iNOS) ve nitrik oksit (NO) seviyeleri ticari kitler ile ölçüldü. Apoptotik süreç için TUNEL florasan boyama yapıldı. Hücrelerde tosilizumab'ın glutamat toksisitesi sonrası ROS üretimi üzerine etkilerini değerlendirmek için immünfloresan ve IL-6 reseptör seviyeleri floresan boyama

yöntemi ile değerlendirildi. Verilerin istatistiksel analizinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak kabul edildi.

Bulgular:C6 hücrelerine 10 mM glutamat uygulanması kontrolle kıyaslandığında canlı hücre sayısını azaltmış; TOS, NO, iNOS seviyelerini, apoptotik hücre sayısını anlamlı ölçüde artırmıştır ($p<0,05$). 25 μ M Tosilizumab ile IL-6 reseptörü antagonize edilmesi sonrası glutamat uygulanması tek başına glutamat'a maruz kalan hücrelerle kıyaslandığında canlı hücre sayısını artırmış; TOS, NO, iNOS seviyelerini, apoptotik hücre sayısını anlamlı ölçüde azaltmıştır ($p<0,05$). C6 hücrelerine 10 mM glutamat uygulanması kontrolle kıyaslandığında IL-6 reseptör ve ROS seviyelerini anlamlı olarak artırmıştır ($p<0,05$). Fakat tosilizumab ile IL-6 reseptörün sonrası glutamat uygulanması tek başına glutamat'a maruz kalan hücrelerle kıyaslandığında IL-6 protein seviyesini anlamlı olarak azaltmıştır ($p<0,05$)

Sonuç: Araştırma sonuçları, IL-6 reseptörü tosilizumab ile inhibisyonunun glutamat'a bağlı eksitotoksosite ve nöroinflamasyonu azaltabileceğini göstermiştir. Deneysel ölçümler tosilizumab'ın etkisini oksitadif stres seviyeleri üzerinden gerçekleştirdiğini ortaya çıkarmıştır. Ancak bu konuyla ilgili in vitro ve in vivo daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Nöroinflamasyon, İnterlökin-6, Tosilizumab, Glutamat eksitotoksosite

ABSTRACT

Effect of Tosilimuzab on Glutamate Excitotoxicity in C6 Glioma Cell Line

Rümeysa KILIÇER

Master's Thesis, Department of Physiology

Advisor

Assoc. Dr. Ahmet Şevki Taşkıran

2024, xiv, 54 page

Aim: In this study, we aim to show the effect of Interleukin-6 (IL-6) enzyme inhibition on the damage caused by Glutamate-induced excitotoxicity, and to show the effect of the IL-6 inhibitor Tosilimuzab on the damage caused by Glutamate-induced excitotoxicity, on the neuroinflammation system and to elucidate the relationship between them.

Materials and Methods: C6 rat glioma cell line was used in the study. To evaluate the effect of the IL-6 inhibitor Tosilizumab on cell death after glutamate-induced excitotoxicity, the cells were divided into four groups. Treatment wasn't applied to the control group, Glutamate 10 mM was administered to the Glutamate group, Tocilizumab was administered to the cells at different concentrations (3, 6, 12, 25 and 50 µM) to the Tocilizumab group, and Tocilizumab was administered to the cells at different concentrations, (3, 6, 12, 25 and 50 µM) to the Tocilizumab+Glutamate group. After 1 hour, 10 mM Glutamate was added. All groups were incubated for 24 hours in total. Afterwards, XTT test was used for cell viability, total oxidant levels (TOS), total antioxidant levels (TAS), induced oxide synthase (iNOS) and nitric oxide (NO) levels were measured with commercial kits. TUNEL test was applied for the apoptotic process. Effects of Tocilizumab on ROS production after glutamate toxicity in cells To evaluate the results, immunofluorescence and IL-6 levels were evaluated by fluorescent staining method. One-way analysis of variance (ANOVA) was used in statistical analysis of the data. Statistical significance level was accepted as ($p < 0,05$)

Results: Application of 10 mM Glutamate to C6 cells reduced the number of viable cells compared to the control; It significantly increased TOS, NO, iNOS levels and the

number of early and late apoptotic cells ($p < 0.05$). Application of Glutamate after IL-6 inhibition with 25mm Tocilizumab increased the number of viable cells compared to cells exposed to Glutamate alone; It significantly reduced TOS, NO, iNOS levels, and the number of early and early apoptotic cells ($p < 0.05$). According to TUNEL staining results, application of 10 mM Glutamate to C6 cells significantly increased IL-6 and ROS protein levels compared to the control ($p < 0.05$). However, Glutamate application after IL-6 inhibition with Tocilizumab significantly reduced the IL-6 protein level compared to cells exposed to Glutamate alone ($p < 0.05$).

Conclusion: Research results showed that IL-6 inhibition could reduce Glutamate-induced excitotoxicity and neuroinflammation. Experimental measurements revealed that Tocilizumab exerts its antioxidative and protective effect through NO levels. However, more studies on this subject are needed in vitro and in vivo.

Keywords: Neuroinflammation, Interleukin-6, Tocilizumab, Glutamate excitotoxicity

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. GLUTAMAT.....	3
2.1.1. GLUTAMAT METABOLİZMASI.....	4
2.1.2. GLUTAMAT RESEPTÖRLERİ	5
2.1.3. GLUTAMAT TAŞIYICILARI.....	7
2.1.4. Glutamat Eksitotoksitesi	9
2.2. GLİOMA HÜCRELER	10
2.3. GLİOMA HÜCRESİ VE EKSİTOTOSİSİTE	10
2.4. NÖROİNFLAMASYON.....	11
2.4.1. Nöroinflamasyon Aracılı Nörodejenerasyon	12
2.5. SİTOKİNLER	12
2.5.1. İnterlökinler	13
2.5.2. İnterlökin 6 (IL-6).....	13
2.5.3. IL-6'nin Merkezi Sinir Sistemi Üzerine Etkileri	14
2.5.4. IL-6'nın Hastalıklarla İlişkisi.....	15
2.6. TOSİLİZUMAB:.....	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1. Kimyasallar ve Sarf Malzemeler	18
3.2. Hücre Kültürü.....	18

3.3. XTT Hücre Canlılık Testi.....	19
3.4. Total Antioksidan (TAS) ve Total Oksidan (TOS) Seviyelerinin Ölçümü.....	19
3.5. İndüklenebilir NOS (iNOS) ve Nitrik Oksit(NO) Seviyelerinin Ölçümü.....	21
3.6. Total Protein Ölçümü	22
3.7. İmmünfloresan Yöntemler	22
3.8. Hücresel ROS Ölçümü	23
3.9. TUNEL ile Apoptoz Tayini.....	24
3.10. İstatistiksel Analiz	24
4. BULGULAR	25
4.1. Glutamat Eksitotoksisitesi Oluşturulan C6 Sıçan Glioma Hücre Hattında Tosilizumab Hücre Canlılığına Etki.....	25
4.2. Glutamat Eksitotoksisitesi Oluşturulan C6 Sıçan Glioma Hücre Hattında Tosilizumab'ın Total Antioksidan (TAS) ve Total Oksidan (TOS) Seviyelerinin Ölçümü	27
4.3. Glutamat Eksitotoksisitesi Oluşturulan C6 Sıçan Glioma Hücre Hattında Tosilizumab NO ve iNOS Seviyelerine Etkisi	29
4.4. Glutamat Eksitotoksisitesi Oluşturulan C6 Sıçan Glioma Hücre Hattında Tosilizumab ROS Seviyelerine Etkisi	31
4.5. Glutamat Eksitotoksisitesi Oluşturulan C6 Sıçan Glioma Hücre Hattında Tosilizumab IL-6 Reseptör Seviyelerine Etkisi	33
4.6. Glutamat Eksitotoksisitesi Oluşturulan C6 Sıçan Glioma Hücre Hattında Tosilizumab TUNEL Hücre Sayısı Üzerindeki Etkisi	36
5. TARTIŞMA	39
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	44
7. KAYNAKÇA	45

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1. Tosilizuban'ın Glutamatla İle Oluşturulan Eksitotoksisitesi Sonrası Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin XTT İle Değerlendirilmesi.....	26
Şekil 4.2. Tosilizumab'ın Glutamat İle Oluşturulan Eksitotoksisite Sonrası Antioksidan Ve Oksidan Seviyeleri Üzerine Etkisinin Kolorometrik Yöntemi İle Değerlendirilmesi.....	28
Şekil 4.3. Tosilizumab Glutamat İle Oluşturulan Eksitotoksitite Sonrası İnos Ve No Seviyeleri Üzerine Etkisinin Elisa Yöntemi İle Değerlendirilmesi..	30
Şekil 4.4. Tosilizumabın glutamat eksitotoksisitesi sonrası C6 glioma hücrelerinde hücrel ROS seviyesi üzerideki etkisinin DCFDA boyama ile değerlendirilmesi... 32	
Şekil 4.5. Tosilizumabın glutamat eksitotoksisitesi sonrası C6 glioma hücrelerinde IL-6R üzerine etkisinin floresan boyama ile değerlendirilmesi.....	35
Şekil 4.6. Tosilizumabın glutamat eksitotoksisitesi sonrası C6 glioma hücrelerinde apoptoz üzerine etkisinin TUNEL floresan boyama ile değerlendirilmesi.....	38

SİMGELER VE KISALTMALAR

AD: Alzheimer hastalığı

ALS: Amyotrofik lateral skleroz

AMPA (α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit)

ANOVA: Tek Yönlü Varyans Analizi

ATP: Adenintrifosfat

BOS: Beyin omurilik sıvısı

cAMP: Siklik adenozin monofosfat

CAT: Katalaz

CCL2: Kemokin ligandı 2

CCL5: Kemokin ligandı 5:

gtpaDAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DFI: Difenileniyodinyum

DMEM: Yüksek glikozlu Dulbecco'nun Modifiye Eagle's mediumu

DNA: Deoksiribonükleik Asit

FBS: Fetal Sığır Serum

GABA: aminobütirik asit

GABA: a-aminobütirik asit

GABA-A: a-Aminobütirik asit-a

Gp130:Glikoprotein 130

GPx: Glutasyon peroksidaz

GR: Glutasyon redüktaz

GSH: Glutasyon

GSSG: Glutasyon disülfür

GTPaz: guanozin üç fosfataz

IL-1:İnterlökin 1

IL-10: İnterlökin 10

IL-17:İnterlökin 17

IL-1Ra:İnterlökin 1 reseptör alfa

IL-6:İnterlökin 6

IL-6R:İnterlökin 6 reseptör

iGluR: İyonotropik glutamat taşıyıcısı

iNOS: İndüklenmiş Nitrik oksit sentazi

KA: Kainik asit

KBB: Kan beyin bariyeri

L-AP4: L-amino-4- pirofosfobütirat

LPS: Lipopolisakkarit

MDA: Malondialdehit

mGluR: Metabolik glutamat taşıyıcısı

MS: Multipl skleroz

MSS: Merkezi sinir sistemi

MtDNA: Mitokondriyal DNA

NMDA (N-metil D-aspartat)

NO: Nitrik oksit

O-SOP: L-serin-O-fosfat

PBS: Fosfat Tamponlu Salin

PD: Parkinson hastalığı

ROS: Reaktif oksijen türleri

TAS: Total antioksidan türleri

TGF- β : Tümör Growth Faktör beta

TMD: Trans membran

TNF- α : Tümör Nekrotiz Faktör alfa

TOS: Total oksidan türleri

VGlut: Veziküler Glutamat Taşıyıcısı

XTT: 2,3-bis (2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-5-[(Phenylamino)Carbonyl]-
2HTetrazolium Hydroxide

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde glutamat eksitotoksitesisi önemli rol oynamaktadır. Merkezi sinir sisteminde bulunan nörotransmitter olarak rol oynayan önemli eksitator amino asit olan glutamat, hücre membranında bulunan reseptörler ile etkileşerek öğrenme, hafıza, hareket, sinaptik ve duyu bağlantılarının sağlanması gibi birçok nörolojik olayın düzenleyicisi olarak rol oynar (Alix ve Domingues, 2001). Normal sinirsel fizyolojik süreçlerdeki rolüne rağmen, glutamatın fazlası nöronal hasarı artırarak eksitotoksitesiteye adı verilen toksitenin açığa çıkmasına sebep olmaktadır (Lipton ve Rosenberg, 1994).

Merkezi sinir sistem, immünolojik olarak öneme sahiptir. Sinir dokusunun inflamasyonu olan nöroinflamasyon sonucu yapısı bozulmuş beyin bölgesini yapısı bozulmamış kısımdan ayıran, etkilenmiş hücreleri yok eden ve ekstrasellüler matriksi onarmasını sağlayan koruyucu bir sisteme sahiptir (Farooqui AA. Ve ark., 2010). Enfeksiyon, travmatik beyin hasarı, toksik metabolitler ya da otoimmünite gibi pek çok nedenin cevabı olarak ortaya çıkabilir. Akut inflamasyonda inflamatuvar moleküller, endotel hücre aktivasyonu, trombosit birikimi ve doku ödemi gözlenir. Kronik inflamasyon ise glial hücrelerin gecikmiş aktivasyonu ve immün hücrelerin dahil olmasıyla birlikte oluşur. Bu durum nörodejeneratif hastalıklarla da ilişkilidir (Akhlaq. ,2010).

Sitokinler, hematopoietik sisteminde içerisinde yer alan, hedef hücrelerin aktivitelerini değiştiren veya düzenleyen protein ya da glikoprotein yapılı immunomodulatorlerdir. Sitokinler inflamatuvar aktivitelerine göre pro-inflamatuvar (IL1, IL-6, TNF- α , TGF- β) ve anti-inflamatuvar (IL-1Ra, IL-10) olarak gruplara ayrılır. Sitokin fonksiyonel özellikleri, hedef hücrenin yüzeyinde bulunan sitokin reseptörlerine göre, belirgin bir özellik gösterir (Bidwell ve ark. , 1999).

Proinflamatuvar sitokinlerden olan Interlökin 6 (IL-6) , homeostazı sürdürmek için prototipik bir sitokindir. Enfeksiyonlar veya doku yaralanmaları ile homeostaz bozulduğunda, IL-6 üretilir. Akut faz ve immün yanıtların aktivasyonu yoluyla bu tür ortaya çıkan strese karşı konak savunmasında rol oynar (Tanaka ve ark. ,2018). Bununla birlikte, IL-6'nın düzensiz aşırı ve kalıcı sentezi, sırasıyla akut sistemik

inflatuar yanıt sendromu ve nörodejeratif hastalıklar üzerinde patolojik bir etkiye sahiptir. IL-6 inhibitörü olan tosilizumab, romatoid artrit, jüvenil idiyopatik artrit ve Castleman hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır (Tanaka ve ark. ,2018).

Tosilizumab, IL-6 tarafından oluşturulan sinyal iletimini IL-6'nın hücre membrana ve çözünür reseptörüne bağlanmasını engeller. İmmunoglobulin G1 sınıfı, IL-6 reseptörüne karşı anti IL-6 monoklonal antikordur (Sheppard ve ark. , 2017).

IL-6 için iki tip reseptör sahiptir; hücre içi sinyali başlatmak için IL-6 ile bağlandıktan sonra glikoprotein130 (gp130) ile birlikte oluşturan düşük bağlanma gücüne sahip hücre zarı IL-6 reseptörü (IL-6R) ve IL-6 ile bağlanan çözünür bir IL-6 reseptörüdür. Glikoprotein130 (gp130), genelde hücreler tarafından yaygın olarak eksprese edilirken, IL-6R yalnızca hepatositler, nötrofiller, monositler, makrofajlar ve T ve B lenfositleri gibi bazı hücrelerde görülmektedir. Biyolojik rollerine IL-6'nın kendisinden oluşan heksamerik bir kompleks, reseptör IL-6R ve gp130 (IL-6/IL-6R/gp130) birlikte rol oynar. Bu kompleks, çeşitli biyokimyasal fonksiyonları yürütmek için farklı sinyal mekanizmalarını ile birlikte etkinleştirir. Tosilizumab gp130 aktivasyonunu engelleyerek proinflatuar aktiviteyi inhibe etmektedir. Tosilizumab, IL-6 reseptörlerine (sIL-6R ve mIL-6R) belirli olarak etki gösterirken; IL-6 ailesinin (lösemi inhibitör faktör, onkostatın M ve IL-11) diğer reseptörlerine bağlanamamaktadır (Garbers ve ark. 2011).

IL-6 reseptör antagonisti olan tosilizumab, romatoid artrit, jüvenil idiyopatik artrit ve Castleman hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalar IL-6 ve IL-6 reseptörünün nörodejeratif hastalıklarla ilişkili olabileceğini göstermektedir. IL-6 üretimindeki düzensizlik inflamasyon, otoimmün hastalıklar, malignite gibi çeşitli hastalıkların oluşmasında rol almaktadır (Weissenbach ve ark. 1980). Fakat henüz glutamat eksitotoksitesi üzeri etkisi aydınlatılmamıştır. Bu çalışmada C6 glial hücre hattında tosilizumab'ın glutamat eksitotoksitesi üzerine koruyucu etkisini araştırılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. GLUTAMAT

Glutamat, merkezi sinir sisteminin başlıca uyarıcı nörotransmitter olarak görev yapar ve ayrıca glutamat çoğu nöronlarda bulunmaktadır (Featherstone D, 2009). Glutamat hücre membranında bulunan reseptörler ile etkileşerek öğrenme, hafıza, hareket, sinaptik ve duyu bağlantıların sağlanması gibi birçok nörolojik olayın düzenleyicisidir (Yıldırım, 2009).

Sinir sisteminde glutamat, uzun süreli güçlenme ve sinaptik esneklik gibi çok çeşitli sinir fonksiyonlarına katılan birincil hızlı uyarıcı mekanizmaya sahiptir. Glutamat sinyal mekanizması ise, hücre yüzey reseptörlerine bağlanıp etkinleştirir (Shigeri Y. ve ark. 2004).

Glutamat reseptör iki aileye ayrılır: iyonotropik (iGluR) ve metabotropik (mGluR). İyonotropik glutamat reseptörleri olarak tanımlanan AMPA (α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit), kainat ve NMDA (N-metil D-aspartat) reseptörleri etkin olduklarında iyonların geçmesine sağlayan zar kanalları açılır. Metabotropik glutamat reseptörleri de G proteinine bağlı reseptörlerdir, etkilerini ise ikincil haber sistemi aracılığıyla gösterirler (Shigeri Y. Ve ark. 2004). Metabotropik glutamat reseptörleri (mGluR'ler) olarak adlandırılan nöromodülatör glutamat reseptörlerinin varlığı, glutamatın ikinci haberci sinyal yolları yoluyla hücre uyarılabilirliğini ve sinaptik iletimi modüle edebildiği bir mekanizma sağlar. mGluR proteinlerinin yaygın dağılımı, bu nöromodülatör reseptörlerin MSS boyunca çok sayıda fonksiyona katılma yeteneğine sahip olduğunu ve çok çeşitli MSS bozukluklarında terapötik müdahale için gösterilen hedefleri temsil edebileceğini göstermektedir. Glutamatın sinyal mekanizmasına bakıldığında, Alzheimer ve Parkinson hastalığı, multipl skleroz ve epilepsi gibi nörodejeneratif hastalıkların patagonezinde rol oynadığı gösterilmiştir (Ezza ve Khadrawy,2014).

2.1.1. GLUTAMAT METABOLİZMASI

Hücreler tarafından alınan glutamat metabolik olarak protein sentezi, enerji metabolizma, amonyak fiksasyonu veya yeniden kullanılabilen transmitterdir. Glutamat, beyin dokusunda ise diğer amino asitlerden daha yüksek bir oranda bulunan proteinlerden olur. Sinir sisteminde glutamat, veziküler bir glutamat taşıyıcısı tarafından sinaptik keseciklere taşınır ve ardından ekzositozla salınır (Cousin ve Robinson, 1999) ve hücre dışı sıvı, nöronlar tarafından alınır ve nöronların içinde yeniden glutamata dönüştürülür. Glutamat ayrıca glutatyonun da aralarında bulunduğu protein ve peptitlerin sentezinde önemli bir yer tutar. GABA ve glisin gibi nörotransmitter amino asitler ve dopamin, serotonin ve noradrenalin gibi nörotransmitter aminlerin ortak özelliği, sodyuma bağımlı, yüksek afiniteli bir alım sistemidir. Benzer bir alım sistemi glutamat için de mevcuttur. Glutamat alımı önemli bir sodyum gereksinimini gösterir (Bennet ve ark. , 1973). Dolaşımdaki glutamatın beyne taşınması normalde beyin glutamat seviyesinin düzenlenmesinde rol oynar. Aslında, kan-beyin bariyeri boyunca plazmadan gelen akış, glutamatın beyinden akışından çok daha düşük olduğunda glutamat, kan-beyin bariyerini geçemez, ancak beyin sıvılarındaki oranı sabit seviyede kalmasını sağlayan yüksek afiniteli bir taşıma sistemi aracılığıyla aktif olarak sinir sistem tarafından taşınır (Smith Q. R. 2000). Glutamat, protein sentezi ve enerji metabolizması gibi hücresel aşamalarda rol oynamaktadır ya da nörotransmitter olarak kullanılmak için depolanmaktadır. Glutamat, sinaptik veziküller içine, glutamat taşıyıcısı tarafından alınır ve sonra ekzositoz yoluyla salınmaktadır (Gözen O, 2008).

Hücre dışı sıvıdan alınan glutamat, astrositlerde glutamine çevrilmektedir. Glutamin, hücre dışına salgılanmaktadır ve daha sonra nöronlar aracılığıyla alınıp tekrar glutamata dönüştürülür. Nöronlar ve astrositler arasında oluşan glutamat ve glutamin alışverişi glutamat için bir döngü sağlanır ve glutamat döngüsü olarak adlandırılır (Gözen O, 2008). Astrositlerde, hücre dışı sıvıdan alınan glutamat, hücre dışı sıvıya salınan glutamine dönüştürülebilir, nöronlar tarafından uyarılır ve nöronların içinde yeniden glutamata dönüştürülür. Astrositler ve nöronlarda arasındaki bu glutamat ve glutamin alışverişi, verilen glutamatın geri dönüştürülme özelliği olduğu ileri sürülmüştür. Astrositlere alındıktan sonra glutamat iki farklı yolla metabolize edilebilir: ATP'ye bağımlı, glia'ya özgü enzim glutamin sentetaz tarafından

glutamine dönüştürülebilir (Martinez-Hernandez ve ark. , 1977) veya alfa-ketoglutarata dönüştürülebilir (glutamat dehidrojenaz ile deaminasyon yoluyla veya transaminazlardan biri tarafından transaminasyon yoluyla). Alfa-ketoglutarat, trikarboksilik asit döngüsü yoluyla sırasıyla süksinat, fumarat ve malata metabolize edilebilir. Malat, trikarboksilik asit döngüsü yoluyla daha da metabolize edilebilir veya piruvata dekarboksillenebilir ve laktata indirgenebilir. (McKenna et al. , 1996) Hem glutamin hem de laktat, astrositlerden nöronlara girebilecekleri hücre dışı sıvıya aktarılır(Ham-berger ve ark. , 1979).

2.1.2. GLUTAMAT RESEPTÖRLERİ

Glutamat reseptörleri nöron ve glia hücrelerinin zarlarında bulunan sinaptik ve sinaptik olmayan reseptör olarak rol oynar. Glutamat sinyali, metabotropik glutamat reseptörleri (mGluR'ler) ve iyonotropik glutamat reseptörlerinden (iGluR'ler) oluşan bir reseptör ailesini aktive eder. Glutamat reseptörlerinin eksitotoksistide rol oynaması ve merkezi sinir sistemindeki işlevi, birçok nörodejeneratif hastalıklarda ilişkilendirilir (Brassai A. ve ark. , 2015). Bunların her ikisi de Şizofreni gibi kronik beyin bozukluklarında ve Alzheimer, Parkinson ve multipl skleroz gibi nörodejeneratif hastalıklar gözlenmektedir.

Metabotropik Reseptörler:

Metabotropik glutamat reseptörleri (mGluR'ler), merkezi sinir sistemi boyunca sinaptik iletimin ve nöronal uyarılabilirliğine katılan G-proteinine bağlı reseptörlerdir. mGluR'ler geniş bir hücre dışı alan içindeki glutamata bağlar ve sinyalleri reseptör proteini aracılığıyla hücre içi sinyal ile iletir. Metabotropik glutamat reseptörü; etkileşimleri, farmakolojik özellikleri ve amino asit dizilişlerine göre üç grubu vardır ve sekiz farklı mGluR (mGluR1-8) sahiptir (Niswender, C. M., ve Conn, P. J. ,2010).

Grup I reseptörleri, mGluR1 ve mGluR5'ten oluşmaktadır. Fosfolipaz C'yi (protein kinaz C'yi aktive eden ve diasilgliserol üreten) ve ayrıca inositol-1,4,5-trifosfatı (hücre içi depolardan Ca^{++} salınmasını sağlayan fosfoinositid hidrolizini üreten) ikincil haberciler tarafından iletilir (Tapiero H. ve ark. 2002).

Grup II reseptörleri, mGluR2 ve mGluR3 tarafından oluşmaktadır. Bu grup cAMP oluşumunu uyarın forskolin veya G bağlı proteinleri inhibe eder. Bu grubun

agonisti 2,3- dikarboksisiklopropil-glikoldür (Tapiero H. ve ark. 2002). Grup III ise mGluR4, mGluR6, mGluR7 ve mGluR tarafından oluşmaktadır. Grup II ve III, adenil siklaza negatif olarak bağlanır (Tapiero H. ve ark. 2002)

İyonotropik Reseptörler:

İyonotropik reseptörler, AMPA (α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolepropiyonik asit)/Kainat ve NMDA reseptörleri olarak ikiye ayrılmaktadırlar (Featherstone D, 2009). Bu reseptörler postsinaptik membran üzerinde yer almaktadır. Ca^{+} , Na^{+} iyonlarının intraselüler ve ekstraselüler sıvılar arasındaki geçişi ile glutamat taşınımında rol oynamaktadır. iGluR'ler, Glutamat bağlanması üzerine katyon akışına izin veren dörtlü ligand ve kapılı iyon kanallarıdır. Kanalı oluşturan dört alt birimin her biri, hücre dışı amino terminali (ATD), ligand bağlama (LBD), trans-membran (TMD) ve hücre içi karboksi terminali dahil olmak üzere korunmuş alandan oluşan benzer bir yapıyı paylaşır ve zarda sodyum, potasyum ve/veya kalsiyum akışının meydana geldiği bir por açılır(O'Connor JJ ve ark., 1995)

AMPA/Kainat reseptörleri, GluR1-7, KA1-2 alt yapısında bulunur. Postsinaptik nöronun, glutamat ile uyarılmasını ile birlikte Ca^{+2} , Na^{+} iyonlarının intraselüler ve ekstraselüler sıvılar arasındaki geçişi ile glutamat taşınımına yardımcı olur (Aydın ve ark, 2006; Görgülü ve Kırış, 2005). AMPA reseptörlerinin, glutamata karşı bağlanma gücü düşüktür. Glutamat ile uyarıldığında reseptörler etkin hala gelmektedir. NMDA reseptörlerinin ise AMPA/Kainat reseptörleriyle karşılaştırıldığında glutamata karşı bağlanma gücü yüksektir ve inaktivasyonları daha yavaştır (Gözen, 2008).

NMDA (N-metil D-aspartat) reseptörleri, merkezi sinir sistemi (MSS)'nde glutamat ile uyarılan ligand kapılı iyon kanalıdır. NMDA reseptörleri üzerinde; glisin, glutamat, Zn^{+2} , Mg^{+2} ve poliamin gibi agonistlere özel bağlanma bölgeleri yer almaktadır (Kritis ve ark, 2015). Bu bağlanma bölgelerine özel maddelere bağlanır, Mg^{+2} iyonu uzaklaştırılır, NMDA reseptörleri etkin hale getirir, hücre içi ve dışı arasındaki Ca^{+2} , Na^{+} , K^{+} iyonlarının değişimleri gerçekleştirilerek glutamat hücre içerisine alınımı sağlanmaktadır. NMDA reseptörleri; Na^{+} , K^{+} iyonları arasında daha fazla Ca^{+2} iyonu geçirgenliği olan kanal bulunmaktadır (Tüfekçi ve Tunalı, 2012; Görgülü ve Kırış, 2005). Glutamat taşınması için NMDA reseptörü, bir kalsiyum iyon kanalı kullanırken, AMPA reseptörü bir sodyum iyon kanalı kullanır.

2.1.3. GLUTAMAT TAŞIYICILARI

Glutamati, merkezi sinir sistemde bir zar boyunca uyarılan ve hareket eden nörotransmitter taşıyıcı protein ailesine glutamat taşıyıcıları adı verilir. İki alt sınıftan oluşmaktadır: uyarıcı aminoasit taşıyıcı (EAAT) ailesi ve veziküler glutamat taşıyıcı (VGluT) ailesi (Rothstein G. R. 1999). EAAT ailesi; glutamati, sinaptik yarıktan ve ekstrasinaptik bölgelerden, glial hücrelere ve nöronlara, glutamat geri alım sağlayarak uzaklaştırır. VGluT ailesi ise glutamati hücre sitoplazmasından sinaptik veziküllere taşınarak rol oynamaktadır (Rothstein G. R. 1999).

Glutamat taşıyıcıları etkin olmaması durumunda glutamat, bir dizi biyokimyasal kaskadı tetikler ve nöronlar için toksik bir etki oluşturarak eksitotoksitenin oluşumuna neden olur (Zou J. Y. ve Crews F. T. 2005). Glutamat taşıyıcılarının aktivitesi ayrıca glutamatın tekrar salınması için geri dönüştürülmesine sağlamaktadır (Zou J. Y. ,Crews F. T. 2005).

Eksitatör Amino Asit Taşıyıcıları (EAAT'ler)

Beş Na⁺ bağımlı glutamat taşıyıcısı vardır, bunlar EAAT1 (GLAST), EAAT2 (GLT-1), EAAT3 (EAAC-1), EAAT4 ve EAAT5 amino asit aralığında polipeptidler, bağımlı ve yüksek afiniteli glutamat taşıyıcılarıdır. Glutamat taşıyıcıları; üç Na⁺ ve bir H⁺ iyonu yanında bir tane glutamati hücre içerisine taşırken, bir K⁺ iyonu hücre dışına vermektedir (Çetin, 2014).

EAAT'ler beş glutamat taşıyıcı alt tipinden oluşur;

EAAT1: Oldukça bol miktarda bulunur ve beyincikte ve iç kulak, retina ve ventriküler organlar gibi birkaç küçük bölgede ana glutamat taşıyıcısıdır. Beyincikte EAAT1, EAAT2'den yaklaşık 6 kat, EAAT4'ten ise 10 kat daha fazladır. EAAT1'in en yüksek yoğunluğu, 18.000 taşıyıcı/m³'ün bulunduğu Bergman glia'sındadır. Hipokampusun CA1 bölgesinde EAAT1'in yoğunluğu 3.200/ m³'tür. EAAT1 çoğunlukla astrositlerde eksprese edilir ve sıklıkla EAAT2 ile birlikte eksprese edilir(Lehre KP ve Danbolt NC, 1998).

EAAT2, EAAT1'in daha bol olduğu beyin bölgeleri hariç tüm bölgelerde en bol bulunan glutamat taşıyıcısıdır ve ön beyindeki glutamat alımının %90-95'inden

sorumludur. Hipokampusta m^3 başına 12.000 EAAT2 taşıyıcısı vardır. Serebellar tabakada m^3 başına yalnızca 2.800 taşıyıcı bulunur (Lehre KP ve Danbolt NC, 1998). EAAT2 ağırlıklı olarak astrositlerde eksprese edilir, ancak EAAT2'nin %10'a kadarı hipokampustaki presinaptik nöronal terminallerde eksprese edilir (Furness DN ve ark. , 2008).

EAAT3, hipokampus, beyincik ve bazal ganglionlarda en yüksek konsantrasyonlara sahip nöronlarda eksprese edilir, ancak ekspresyon seviyesi, EAAT1 ve EAAT2'ninkinden 100 kat daha azdır. EAAT3'ün büyük bir kısmı hücre içidir ancak plazma zarında ifade edilmek üzere hızla mobilize edilebilir. Ayrıca, EAAT3 genelde homeostatik veya hücreSEL fonksiyonu olarak rol oynar. Sinaptik iletimi doğrudan düzenlemek yerine metabolizma rolü vardır (Holmseth S. Ve ark. ,2012).

EAAT4, Beyincikteki Purkinje hücrelerinde eksprese edilir. Ön beyin gibi diğer bölgelerde düşük düzeyde ekspresyon vardır ve orijinal EAAT4 cDNA klonunun bir insan motor korteks cDNA kütüphanesinden izole edildiğine dikkat edilmelidir. Sinapslara yakın bir yerde bazı ifadeler vardır, ancak EAAT4'ün çoğunluğu astrositlere yakın olan dendritik dikenlerde ve ayrıca somadaki düşük seviyelerde ifade edilir. Purkinje hücrelerinde EAAT4'ün ortalama yoğunluğu $1.800/ m^3$ dür (Dehnes Y. Ve ark. ,1998).

EAAT5, Yalnızca retinada eksprese edilir ve hem koni hem de çubuk fotoreseptör terminallerinde ve çubuk bipolar hücrelerin akson terminallerinde tanımlanmıştır (Pow DV ve Barnett NL. ,2000). Böylece, retinada EAAT5, glutamaterjik nörotransmisyonu doğrudan etkilemek için iyi bir konuma sahiptir. Glutamat taşıyıcıları ayrıca bir dizi başka organda da ifade edilir. EAAT3'ün böbrekteki ifadesi iyi karakterize edilmiştir; burada dikarboksilik amino asit yeniden emiliminde rol oynar. EAAT3 ayrıca kalpte, enterik nöronlarda ve plasentada da eksprese edilir. EAAT1 ayrıca kalp, plasenta, kemik osteositleri ve meme bezlerinde de ifade edilir ve EAAT2 plasenta ve meme bezlerinde ifade edilir (Wersinger E. ve ark. ,2006).

Veziküler Glutamat Taşıyıcıları (VGLUT'lar)

Veziküler glutamat taşıyıcısının üç alt tipi (VGLUT 1, 2 ve 3) bulunmaktadır ve ortalama 600 amino asitten oluşmaktadır. VGLUT'lerin bilinen tüm alt grupları, EAAT'lardan 100 ila 1000 kat daha düşük bir afinite ile glutamata taşınmaktadır (Shigeri Y, ve ark, 2004).

- ***VGLUT1***: İnsanlarda SLC17A7 geni tarafından kodlanır (Ni B. ve ark. 1996). Bu gen tarafından kodlanan protein, nöronlarda özellikle aktarılan veziküle bağlı olarak bulunan, sodyuma bağımlı bir fosfat taşıyıcıdır. Sinaptik veziküllerin zarları ile ilişkilidir ve glutamat taşınmasında rol oynamaktadır (Aihara Y. ve ark. 2000).

- ***VGLUT2***: İnsanlarda SLC17A6 geni tarafından kodlanır (Miyaji T. ve ark. , 2008). Yetişkin, beyindeki küçük bir dopamin nöron alt yapısında, veziküler glutamat taşıyıcı 2 (VGLUT2) bulunur ve böylece striatumda bir nörotransmitter olarak glutamat salgılar (Kouwenhoven W. M. ve ark. 2020).

- ***VGLUT3***: İnsanlarda SLC17A8 geni tarafından kodlanır. Nörolojik hastalıklarda rol oynar (Fremeau R. T. ve ark. 2002).

2.1.4. Glutamat Eksitotoksitesisi

Merkezi sinir sistemde tarafından oluşan nöronal hasarda en çok görülen uyarıcı nörotransmitter glutamattır ve birçok nörodejeneratif hastalığın temelinde, nöronal boşluktaki glutamat seviyelerinde artış olduğu rastlanılmıştır (Faden ve ark, 1989).

Hücreler arası boşlukta glutamat seviyesi arttıkça, glutamat reseptörlerindeki uyarım artar, bu uyarım nöronal hasar ve ölüme sebep olur. Bu oluşan olaylar sonucu, glutamata bağlı eksitotoksitesite olarak adlandırılır (Lipton ve Rosenberg, 1994). Glutamatın fazla miktarda salınması NMDA reseptörlerinin uyarılmasında artışa yol açmaktadır. Bunun sonucu olarak hücre içine aşırı kalsiyum girişi meydana gelmektedir.

Hücre içindeki yüksek Ca^{+2} seviyesi, mitokondrial işlev bozukluğuna, şişme ve nekrotik hücre ölümünü yol açmaktadır. Daha az görülen hasarda mitokondri fonksiyonu değişmez, hücreler apoptoza yol açmaktadır ve hücre içi proteaz, fosfolipaz ve endonükleaz enzimleri aktifleşerek hasar oluşturur (Yıldırım, 2009).

Alzheimer, Parkinson, Huntington, epilepsi ve multiple skleroz gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıkların yapısında, glutamat eksitotoksitesi önemli rol oynamaktadır (Hynd vd., 2004; Lai vd., 2014; Pitt vd., 2000; Vincent ve Mulle, 2009).

2.2. GLİOMA HÜCRELER

Merkezi sinir sistemi tümörlerinin en büyük grubunu glial hücrelerden gelişen ve genel olarak glioma olarak bilinen tümörler oluşturmaktadır. Glial tümörlerin en sık görüleni glioblastoma multiformedir (Kemerli ve ark. , 2003)

Glioma olarak adlandırılan insanlarda primer beyin tümörlerinin büyük çoğunluğu, astrosit kaynaklı tümörler en ölümcül kanserler arasında yer almaktadır. Beyinde yayılma konusunda olağandışı bir özelliğe sahiptir ve bunu, vücudun metastaz yapan kanserlerinde olduğu gibi pasif, homojen yayılma yerine, hücrelerin aktif göçü yoluyla yaparlar. Glioma hücrelerinin göçü, gelişim sırasında olgunlaşmamış beyin hücrelerindeki göçüdür (Cotran ve ark. 1994).

Bu neoplazmik tümörler, istilacı göçleri nedeniyle de çok kötü bir prognoza sahiptir (Cotran ve ark. 1994). İyon kanallarında, istilacı göç ve kontrolsüz çoğalma görülür. İnsan glioma hücreleri çeşitli iyon kanallarını eksprese eder. Bunlar arasında voltaj kapılı K^+ kanalları (Chin ve ark. 1997), voltaj kapılı Na^+ kanalları (Brismar ve Collins 1989), Ca^{+2} ile aktifleşen K^+ kanalı (Brismar ve Collins 1989; Pallotta ve ark. 1987), voltaj kapılı yer alır. Glioma hücreleri tarafından büyük iletkenliğe sahiptir.

2.3. GLİOMA HÜCRESİ VE EKŞİTOSİSİTE

Yüksek hücre dışı glutamat seviyeleri kontrolsüz Ca^{+2} nöronların çoğunda artar ve felç ve diğer sinir sistemi hasarlarını takiben eksitotoksik beyin hasarına yol açar. Normal beyinde yüksek hücre dışı glutamat, astrositlere alımıyla sıkı bir şekilde kontrol edilir. Nöronlar gibi glial hücreler de eksitotoksisiteye duyarlıdır. Kalsiyuma karşı oldukça geçirgen olan NMDA reseptörleri ve merkezi sinir sistemi nöronlarında yaygın olarak bulunan başlıca eksitotoksisiteyi başlatır. Ancak Ca^{+2} 'nin aktivasyonu geçirgen AMPA veya kainat reseptörleri de tetikleyebilir nöronal hücre ölümüne yol açar (Weiss ve Sensi, 1999). Üstelik bu reseptörlerin antagonistleri daha yüksek bir etki gösterir. Epilepsi ve iskemi gibi nörodejeneratif hastalıklarda AMPA veya kainat reseptörleri ve nöron ölümü eksitotoksitenin rol oynamaktadır (Matute ve ark. , 2002).

Beyin için birincil enerji kaynağı olan glukoz, glialarda glikojen şeklinde depolanmakta, daha sonra çeşitli nörotransmitterlerin uyarısına yanıt olarak rol oynamaktadır. Gliaların asıl beyin hücre dışı sıvısının bileşimini düzenlemedeki görevi önemlidir. Bu düzenlemede K^+ iyonlarının, glutamat ve GABA gibi nörotransmitterlerin konsantrasyonu yer almaktadır (Babu,A.N.,ve ark. ,1999). Glutamaterjik sinapslarda hücre dışından glutamatın alınımında da glialar önemli görev almaktadır. Astrositlerde hem iGluR'leri hem de mGluR'leri genellikle bulunmasına rağmen NMDA reseptörlerinin varlığı hala bilinmemektedir. NMDA'nın neden olduğu akımlar hipokampus ve neokortikal astrositlerde gözlenmiş, ancak fonksiyonel NMDA reseptörlerinin gliada olup olmadığı tam olarak bilinmemektedir. Glial hücrelerde glutamatın hacim değişimlerini uyarması ve astrositlerden glutamat salınımını azaltması, glutamat reseptörlerinin merkezi sinir sisteminde fizyolojik ve patofizyolojik olaylarda önemli bir role sahip olduğunu ortaya koymaktadır (Schpke ve ark. ,2001)

2.4. NÖROİNFLAMASYON

Merkezi sinir sistemi (MSS) immünolojik olarak görev yapmaktadır. Sinir dokusunun inflamasyonu olan nöroinflamasyon yapısı bozulmuş beyin bölgesini yapısı bozulmamış kısımdan ayıran, etkilenmiş hücreleri yok eden ve ekstrasellüler matriksi onaran koruyucu bir sistemdir (Farooqui AA. Ve ark., 2010.). İnflamasyon, travmatik beyin hasarı, toksik metabolitler ya da otoimmünite gibi çeşitli nedene yanıt olarak oluşabilir. Akut inflamasyonda inflamatuvar moleküller, endotel hücre aktivasyonu, trombosit birikimi ve doku ödemi görülebilir. Kronik inflamasyon ise glial hücrelerin uzamış aktivasyonu ve immün hücreler rol almaktadır. Bu durum nörodejeneratif hastalıklarla da ilişkilidir (Akhlak. , 2010).

Normal yaşlanma süreci, demans, travma, inme, hipertansiyon, depresyon, diyabet, tümörler, enfeksiyonlar, toksinler ve ilaçlar gibi çeşitli faktörler merkezi sinir sisteminde (MSS) nöroinflamasyonu sebep olur. Bu faktörler oluşturdukları inflamasyon ile azalan nörojenez, sinaptik hasarlar, metabolik stres, bilişsel gerileme ve nöro-davranışsal eksikliklere de nöroinflamasyon oluşunu sebep olur. Özellikle normal yaşlanma süreci; yapısı bozulmuş glial hücre sinyalleşmesi, MSS hücrelerinde

kronik proinflamatuvar reaksiyonlar, artmış sistemik inflamasyon ve kan beyin bariyeri (KBB) geçirgenliğine neden olabilmektedir (Monty ve ark. ,2014).

Nöroinflamasyonda enflamatuvar cevap, şematik olarak iki adımda gerçekleşen bir süreç;

- (i) İlk olarak, tehlike sinyallerinin mikroglia tarafından tanımlanır ve tetikleyici faktörü amacı yok etmektir. Sınıf II MHC antijen sunan moleküller, Kostimülatör moleküller (CD80, CD86), Proinflamatuvar Sitokinler (TNF α , IL-1 β , IL12...), Kemokinler (CCL2, CCL5...), Nitrik Oksit (NO) ve ROT üretimi ile sağlanmaktadır. Bunlarda agresif ajanları yok etmek için gerekli olduğu bilinmektedir.
- (ii) İkinci olarak, anti-inflamatuvar moleküllerin salgılanması ve doku onarımı sağlayan faktörler ile birlikte karakterize edilen inflamasyonun ayrıştırma fazı gelmektedir. Bu faz, akut fazın durdurulması, yaralanan dokunun iyileşmesi ve homeostaza sağlanmasını imkan verir (Heneka ve ark. , 2014).

2.4.1. Nöroinflamasyon Aracılı Nörodejenerasyon

Nöroinflamasyonda görülen yükselme ve aktivasyonu ile birlikte nörodejenerasyona sebep olan birçok ajan, reseptör protein ve yolak olduğu görülmüştür.

Nöroinflamasyonun sonucu olarak görülen hastalıklarda, nörodejenerasyon ve nöronal ölüm temel olarak; TNF- α IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-33, CCL2, CCL5, matriks metalloproteinaz-3 (MMP-3), sinir büyüme faktörü (NGF), P maddesi (substance P), siklooksijenaz-2 (COX2), prostaglandin E2 (PGE2), ROT, PAR-2, CD40, CD40L, CD88, hücreler arası adezyon molekülü 1 (ICAM-1) ve mast hücreler tarafında görülen histamin ile triptaz gibi proinflamatuvar ve nörotoksik mediatör seviyesinde görülen yükselmeden dolayı olduğu bilinmektedir. Bu araçlar doğrudan veya dolaylı olarak glia hücrelere ve enflamatuvar hücrelere etki etmektedirler (Heneka ve ark. , 2014)

2.5. SİTOKİNLER

Sitokinler, hematopoietik sisteminde içinde yer alan, hedef hücrelerin hareketlerini değiştiren veya düzenleyen protein ya da glikoprotein yapıları immunomodulatörlerdir. (Bidwell, 1999). Sitokinler inflamatuvar aktivitelere göre pro-inflamatuvar (IL1, IL-

6, TNF- α , TGF- β) ve anti-inflamatuvar (IL-1Ra, IL-10) olarak gruplara ayrılır. Sitokinler işlevsel olarak, hedef hücrenin yüzeyinde bulunan sitokin reseptörlerine göre, belirli bir özellik göstermektedir (Callard ve ark., 1999).

2.5.1. İnterlökinler

Bir bölümü lenfositler tarafından oluşturulan (lenfokin) bir bölümünde monosit ve makrofajlar tarafından oluşturulan (Monokin) hücreler arası etkin maddeler için İnterlökin olarak adlandırılır (Bilgehan, 2005).

2.5.2. İnterlökin 6 (IL-6)

IL-6, çeşitli özelliğe gösteren bir sitokindir. İmmün, hematopoietik aktivite ve akut faz cevabı indüklemeye özelliğe sahip çok fazla spesifik özellik gösteren savunma sisteminde yer almaktadır. İnterlökin-6 (IL-6) yaklaşık 26 kD luk sitokin olup, mononükleer fagositler, damar endotel hücreleri, fibroblastlar ve epitel hücreler ile bazal özellikli glialar tarafından sentezlenir. İmmün ve inflamatuvar olayların oluşumunda rolü üstlenen tümör nekroz faktörü- α (TNF α) ve IL-1'e cevap olarak üretilir. IL-6'nın Biyolojik Aktivitesi İnterlökin-6 (IL-6), lenfoid ve lenfoid olmayan hücreler tarafından üretilen ve akut faz cevabı, inflamasyon, onkogenezis, hematopoiezis ve immün aktivitenin düzenlenmesi gibi çok geniş biyolojik aktivitesi vardır (Simpson ve ark., 1997).

Proinflamatuvar sitokin IL-6, mikroglia'nın iltihaplı bölgelere girişi, astrositlerin aktivasyonu ve büyüme faktörlerinin sentezinin düzenlenmesinin ayrılmaz bir parçasıdır (Giulian ve Lachman, 1985; Lindholm ve ark. 1987; Lee ve ark. , 1993). IL-1 nöronlara ve glia'yı interlökin-6'yı (IL-6) sentezlemede rol oynar (Benveniste ve ark. , 1990; Sawada ve ark. , 1992; Norris ve ark. , 1994; Gadiant ve Otten, 1997). IL-1, astrositlerin çoğalmasını ve dolayısıyla modüle edebilen IL-6'nın salınmasını uyarır ve nöronal hücrelerin farklılaşması ve hayatta kalması ve astrositlerin gp130 aracılı farklılaşmasında rol oynamaktadır.

IL-6 Geni ve Yapısı

IL-6 anti-inflamasyon, proinflamatuvar ve endokrin özellikleri ile bir pleiotropik bir sitokindir. IL-6, akut faz proteinlerinin (APPs, örneğin C reaktif protein, serum amiloid A protein, albumin, haptoglobulin) üretiminin düzenlenmesinde rol

oyunmaktadır (Simpson ve ark., 1997). IL-6 geni insanda 7p15-p21 kromozomunda bulunur (Bowcock ve ark., 1988, Hirano ve ark., 1986) ve 5 ekson ve 4 intron içermektedir (Yasukawa ve ark., 1987). IL-6 geni 5' ve 3' bölgelerinde polimorfiktir (Bowcock ve ark., 1989, Fishman ve ark., 1998).

IL-6 Reseptörü

IL-6 büyüme ve reseptör sistemi ile farklılaşmayı başlatmaktadır. IL-6 bulunan bölgelerin algılanması, IL-6 reseptörü ve gp 130 arasındaki ilişkiye ile sağlanmaktadır (Simpson ve ark., 1997). IL-6 için iki tip reseptör vardır; hücre içi sinyali başlatmak için IL-6 ile bağlandıktan sonra glikoprotein 130 (gp130) ile bir birlikte oluşturan düşük afiniteli hücre zarı IL-6 reseptörü (IL-6R) ve IL-6 ile bağlanan çözünür bir IL-6 reseptörüdür. Glikoprotein130(gp130), normal bir durumda hücreler tarafından yaygın olarak eksprese edilirken, IL-6R yalnızca hepatositler, nötrofiller, monositler, makrofajlar ve T ve B lenfositleri gibi seçilmiş hücreler tarafından yer almaktadır. Biyolojik rollerine IL-6'nın kendisinden oluşan heksamerik, reseptör IL-6R ve gp130 (IL-6/IL-6R/gp130) aracılığıyla sağlanmaktadır. Bu karmaşık sistemde, çeşitli biyokimyasal fonksiyonların gerçekleşmesi için farklı sinyal mekanizmalarıda etkin rol oynar (Bazan, 1990 ; Bazan, 1992).

2.5.3. IL-6'nin Merkezi Sinir Sistemi Üzerine Etkileri

IL-6 organizmanın immünolojik sistemi düzenlemektedir. IL-6, Th2 hücreleri tarafından üretilir fakat, IL-1 ve TNF- α ile birlikte monosit ve makrofajlar tarafından uyarılmayla da salınır. IL-6 ateş ve akut faz cevabının oluşumunda en önemli mediyatörler olarak karşımıza çıkmaktadır. Yaralanma ve enfeksiyon durumunda merkezi sinir sisteminde IL-6 sentezi birlikte, fizyolojik durumlarda da eksprese edildiği bilinmektedir. IL-6 beyinde lokalize inflamatuvar sonucu olarak astrositler ve mikroglialar tarafından salgılanır. Merkezi sinir sisteminde inflamatuvar etki göstermektedir. Merkezi sinir sistemi patolojilerinde IL-6 genellikle meningokokkal menenjit, HIV-1 ile olan nörotropik viral enfeksiyonlarda görülmektedir. Tonik klonik nöbetlerde hem serumda hem de beyin omurilik sıvısında (BOS) IL-6 düzeylerinde önemli oranda yükselme saptanmıştır. Epileptik hastalarda IL-6'nın üretimi, nöbetin yayıldığı alan ve süresine bağlı olarak farklılık gösterir. Basit parsiyel bir nöbetten

daha çok kümeler şeklinde tekrarlayan tonik-klonik nöbetler sonrasında IL-6 oranında yükselme daha belirgin olarak görülmektedir.

2.5.4. IL-6'nın Hastalıklarla İlişkisi

İlk başta IL-6 geninin kardiyak mikzoma hastalarında poliklonal B hücrelerindeki anormallikler tarafından ekspresyonun sonucu kaynaklandığı gösterilmiştir (Hirano ve ark. 1987). Kardiyak mikzomalı hastalar hipergammaglobulinemi, otoantikör varlığı ve akut faz proteinlerinin artışı gibi çeşitli otoimmün belirtilere rastlanmaktadır. B hücrelerindeki anormalliklerin, IL-6'ya bağlı olması ilk kardiyak mikzomalı hastalarda görülmüştür (Hirano ve ark.1987; Jourdan ve ark.1990). IL-6 üretiminde görülen anormal durumlar inflamasyon, otoimmün hastalıklar, malignite gibi çeşitli hastalıkların oluşmasında rol almaktadır (Weissenbach ve ark. 1980). IL-6 üretimindeki anomaliler, Castleman's hastalığı (Yoshizaki ve ark.1989) ve romatoid artrit hastalarında rastlanmaktadır (Hirano ve ark.1988; H oussiau ve ark. , 1988; Bhardwaj ve ark. , 1989). IL-6 üretimi farelerde tip II kollojen artrit ve proliferatif glomerulonefrit ile otoimmün hastalıkların (MRL/lpr) (Tang ve ark.20 1991) oluşumunda görülmektedir. IL-6, β hücreleri ve tiroit bezinden de üretilmektedir (Bendtzen ve ark. , 1989; Campbell ve ark. ,1989)

2.6. TOSİLİZUMAB:

Tosilizumab, çözünebilir ve zara bağlı interlökin 6 reseptörlerine (IL-6R) yönelik immünoglobulin G1 κ alt sınıfının rekombinant, anti-insan monoklonal antikördür. Molekül, fare anti-insan IL-6 reseptörünün tamamlayıcılık belirleyici bölgesinin insan IgG1'e aşılınmasıyla üretilen, genetiği değiştirilmiş insanlaştırılmış monoklonal bir antikördür. Tosilizumab, bunu yaparken IL-6'nın reseptörlerine bağlanmasını inhibe eder (Sheppard ve ark. , 2017).

İnsan IL-6 reseptörünün (IL-6R) hem çözünebilir hem de zara bağlanarak bu sitokinin proinflamatuvar aktivitesini azaltır (Srirangan ve Choy, 2010) İnsan IL 6 geni, kromozom 7p21 ile eşleşmiştir ve 184 aminodan oluşur. IL-6, B hücresi uyarıcı faktör-2 olarak adlandırılır ve B hücrelerinin immünoglobulin salgılayan farklılaşmasında önemli bir rol oynar. Hücreler IL-6 biyolojik aktivitelerini 2 molekül aracılığıyla gösterir: IL-6R (IL-6Ra, gp80 veya CD126 olarak da bilinir) ve trans membran proteini gp130 (Sheppard ve ark. ,2017). Hedef hücrelerde IL-6, IL-6R'ye bağlanır.

IL-6/IL-6R kompleksi, 130 kDa transmembran proteini gp130 ile birleştğinde sinyal oluşur ve gp130'un dimerizasyonu, gp130'un sitoplazmik kısmını fosforile eden Janus kinazların (JAK'ler) aktivasyonuna yol açar (Mihara ve ark. ,2012). Gp130 aktivasyonu, akut faz protein genlerinin ekspresyonuna yol açar (Luchtefeld ve ark. ,2011). IL-6R'nin çözünür formu, zara bağlı IL-6R'nin sınırlı alternatif olarak eklenmiş bir mRNA'dan translasyonla üretilir. IL-6 kompleksi ve çözünebilir IL-6R uyarabilir ve bu sinyal modu IL-6 trans-sinyali olarak adlandırılırken, zara bağlı IL-6R yoluyla sinyal, IL-6 klasik sinyali olarak adlandırılır (Garbers ve ark. 2011).

IL-6'ya pleiotropik sitokin denir. B hücrelerinin antikor üreten hücelere farklılaşmasını indükleyen T hücrelerinden türetilmiş bir faktördür ve aynı zamanda çeşitli biyolojik aktivitelere sahip çok sayıda hücre tipini etkilediği de bilinmektedir. IL-6'nın bağışıklık sistemi hücreleri tarafından salgılanmaktadır. Uyarıldıklarında nötrofiller ve monositler veya makrofajlar. IL-6 salgılanması üzerine endotel hücreleri salınır daha fazla bağışıklık hücresi ve hepatosit toplayan hemokinler, akut faz proteinlerini sentezler ve salgılar(Honjo ve ark. , 2014). IL-6'nın ayrıca T yardımcı hücrelerinin farklılaşmasında ve interlökin 17 (IL-17) üreten T yardımcı 17 hücreleri (Th17) ile düzenleyici T hücreleri (Treg) arasındaki dengenin düzenlenmesinde önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir. IL-6 ve dönüştürücü büyüme faktörü b (TGF-b), tanımlanmış bir T yardımcı alt kümesi olan Th17 hücre farklılaşmasıyla sonuçlanır. Ayrıca, T hücresi reseptör aktivasyonu üzerine insan T hücrelerinin, membrana bağlı IL-6R'yi parçaladığı ve çözünebilir IL-6R'yi serbest bıraktığı da açıklanmıştır. Sonuç olarak, bu T hücreleri artık IL-6'ya yanıt vermez. Ancak Th17 hücrelerine farklılaşma için çözünür IL-6R'ye ihtiyaç duyarlar. Bu nedenle, Th17 hücrelerinin farklılaşmasının etkili olması için IL-6 ile başlangıç uyarımı, IL-6 ve sIL-6R uyarımı ile takip edilmelidir. TGF-b ve IL-6/çözünür IL-6R kompleksi ile uyarım, inflamatuvar durumlar için önemli olduğu kabul edilen Th17 hücrelerinin daha sürekli ve uzun süreli oluşumuna neden olur (Kimura , 2010).

IL-6, T hücreleri, B hücreleri, lenfositler, monositler ve fibroblastlar gibi çeşitli hücrelerle etkileşime girdiğinden ateş, döküntü, lenfadenopati, hepatosplenomegali, anemi ve zayıf büyüme birçok belirtisiyle ilişkilidir. IL-6 farklılaşmayı,

mineralizasyonu inhibe eder ve insan osteoblast T hücre kültürlerinin ve inflamatuvar sitokinlerin apoptozunu artırabilir (Reiff, 2012).

IL-6 ve IL-6R'ye karşı nötrleştirici antikor olarak Tosilizumab, hem klasik hem de trans sinyal yollarını bloke eder. Tosilizumab, IL-6-sIL-6R kompleksini ayrıştırabilir ancak IL-6-sIL-6R-sgp130 kompleksini ayrıştıramaz; bu, IL-6-sIL-6R kompleksinin IL-6-sIL-6R'den daha az katı olduğunu gösterir. IL-6 trans-sinyallemesi proinflamatuardır, oysa membrana bağlı IL-6R yoluyla klasik IL-6 sinyallemesi sitokinin rejeneratif veya antiinflamatuvar aktiviteleri için gereklidir. IL-6 biyolojisine ilişkin bu ayrıntılı bilgi, sitokin IL-6'nın blokajını amaçlayan terapötik stratejiler açısından önemli sonuçlara sahiptir (Caparbo ve ark. 2009).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

C6 Glioma hücre hatları American Type Culture Collection (ATCC), penisilin/streptomisin (10,000U/mL), high glucose dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), fetal sığır serumu (FBS), tripsin-EDTA çözeltisi, tosilizumab (selektif IL-6 inhibitörü) ve hücre kültürü çalışması için sarf malzemeleri kullanılmıştır.

3.2. Hücre Kültürü

ATCC' den tarafından elde edilen olan C6 glioma hücreleri steril koşullar altında 37°C ve %5 CO₂'li ortamda, 25 cm²'lik flasklarda, %1 L-glutamin, %1 penisilin-streptomisin ve %10 fetal sığır serumu içeren DMEM hücre kültür besiyeri içinde çoğaltılmıştır. Hücreler %80 yoğunlukta pasaj yapılarak üçüncü pasajı çalışmalarından sonra çalışmaya başlanmıştır. Çalışmada C6 hücre hattının seçmemizdeki amacımız NMDA aracılı glutamat toksisite modeli için yapılan çalışmalarla uygunluğunun daha etkin olarak belirlenmiş olmasıdır (Kritis vd. , 2015). C6 glioma hücrelerinde glutamat toksisitesi için diğer yapılan çalışmalarda belirlenen 10 mM doz ve 24 saat inkübasyon süresi kullanılmıştır. (Park ve ark, 2019). Yapılan in vitro çalışmalara dayanarak, Tosilizumab için kullanılacak dozlar: 3, 6, 12, 25 ve 50 µM olarak belirlenmiştir (Xue ve ark, 2022; Chang ve ark, 2022).

Uygulama prosedürü

Kontrol grubu: Bu gruba bir işlem uygulanmamıştır.

Glutamat grubu: Bu grupta ise 24 saat 10 mM glutamat ile inkübasyona bırakılmıştır.

Tosilizumab grubu: 24 saat: 3, 6, 12, 25 ve 50 µM µM Tosilizumab ile inkübasyon yapılmıştır.

Tosilizumab + glutamat grubu: : 3, 6, 12, 25 ve 50 µM 1 saat µM Tosilizumab ile inkübasyon sonrası 24 saat 10 mM glutamat ile inkübasyon yapılmıştır.

Bir saat ön tedavi süresi diğer yapılan çalışmalara kontrol edilip ve laboratuvarımızda daha önce gerçekleştirdiğimiz araştırmalar bakılarak belirlenmiştir (Park ve ark, 2019; Taskiran ve ark, 2021).

3.3. XTT Hücre Canlılık Testi

Tosilizumab'ın glutamat toksisitesi sonrası hücre canlılığını değerlendirmek için mitokondriyal enzimler aracılığıyla renk veren XTT (Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, İsrail) testi kullanılmıştır. Yapılan XTT testi, metabolik olarak aktif olan hücrelerin bir tetrazolyum tuzu turuncu formazan bileşenlerine indirgemeleri yöntemini kullanılmaktadır. Oluşan boya suda çözünebilir özellikte olmakla birlikte boya yoğunluğu bir spektrofotometre yardımıyla verilen dalga boylarında okutulabilmektedir. Boya yoğunluğu (turuncu renk), metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile orantılıdır.

Testin Uygulama Aşamaları

Sitotoksosite için öncelikle her kuyuda 10×10^3 hücre olacak şekilde hücre alınara steril 96 kuyucuklu mikro plakaya ekildi ve hücrelerin yapışması için 24 saat beklendi. Beklenme sonrası hücreler üzerindeki besi yeri uzaklaştırılıp, kuyucuklar PBS ile yıkandı, deney gruplarında olduğu gibi Tosilizumab belirli konsantrasyonlarda hücreler üzerine uygulandıktan 1 saat sonra glutamat (hacim değişikliği sonrası konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde uygulandı 24 saat inkübasyon gerçekleştirildi, 24 saatin sonunda besi yeri uzaklaştırıldı ve hücreler üç defa PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra her bir kuyucuğa 100 µl şeffaf (renksiz) DMEM ve bununda üzerine 50 µl XTT solüsyonu eklenerek CO²'li etüvde 4 saat inkübe edilecektir. İnkübasyon süresi sonunda optik dansite değeri mikropłaka okuyucuda (Spectrostar Nano, Allmendgrün, Almanya) 450 nm'de okunarak, kontrol grubunun hücre canlılık oranı %100 olarak kabul edilip % Hücre canlılık = (Konsantrasyon O.D. / Kontrol O.D.) X 100 formülünden yararlanarak hesaplanmıştır.

3.4. Total Antioksidan (TAS) ve Total Oksidan (TOS) Seviyelerinin Ölçümü

Hücre lizatlarında Tosilizumab'ın glutamat toksisitesi sonrası oksidatif stres üzerine etkilerini değerlendirmek için kolorometrik TAS, TOS (Rel Assay Diagnostics, Antep, Türkiye) ölçümü ticari kitleri kullanılmıştır.

Yöntemin Uygulama Aşamaları

TAS için:

96'lık plaka içerisinde yer alan ilk kuyucuğa 18 µL dH₂O (distile su), ikinci kuyucuğa kitin içinde bulunan QC Level 2 (Trolox, 2.0 mmmol/L)'den 18 µL, üçüncü kuyucuğa kitin içinde bulunan QC Level 1 (Trolox, 0.5 mmmol/L)'den 18 µL eklenmiştir ve dördüncü kuyucuğa da kitin içinde bulunan standart (Trolox, 1 mmmol/L) solüsyonundan 18 µL olacak şekilde eklenmiştir. Beşinci kuyucuktan itibaren hücre lizatları 18 µL olarak eklenmiştir. Kitin içinde bulunan reagent 1 (Buffer Solüsyon) solüsyonu tüm plate 300 µL eklenip 30 sn çalkalama işlemi yapıldıktan sonra mikrolaka okuyucuda (Spectrostar Nano, Allmendgrün, Almanya) 660 nm dalga boyunda okutuldu. Çıkan absorbans değerleri ilk okutma (A1) olarak kaydedilmiştir. Kitin içinde bulunan reagent 2 (Kromojen Solüsyon) solüsyonu tüm örnekler 45 µL eklenip 15 sn çalkalama işlemi yapıldıktan sonra oda ısısında 10 dk inkübe edilip tekrar 5 sn çalkalama yaptıktan sonra mikrolaka okuyucuda 660 nm dalga boyunda olacak şekilde ayarlanıp okutuldu. Çıkan absorbans değerleri ikinci okutma (A2) olarak kaydedilmiştir. Absorbans farkları hesaplandı: $A2 - A1 = \Delta Abs$ Absorbans değerleri ile gerekli hesaplamalar kit tarafından belirlenen formül ($[\Delta Abs \text{ dH}_2\text{O} - \Delta Abs \text{ Örnek}] / [\Delta Abs \text{ dH}_2\text{O} - \Delta Abs \text{ Standart}]$) yapıp örneklerin miktarları belirtildi. Kitin çalışma uygunluğu QC Level 2 ve QC Level 1 seviyelerinin doğru şekilde belirlediğine bakılarak belirlenmiştir.

TOS için:

96'lık plaka içerisinde yer alan ilk kuyucuğa 45 µL standart (H₂O₂, 10 µmol/L), ikinci kuyucuğa kitin içinde bulunan QC Level 1 (H₂O₂, 10 µmol/L)'den 45 µL ve üçüncü kuyucuğa da kitin içinde bulunan QC Level 2 (H₂O₂, 10 µmol/L)'den 45 µL olacak şekilde eklenmiştir. Dördüncü kuyucuktan itibaren hücre lizatları 45µL olarak eklenmiştir. Kitin içinde bulunan reagent 1 (Buffer Solüsyon) solüsyonu tüm plate 300 µL eklenip 30 sn çalkalama işlemi yapıldıktan sonra mikrolaka okuyucuda (Spectrostar Nano, Allmendgrün, Almanya) 530 nm dalga boyunda okutuldu. Çıkan absorbans değerleri ilk okutma (A1) olarak kaydedilmiştir. Kitin içinde bulunan reagent 2 (Kromojen Solüsyon) solüsyonu tüm örnekler üzerine 15 µL eklenip 30 sn çalkalama işlemi yapıldıktan sonra oda ısısında 10 dk inkübe edilip tekrar 5 sn çalkalama yaptıktan sonra mikrolaka okuyucuda 530 nm dalga boyunda

okutulmuştur. Çıkan absorbans değerleri ikinci okutma (A2) olarak kaydedilecektir. Absorbans farkları hesaplandı: $A2 - A1 = \Delta Abs$ Absorbans değerleri ile gerekli hesaplamalar kit tarafında belirlenen formül ($\Delta Abs \text{ Örnek} / \Delta Abs \text{ Standart}$] ile yapıp örneklerin miktarları belirlenmiştir. Kitin çalışma uygunluğu QC Level 2 ve QC Level 1 seviyelerinin doğru şekilde belirlediğine bakılarak belirlenmiştir.

3.5. İndüklenebilir NOS (iNOS) ve Nitrik Oksit(NO) Seviyelerinin Ölçümü

Hücre lizatlarında Tosilizumab'ın Nitrik Oksit (201-11-0704. Rat nitric oxide(NO) ELISA Kit. 96 Test. Sunred) ve indüklenebilir nitrik oksit sentezi (iNOS)(201-11-0741. Rat inducible nitric oxide synthase(iNOS)ELISA Kit. 96 Test. Sunred) seviyelerinin üzerine etkilerini değerlendirmek için Rat NO ve iNOS sandviç ELISA ticari kitleri kullanılmıştır.

Yöntemin Uygulama Aşamaları

Üreticinin talimatlarına göre, kit içerisinde yer alan standart ve hücre lizatları yükleneyecek ve 37 °C derecede 60 dk inkübe edildi. Ardından yıkama işlemi yapılacak ve boyama solüsyonları eklenerek 37 °C derecede 15 dk tekrar inkübasyona bırakılacaktır. Durdurma solüsyonu eklenecek ve 450 nm dalga boyunda mikropilaya okuyucuda (Spectrostar Nano, Allmendgrün, Almanya) okutuldu. Standartların absorbanlarına göre doğrusal bir grafik oluşturuldu. Bu grafikte elde edilen denklem yardımıyla örneklerin değerleri hesaplanmıştır. ELISA yönteminde uygulanacak basamaklar

ELISA Yöntemiyle iNOS ve NO Seviyesi Ölçüm Basamakları

ELISA kitinde bulunan ve içerdiği madde miktarı belli olan standart solüsyonu çıkarılıp standart dilüsyon solüsyonu ile ependorflar içine her seferinde madde miktarı bir önceki miktarın yarısı olacak şekilde 5 kez dilüe edilerek standartlar konsantreleri hazırlandı. Kitin içinde yer alan 96'lık plaka içerisinde yer alan ilk kuyucuk kör olarak kullanıldı ve bu kuyucuğa kromojen solüsyon A, kromojen solüsyon B ve stop solüsyonu eklenmiştir. 2. Kuyucuktan başlanarak 50 µL hazırlanmış olan standart solüsyonlardan farklı kuyucuklara eklendi ve üzerlerine 50 µL streptavidin-HRP solüsyonu eklenmiştir. Ardından kuyucuklara 50 µL örnekler yüklenerek üzerlerine 10 µL antikor (her ölçüm için spesifik olan) konuldu ve 50 µL streptavidin-HRP solüsyonu eklenmiştir. Plaka 37'de 60 dk inkübasyona bırakıldı. Bu arada kitin içinden

ıkan 30X olan yıkama solüsyonu yıkama işlemini için distile su ile 1X olacak şekilde dilüe edilerek hazırlandı. İnkübasyon sonrası plaka 1X olarak hazırlanmış yıkama solüsyonu ile 3 defa yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından her bir kuyucuğa 50 µL kromojen solüsyon A ve 50 µL kromojen solüsyon B uygulanmıştır. Plaka 37°C’de 15 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası yıkama yapılmaksızın kuyucuklara 50 µL stop solüsyonu eklendi. Plaka 450 nm dalga boyunda 2 kez okutulacak ve bu okumaların ortalamaları alınarak kaydedildi. Standartlara karşılık gelen absorbans değerleri ile doğrusal bir grafik çizilmiştir. Doğrusal grafiğin denklemi ile örneklerin miktarları belirlenmiştir.

3.6. Total Protein Ölçümü

Hücre lizatlarından elde edilen verilerin normalize edilmesi amacıyla örneklerde total protein tayini yapıldı. Bu amaçla Bradford yöntemi kullanılmıştır.

Bradford total protein tayini basamakları Bradford Yöntemiyle Total Protein Tayini Basamakları

Bovine serum albümininden (BSA) 5 µg/ml olacak şekilde solüsyon hazırlanmıştır ve seri dilüsyon yapılarak standartlar (50, 25, 12, 6, 3 µM) oluşturuldu.

Standartlardan ve örneklerden ikişer tekrarlı olmak üzere 10 µL alınarak 96’lık boş plakaya eklenecek ve üzerlerine 200 µL ticari olarak hazırlanmış olan Bradford solüsyonu eklenmiştir. 595 nm dalga boyunda okutulmuştur. Standartların absorbanslarına göre doğrusal bir grafik oluşturulmuştur. Grafikte elde edilen doğrusal denklem aracılığıyla örneklerin değerleri hesaplanmıştır.

3.7. İmmü Floresan Yöntemler

IL-6 reseptör protein ekspresyonlarında Tayini Hücrelerde

Tosilizumab’ın glutamat toksisitesi sonrası tespit etmek için bu proteine IL-6 reseptör protein ekspresyonlarında spesifik bağlanma özelliğinde bulunan primer antikor ile bağlanması sağlanacak daha sonra sekonder antikor yardımıyla immü floresan yöntem kullanılarak görünür hale getirilmiştir. Görüntüleme için floresan özellikli mikroskop (Carl Zeiss, Jena, Almanya) kullanılmıştır.

Yöntemin Uygulama Aşamaları

48'lik plate'e hücreler ekilecek ve hücrelerin yapışması için bir gün beklenmiştir. Ertesi gün deney gruplarına ilaçlar yukarıda belirtildiği şekilde uygulanmıştır. Ertesi gün plate'deki ilaç içeren besi yerleri uzaklaştırılmıştır Hücreler metanolde 10 dk fikse edildi. 3 kez PBS ile yıkanmıştır. %0,1 Triton-X 100 içeren solüsyonu ile 15 dk inkübe edilmiştir. 3 kez PBS ile yıkanmıştır. %2'lik BSA'da oda ısısında 60 dk inkübe edildi. 3 kez PBS ile yıkanmıştır. %0,1'lik BSA ile 1:100 sulandırılan IL-6 antikoru (Proteintech; Kat. No:19013-1-AP) ile +4'te bir gece bekletildi. Ertesi gün antikorlar çekilecek ve örnekler PBS ile 3 kez yıkanmıştır. %0,1'lik BSA ile 1:100 sulandırılan floresans bağlı (FITC) sekonder antikor (Proteintech; Kat. No: SA00003-2) ile 1 saat oda ısısında karanlık ortamda bekletildi. 3 kez PBS ile yıkanmıştır. Çekirdekleri görünür hale getirmek için DAPI (0.1 µg/mL) damlatılarak ve 15 dk oda ısısında karanlık ortamda bekletildi. 3 kez PBS ile yıkandı. Floresan mikroskop altında (Carl Zeiss, Jena, Almanya) her örnek için aynı floresan dalga maruziyet süresi içinde farklı alanlardan görüntüler alındı ve hesaplamalar için kaydedildi.

3.8. Hücresel ROS Ölçümü

Hücrelerde Tosilizumab'ın glutamat toksisitesi sonrası ROS üretimi üzerine etkilerini değerlendirmek için immünfloresan DCFDA/H2DCFDA (Abcam, Cambridge, İngiltere; Kat. No: ab113851) kiti kullanılmıştır.

Yöntemin Uygulama Aşamaları

Hücreler 96'lik plate'e hücreler ekilecek ve hücrelerin yapışması için bir gün beklenmiştir. Ertesi gün deney gruplarına ilaçlar yukarıda belirtildiği şekilde uygulanmıştır. 24 saat sonra plate'deki ilaç içeren besi yerleri uzaklaştırıldı. Kit içerisinden çıkan "Buffer" çözeltisiyle kuyucuklar yıkanmıştır. 100 µl DCFDA eklenerek hücreler oda ısısında 45 dk karanlık ortamda inkübe edildi. Buffer çözeltisiyle kuyucuklar yıkanmıştır. Floresan mikroskop altında (Carl Zeiss, Jena, Almanya) her örnek için aynı floresan dalga maruziyet süresi içinde farklı alanlardan görüntüler alındı ve hesaplamalar için kaydedilmiştir.

3.9. TUNEL ile Apoptoz Tayini

Hücrelerde Tosilizumab'ın glutamat toksisitesi sonrası apoptozu değerlendirmek için immünfloresan TUNEL (Merc, Maryland, Amerika; Kat. No:11684795910) boyası kullanılmıştır.

Yöntemin Uygulama Aşamaları

48'lik plate'e hücreler ekilecek ve hücrelerin yapışması için bir gün beklenmiştir. Ertesi gün deney gruplarına ilaçlar yukarıda belirtildiği şekilde uygulandı. Ertesi gün plate'deki ilaç içeren besi yerleri uzaklaştırılmıştır.

3 kez PSB ile yıkanacaktır. %2.5 Formoldehit solüsyonunda 15 dk bekletilerek hücreler fiske edildi. 3 kez PSB ile yıkanmıştır. %2'lik Triton-X 100 eklenecek ve 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. 3 kez PSB ile yıkanmıştır. 25 µl TUNEL karışımından (Kitin içinde hazır olarak çıkan iki komponent birleştirilerek hazırlanmaktadır: 50 µl Enzim Solüsyonu (TdT) + 450 µl Floresan Etiketleme Solüsyonu (fluoresan-dUTP)) eklenecek ve nemli ortamda 90 dk karanlıkta bekletilmiştir. 3 kez PSB ile yıkandı. Çekirdekleri görünür hale getirmek için DAPI (0.1 µg/mL) damlatılacak ve 15 dk oda ısısında karanlık ortamda bekletilecektir. 3 kez PBS ile yıkanmıştır. Floresan mikroskop altında (Carl Zeiss, Jena, Almanya) her önek için aynı floresan dalga maruziyet süresi içinde farklı alanlardan görüntüler alınacak ve hesaplamalar için kaydedilmiştir.

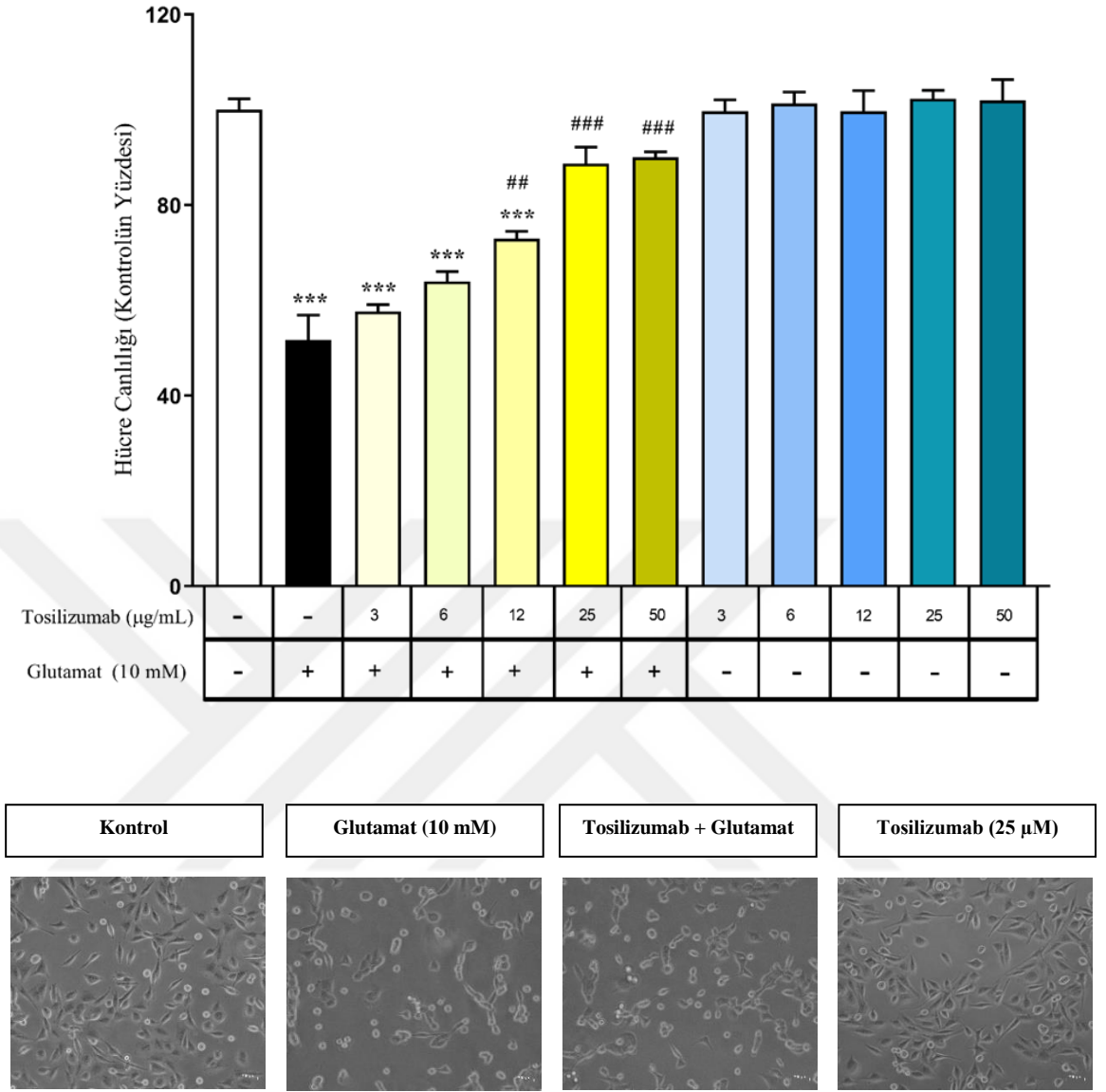
3.10. İstatistiksel Analiz

Absorbanslardan (Kitlerde bulunan formüller ya da standartlardan elde edilmiş doğrusal grafik formülleri ile) ve görüntülerden elde edilecek (Image J programı aracılığı ile mean intensity hesaplaması ile) verilerin tamamı rakamsal karşılığa dönüştürüldü. İstatistiksel değerlendirilmesi SPSS paket programı ile normal dağılım gösteren veriler için tek yönlü ANOVA Varyans Analizi Testi ile ve normal dağılım göstermeyen veriler için ise non-parametrik testler olan Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U testi uygulanarak yapılmıştır. Sonuçlardan $P < 0,05$ olan değerler anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Glutamat Eksitotoksisitesi Oluşturulan C6 Sıçan Glioma Hücre Hattında Tosilizumab Hücre Canlılığına Etki

Glutamat eksitotoksisitesi oluşturulan C6 rat glioma hücre hattında tosilizumab hücre canlılığına etkisi tosilizumab etkin dozunun belirlenebilmesi için XTT testi uygulandı. Tosilizumab grubuna ve glutamat+tosilizumab grubuna: 3, 6, 12, 25 ve 50 μ M miktarlarında tosilizumab uygulandı. ELISA mikropalak okuyucudan elde ettiğimiz absorbans değerleri yüzde canlılık hesaplamasıyla sonuç haline getirildi. XTT sonuçlarına göre C6 hücre hattında 10 mM glutamat uygulanması kontrolle kıyaslandığında anlamlı olarak canlı hücre sayısını azaltmıştır (şekil 4.1, $p<0,05$). Fakat tosilizumab ile inhibisyonu sonrası glutamat uygulanması tek başına glutamat ile maruz kalan hücrelerle kıyaslandığında canlı hücre sayısını artırmıştır (şekil 4.1, $p<0,05$). Elde edilen sonuçlar SPSS 23.0 ile değerlendirildi. Değerlendirme sonucunda Tosilizumab için etkin doz 25 μ M olarak bulundu. İstatistiksel olarak anlamlılık $p<0,05$ olarak tanımlanmıştır.

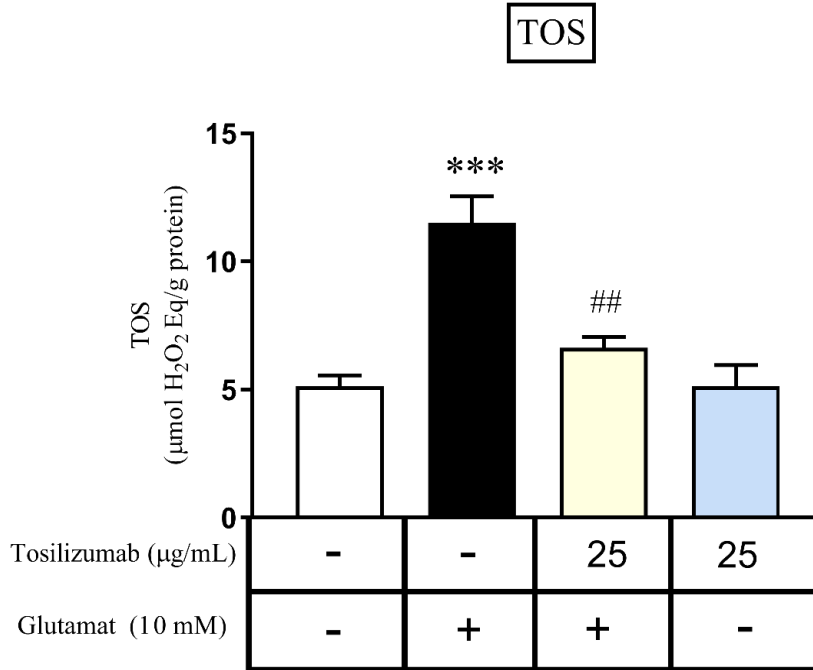
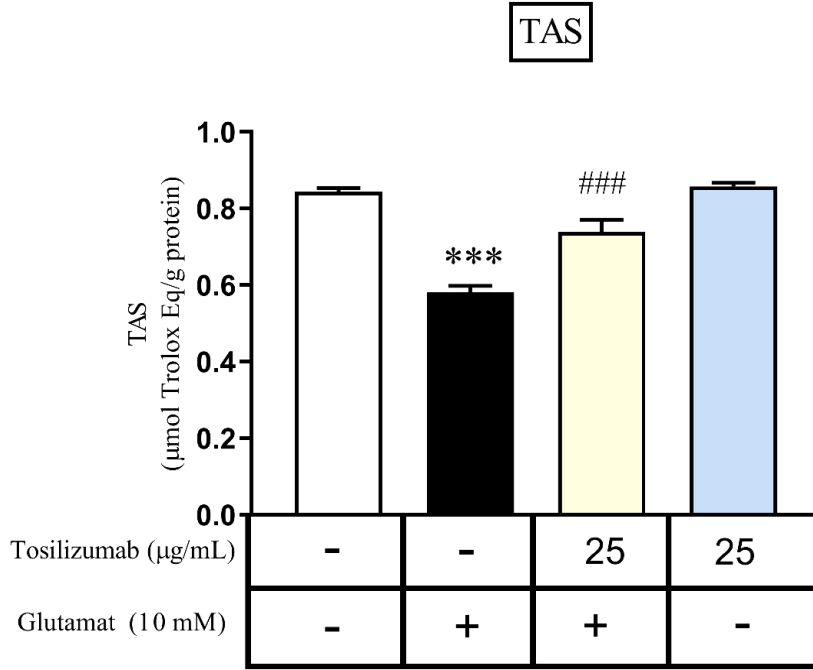


Şekil.4.1.Tosilizuban'ın glutamatla ile oluşturulan eksitotoksitesitesi sonrası hücre canlılığı üzerine etkisinin XTT ile değerlendirilmesi. Veriler Ort. ± SH olarak sunulmuştur. ***P<0,001 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. ###p<0,01 glutamat grubu ile karşılaştırıldığında

4.2. Glutamat Eksitotoksitesisi Oluşturulan C6 Sıçan Glioma Hücree Hattında Tosilizumab'ın Total Antioksidan (TAS) ve Total Oksidan (TOS) Seviyelerinin Ölçümü

Hücree lizatlarında Tosilizumab'ın Glutamat ile oluşturulan eksitotoksisite sonrası oksidatif stres üzerine etkilerini değerlendirmek için kolorometrik TAS, TOS (Rel Assay Diagnostics, Antep, Türkiye) ölçümü ticari kitleri kullanılmıştır. TAS sonuçlarına göre C6 glioma hücrelerine 10 mM glutamat uygulanması kontrolle kıyaslandığında TAS seviyesinde azalma görülmüştür (şekil 4.2, $p<0,001$). Aynı şekilde tosilizumab'ın ile IL-6 inhibisyonu sonrası glutamat uygulanması tek başına glutama'a maruz kalan hücrelerle kıyaslandığında TAS seviyesi değişmemiştir görülmüştür. (şekil 4.2, $p<0,001$).

TOS sonuçlarına göre C6 glioma hücrelerine 10 mM glutamat uygulanması kontrolle kıyaslandığında anlamlı olarak TOS seviyesini artırmıştır (şekil 4. 2, $p<0,001$).). Fakat tosilizumab ile IL-6 inhibisyonu sonrası glutamat uygulanması tek başına glutamat'a maruz kalan hücrelerle kıyaslandığında TOS seviyesini önemli derecede azaltmıştır (şekil 4.2, $p<0,001$). Tek başına Glutamat uygulamaksızın Toisilizumab'ın ise TOS seviyesi kontrolle kıyaslandığında değişmediği görülmüştür ($p>0,05$)

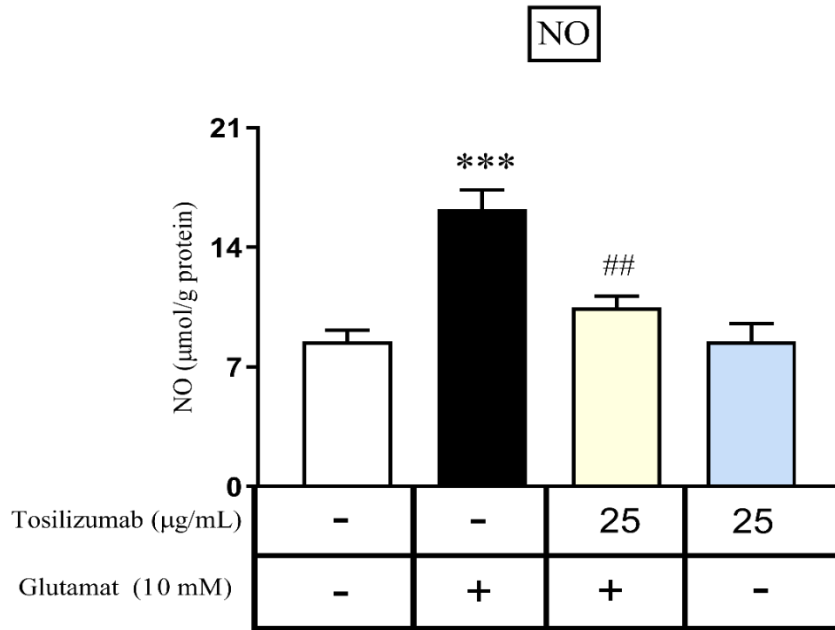
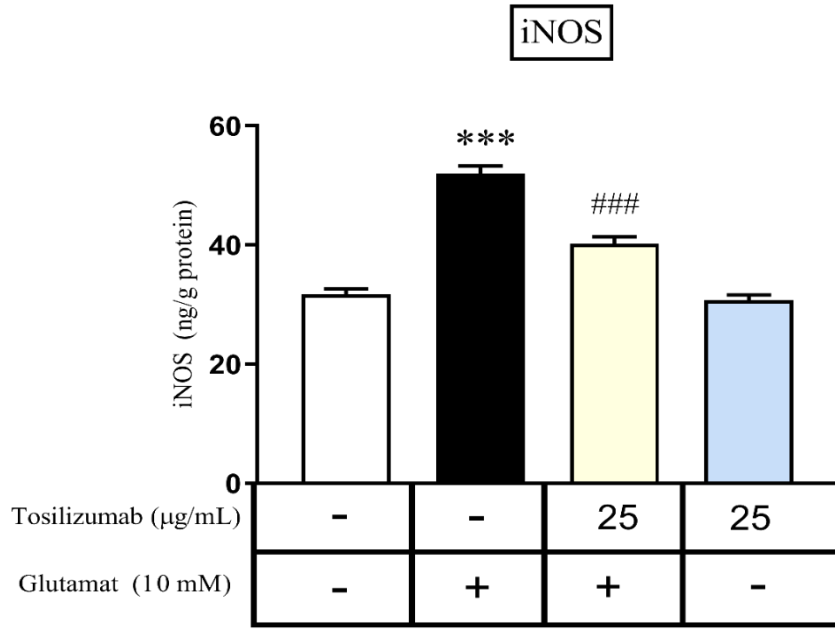


Şekil.4.2. Tosilizumab'ın Glutamat ile oluşturulan eksitotoksisite sonrası antioksidan ve oksidan seviyeleri üzerine etkisinin kolorometrik yöntemi ile değerlendirilmesi. Veriler Ort. ± SH olarak sunulmuştur. ***P<0,001 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. ###P<0,001 ve glutamat ile karşılaştırıldığında

4.3. Glutamat Eksitotoksitesi Oluşturulan C6 Sıçan Glioma Hücree Hattında Tosilizumab NO ve iNOS Seviyelerine Etkisi

Hücree hattında tosilizumab'ın nitrik oksit yolağı üzerine etkilerini ölçmek için fare NO (201-11-0704. Rat nitric oxide(NO) ELISA Kit. 96 Test. Sunred) ve iNOS(201-11-0741. Rat inducible nitric oxide synthase(iNOS)ELISA Kit. 96 Test. Sunred) sandviç ELISA ticari kitler kullanılmıştır. ELİSA sonuçlarına göre C6 hücrelerine 10 mM glutamat uygulanması kontrolle kıyaslandığında anlamlı olarak iNOS seviyelerini artırmıştır (Şekil.4.3, $p<0,001$). Fakat tosilizumab ile IL-6 inhibisyonu sonrası glutamat uygulanması tek başına glutamat'a maruz kalan hücrelerle kıyaslandığında iNOS seviyesini önemli derecede azaltmıştır (Şekil 4.3, $p<0,001$). Tek başına glutamat uygulamaksızın tosilizumab'ın ise iNOS seviyesi kontrolle kıyaslandığında değişmediği görülmüştür (Şekil.4.3, $p>0,05$).

Elisa sonuçlarına göre C6 glioma hücrelerine 10 mM glutamat uygulanması kontrolle kıyaslandığında anlamlı olarak NO seviyelerini artırmıştır (Şekil 4.3, $p<0,001$). Fakat tosilizumab'ın ile IL-6 inhibisyonu sonrası Glutamat uygulanması tek başına glutamat'a maruz kalan hücrelerle kıyaslandığında NO seviyesini önemli derecede azaltmıştır (Şekil 4.3, $p<0,01$). Tek başına Glutamat uygulamaksızın tosilizumab'ın ise NO seviyesi kontrolle kıyaslandığında değişmediği görülmüştür (Şekil.4.3, $p>0,05$)

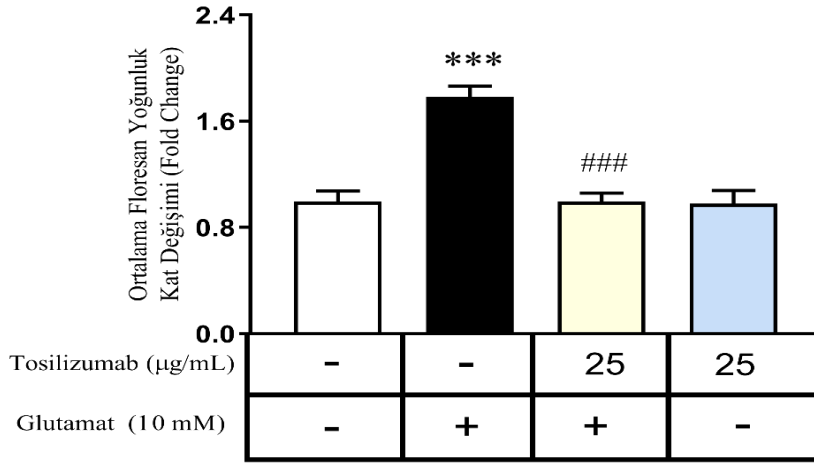
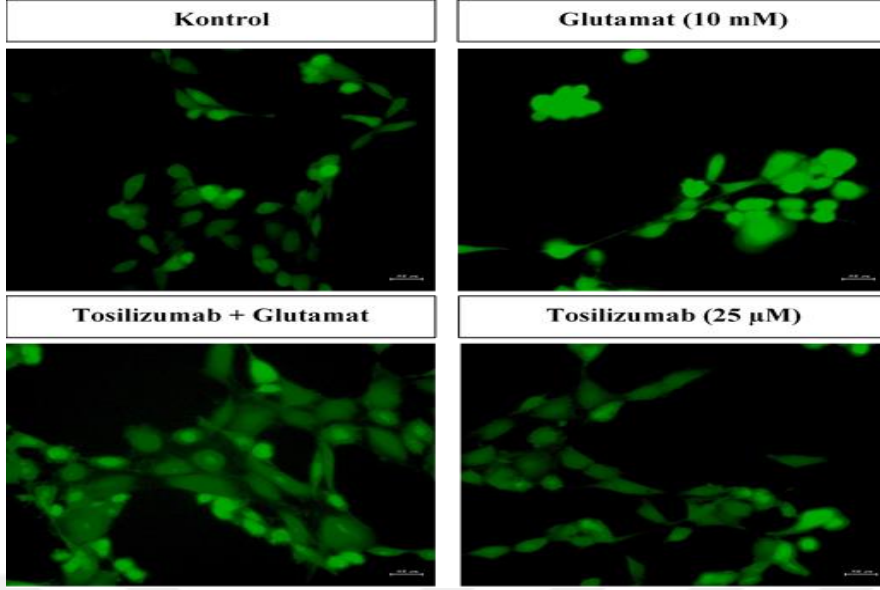


Şekil.4. 3. Tosilizumab glutamat ile oluşturulan eksitotoksitite sonrası iNOS VE NO seviyeleri üzerine etkisinin ELİSA yöntemi ile değerlendirilmesi. Veriler Ort. \pm SH olarak sunulmuştur. ***P<0,001 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ve ##P<0,01 glutamat grubu ile karşılaştırıldığında.

4.4. Glutamat Eksitotoksitesisi Oluşturulan C6 Sıçan Glioma Hücree Hattında Tosilizumab ROS Seviyelerine Etkisi

C6 glioma hücrelerine 10 mM glutamat uygulanması kontrolle kıyaslandığında anlamlı olarak ROS seviyesini artırmıştır (Şekil 4.4. , $p<0,001$). Fakat tosilizumab ile IL-6 inhibisyonu sonrası glutamat uygulanması tek başına glutamat'a maruz kalan hücrelerle kıyaslandığında ROS seviyesini önemli derecede azaltmıştır(Şekil 4.4. , $p<0,001$). Tek başına glutamat uygulamaksızın tosilizumab'ın ise ROS seviyesi kontrolle kıyaslandığında değişmediği görülmüştür (Şekil 4.4. , $p>0,05$)

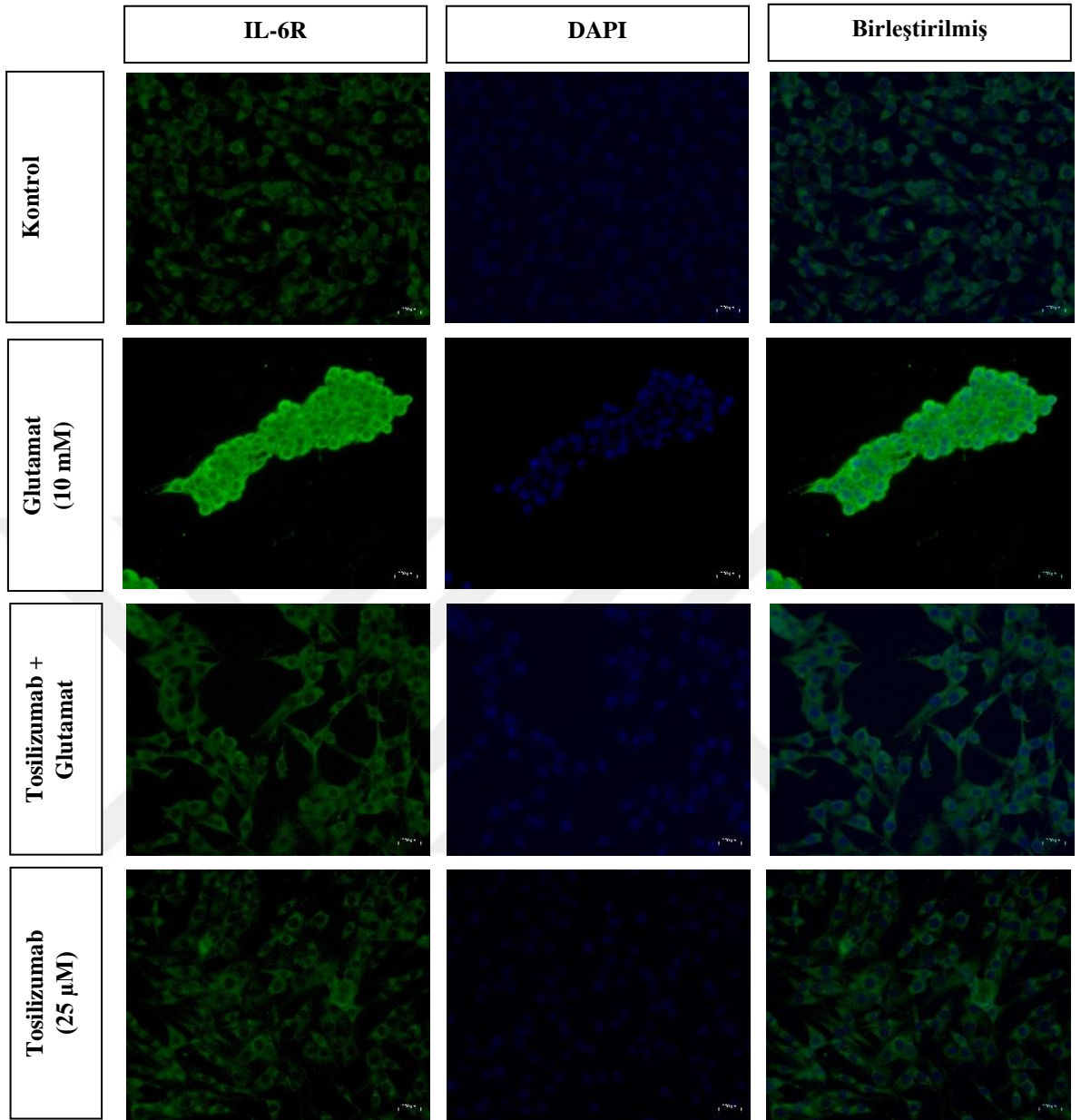


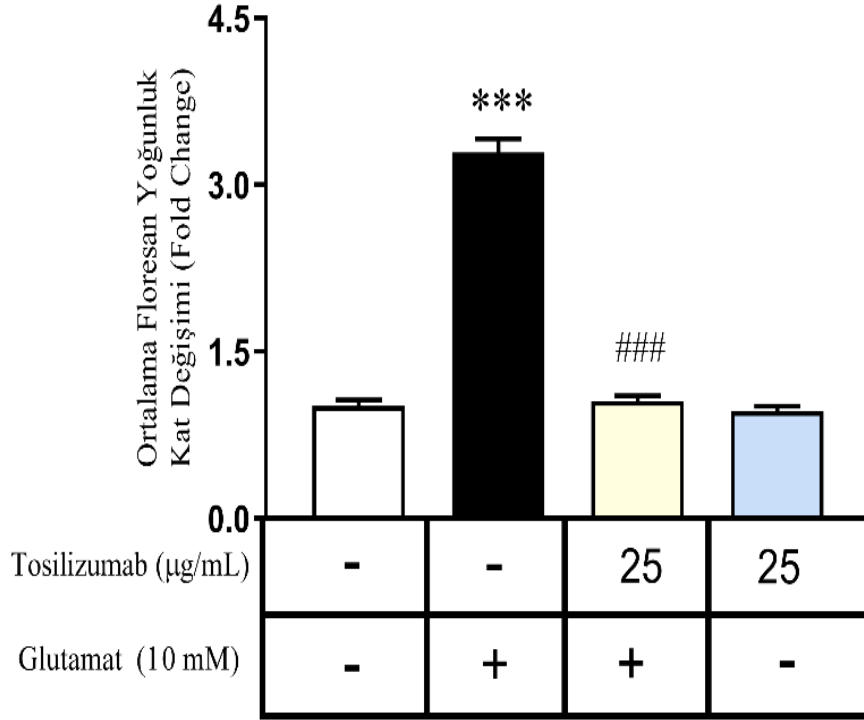


Şekil 4.4. Tosilizumabın glutamat eksitotoksitesisi sonrası C6 glioma hücrelerinde hücrel ROS seviyesi üzerideki etkisinin DCFDA boyama ile değerlendirilmesi. Veriler Ort. ± SH olarak sunulmuştur. *** $P < 0,001$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. ### $P < 0,001$ glutamat grubu ile karşılaştırıldığında.

4.5. Glutamat Eksitotoksitesi Oluşturulan C6 Sıçan Glioma Hücree Hattında Tosilizumab IL-6 Reseptör Seviyelerine Etkisi

İmmun floresan boyama sonuçlarına göre C6 glioma hücrelerine 10 mM Glutamat uygulanması kontrolle kıyaslandığında IL-6 reseptör protein seviyelerini anlamlı olarak artırmıştır (Şekil 4.5. , $p<0,001$). Fakat tosilizumab ile IL-6 reseptör inhibisyonu sonrası glutamat uygulanması tek başına glutamat'ın maruz kalan hücrelerle kıyaslandığında IL-6 reseptör protein seviyesini anlamlı olarak azaltmıştır (Şekil 4.5. , $p<0,001$) Tek başına glutamat uygulamaksızın tosilizumab'ın ise kontrolle kıyaslandığında IL-6 reseptör protein seviyesini değiştirmemiştir (Şekil.4.5. , $p>0,05$)



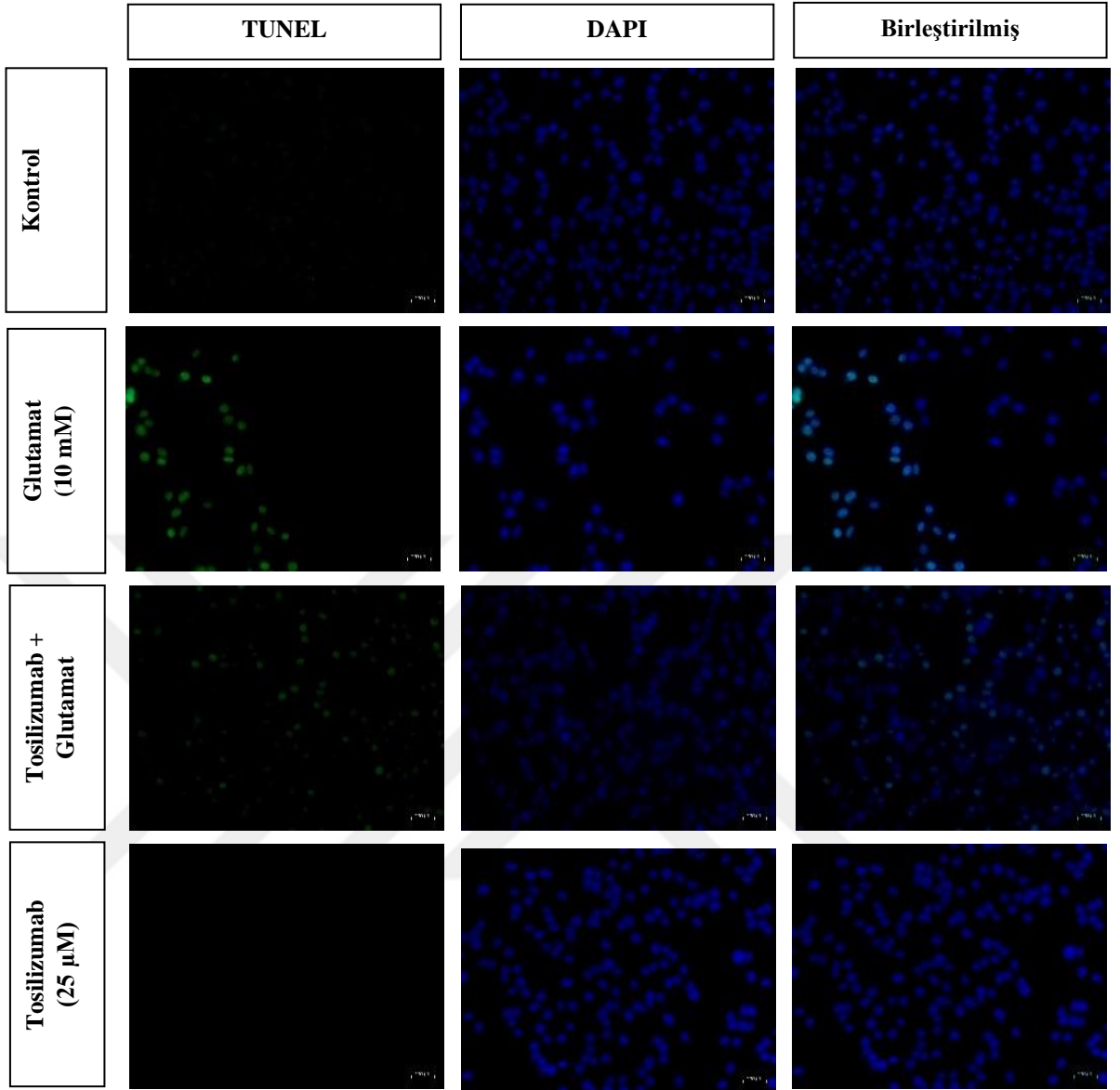


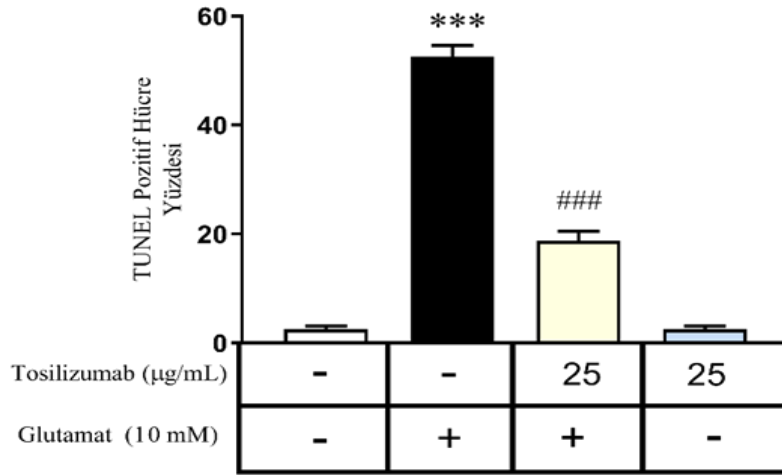
Şekil 4.5. Tosilizumabın glutamat eksitotoksitesi sonrası C6 glioma hücrelerinde IL-6R üzerine etkisinin floresan boyama ile değerlendirilmesi. Farklı gruplarda astroglial hücrelerin 40X'lik büyütmede IL-6R ve DAPI çekirdek boyaması sonrası floresan mikroskopisi altında morfolojik görünümü. Veriler Ort. ± SH olarak sunulmuştur. *** $P < 0,001$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.### $P < 0,001$ glutamat grubu ile karşılaştırıldığında.

4.6. Glutamat Eksitotoksitesi Oluşturulan C6 Sıçan Glioma Hücree Hattında Tosilizumab TUNEL Hücree Sayısı Üzerindeki Etkisi

TUNEL sonuçlarına göre C6 glioma hücrelerine 10 mM glutamat uygulanması kontrolle kıyaslandığında anlamlı olarak TUNEL pozitif hücre sayısı artmıştır (Şekil 4.6, $p < 0,001$). Fakat tosilizumab ile IL-6 inhibisyonu sonrası glutamat uygulanması tek başına glutamat'a maruz kalan hücrelerle kıyaslandığında TUNEL pozitif hücre sayısını azaltmıştır (Şekil 4.6, $p < 0,001$). Tek başına glutamat uygulamaksızın tosilizumab'ın ise TUNEL hücre oranı, kontrolle kıyaslandığında değiştirmemiştir (Şekil.4.6. , $p > 0,05$).







Şekil 4.6. Tosilizumabın glutamat eksitotoksitesi sonrası C6 glioma hücrelerinde apoptoz üzerine etkisinin TUNEL floresan boyama ile değerlendirilmesi. Farklı gruplarda astrogial hücrelerin 40X'lik büyütmede TUNEL ve DAPI çekirdek boyaması sonrası floresan mikroskopisi altında morfolojik görünümü. Veriler Ort. ± SH olarak sunulmuştur. *** $P < 0,001$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. ### $P < 0,001$ glutamat grubu ile karşılaştırıldığında.

5. TARTIŞMA

Glutamat, memeli merkezi sinir sisteminde bulunan önemli uyarıcı nörotransmitterdir. Aşırı salınması, alımının azalması veya reseptör fonksiyonlarının değişmesi nedeniyle birçok merkezi sinir sistemini hastalığının patogeneğinde yer almaktadır. Glutamat eksitotoksitesini serebral iskemi, epilepsi, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı ve multipl skleroz gibi çeşitli nörolojik hastalıklarda rol oynamaktadır. Glial hücrelerin aktivasyonu, nörolojik hastalıklarda proinflamatuvar araçların ekspresyonunu artırır. Ayrıca periferik inflamasyon, glial hücreleri ve nöronları aktive ederek ve KBB geçirgenliğini artırarak nöroinflamatuvar yolları da artırır. Ayrıca periferik bağışıklık ve inflamatuvar hücreler, yapısı bozulmuş KBB yoluyla çok fazla bağışıklık hücreleri beyne göç eder ve beyinde iltihaplanmaya ve doğrudan ya da glial hücreler ve nöron hücreleri yoluyla nöroinflamasyonu daha da artırabilir.

Nöroinflamatuvar hastalıklarda MSS'deki nöronal sistem ve fonksiyonları bozulmaktadır. Nöroinflamasyon, MSS'deki hasarlı glial hücreleri ve nöronal hücreleri onarmaya yönelik koruyucu bir mekanizmadır. Diğer hücrelerin aksine, nöronlar bir kez hasar gördüğünde veya dejenere olduğunda, MSS'de onarılamaz veya yenilenemezler. Nöroinflamasyon beyin için önemli bir koruyucu yanıt, fakat çok fazla inflamatuvar yanıtların oluşması teklikelidir ve nöronal rejenerasyonu engellenmesi sağlar. Mikroglia ve astrosit, periferik inflamatuvar koşullar tarafından etkilenir ve değiştirilir ve dolayısıyla nöroinflamasyon ve nörodejenerasyonu etkiler (Carson ve ark. , 2006)

Tosilizumab, IgG1 alt grubundan, monoklonal antikorudur. Tosilizumab selektif ve aktif şekilde hem serbest hem de hücre membranına bağlı IL-6R'e bağlanır ve IL-6'nın hücre içine sinyal iletimini engelliyerek IL-6 reseptörünün hem çözünür hem de zara bağlanan sitokinlerin proinflamatuvar aktivitesini azalmasını sağlar. IL-6 seviyeleri sağlıklı bir insanda nispeten düşükken, bazı nörolojik durumlarda yükselir, sitokin T hücreleri, B hücreleri, monositler, makrofajlar gibi çeşitli bağışıklık hücrelerine etki ederek iltihaplanmaya neden olur. Tosilizumab Avrupa'da 2009 yılında orta-ciddi Romatoid Arit (RA), Japonya'da Romatoid Arit, poliyartiküler juvenil idiyopatik artrit ve Castleman hastalığı tedavisinde onay almıştır (Sheppard ve ark. , 2017).

Yaptığımız çalışmada IL-6 inhibitörü olan Tosilizumab'ın etkin dozu 25 µM bulunmuştur. Glutamatın glia hücrelerinde toksik konsantrasyonları deneysel kültür ortamında 10 mM kullanılmıştır. Hücrelerin glutamat ile tedavi edilmesi sonucunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücre canlılığı anlamlı olarak azalmıştır. Tosilizumab+glutamat grubunda hücre canlılığı glutamat grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir artış olmuştur. Hücre canlılığındaki bu artış tosilizumab'ın IL-6'nın reseptöre bağlanmasını azaltarak hücrelerdeki nöroinflamasyonu engellemesinden kaynaklanmış olabilir.

Tosilizumab'ın inflamasyonu azaltması ile ilgili literatürde çok fazla çalışma olmaması ile birlikte yapılan bir çalışmada tosilizumab tedavisinin, proinflamatuvar sitokinlerin ve inflamasyon faktörlerinin seviyelerini önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur. Yaptığımız çalışmada iNOS, NO, ROS ve TOS ölçümlerinde glutamat grubu ile karşılaştırıldığında bütün gruplar arasında anlamlı fark olduğu görülmüştür. NO, iNOS, TOS, ROS seviyeleri glutamat grubunda kontrol grubuna göre yüksek, tosilizumab ve glutamat+tosilizumab gruplarında ise glutamat grubuna göre düşük bulunmuştur. Ayrıca TAS ölçümünde glutamat grubu ile beraber bakıldığında bütün gruplar arasında belirli farklılık olduğu ve tosilizumab grubu ile karşılaştırıldığında bütün gruplar arasında anlamlı farklılık olduğu bulunmuştur. Yani toksisiteden dolayı glutamat grubunda kontrol grubuna göre TAS seviyesi azalmıştır. Beklediğimiz gibi tosilizumab ve glutamat+tosilizumab grubunda kontrol grubuna göre ve glutamat grubuna göre TAS seviyesi artmıştır. Bu veriler tosilizumab'ın antioksidan özellik göstererek oksidatif stresi azalttığını göstermektedir.

İnterlökin-6, başlangıçta immün ve inflamatuvar yanıtları düzenlediği ve inflamasyon sırasında toksik ortamlarda apoptozu inhibe ettiği belirlenen çok işlevli bir sitokindir (Hodge ve ark. , 2005). İnterlökin-6'nın ayrıca kronik inflamasyonun gelişmesinde önemli bir oyuncu olarak görev yaptığı, bunun sonucunda bağışıklık sistemi bozduğunu ve inflamasyonu ilerlemesinin hızlanmasına neden olduğu bilinmektedir (Multhoff ve Radons, 2012). Yapılan çalışmada elde edilen verilere göre C6 glioma hücrelerine glutamat uygulanması kontrole kıyaslandığında IL-6 reseptör protein seviyelerini anlamlı olarak artış olmuştur. Fakat tosilizumab ile IL-6 reseptör inhibisyonu sonrası glutamatla uygulanması tek başına glutamat'a maruz kalan hücrelerle kıyaslandığında IL-6 reseptör protein seviyesini anlamlı olarak azaltmıştır.

Ölüm sinyalleri, sonuçta hücre yıkımının yürütülmesinden sorumlu kaspazların aktivasyonuna yol açan sinyal yolları aracılığıyla iletilir (Xu, Lai, ve ark., 2019). Yaptığımız çalışmada hücrelerde tosilizumab'ın glutamat toksisitesi sonrası apoptozu değerlendirmek için immünfloresan TUNEL yöntemini kullanıldı. Bu çalışmamızda da apoptoz değerlendirilmesi yapılmış olup C6 glioma hücrelerine glutamat uygulanması kontrolle kıyaslandığında canlı hücre azalma görülmüştür. Fakat tosilizumab ile IL-6 inhibisyonu sonrası glutamat uygulanması tek başına glutamat'a maruz kalan hücrelerle kıyaslandığında canlı hücre oranı artırmıştır.

Proinflamatuvar sitokinler öğrenmeyi ve hafızayı inhibe eder ancak interlökin-6'nın (IL-6) akut bilişsel eksikliklerde önemi periferik doğuştan gelen bağışıklık sistemi bilinmemektedir. Periferik enfeksiyonlarla ilişkili hipokampus aracılı bilişsel bozukluklarda IL-6'nın fonksiyonel rolünü incelemek için, C57BL/6/J (IL-6^{+/+}) ve IL-6 nakavt (IL-6^{-/-}) fareler, eşleşen bir ortamda eğitildi. Su labirentinin bir edinme aşamasından sonra, intraperitoneal olarak lipopolisakarit (LPS) enjekte edilen IL-6^{+/+} fareler, çalışma belleğinde eksiklikler sergiledi. Bununla birlikte IL-6^{-/-} fareler, çalışma belleğinde LPS'nin neden olduğu bozulmaya dirençliydi. IL-6 eksikliğinin çalışma belleği, plazma IL-1 ve tümör nekroz faktörü (TNF), soliter sistem çekirdeğindeki (NTS) c-Fos immünoreaktivitesi ve kararlı durumdaki bozulmaya karşı koruma sağladığı mekanizmayı belirlendi. LPS enjeksiyonundan sonra IL-6^{+/+} ve IL-6^{-/-} farelerde hipokampusun nöronal katmanlarındaki IL-1 ve TNF mRNA seviyeleri belirlendi. NTS'deki plazma IL-1 ve TNF ve c-Fos immünoreaktivitesi, LPS'den sonra IL-6^{+/+} ve IL-6^{-/-} farelerde benzer şekilde arttı; bu, dolaşımdaki yüksek IL-1 ve TNF seviyelerini ve vagal aferent yolların aktivasyonunu gösterir. IL-6'nın yokluğunda çalışma hafızasını bozmak için yeterli değildi. Bununla birlikte, IL-6^{+/+} farelerin hipokampal dokusunda belirgin olan IL-1 ve TNF mRNA'nın LPS ile indüklenen yukarı regülasyonu, IL-6^{-/-} farelerde büyük ölçüde zayıflatılmış veya tamamen yoktu. Toplu olarak, bu veriler, IL-6 eksikliği olan farelerde humoral ve sinirsel bağışıklık-beyin iletişim yollarının sağlam olduğunu, ancak IL-6 yokluğunda merkezi sitokin bölmesinin aşırı duyarlı olduğunu göstermektedir (Sparkman ve ark., 2006).

Sitokin interlökin-6'nın (IL-6) nöroimmün yanıtların önemli bir aracı olduğu gösterilmiştir. Ancak IL-6'nın etkileri merkezi sinir sistemi (MSS) oldukça karmaşık

ve çeşitlidir ve IL-6'nın nöron fonksiyonlarını etkilediği mekanizmalar esas olarak bilinmemektedir. Bu çalışmada, kültürde serebellar granül nöronlara (SGN'ler) kronik olarak uygulanan IL-6'nın, glutamatın neden olduğu nörol hasara karşı koruyucu etkisini ve IL-6'nın nöroprotektif etkisinde rol oynayan mekanizmaları araştırılmıştır. Kronik IL-6'ya maruz kalma, SGN'leri glutamatın neden olduğu nöronal canlılık zayıflamasından önemli ölçüde önledi. IL-6'nın bu nöroprotektif etkisi konsantrasyonlarına bağlıydı. 2,5 ng/ml'deki IL-6, nöronal canlılığı belirgin şekilde iyileştirmede, ancak 5 ve 10 ng/ml'deki IL-6, nöronal canlılığı belirgin şekilde geliştirdi. Glutamatla uyarılan nöronal apoptoz da kronik IL-6 tedavisiyle çarpıcı biçimde engellendi. IL-6 ön tedavisi olmayan SGN'lerdeki hücre içi Ca^{+2} , bu nöronlar glutamat tarafından uyarılır uyarılmaz aniden yükseldi ve 18 dakikalık glutamat saldırısı periyodu boyunca daha yüksek seviyelerde tutuldu. Her ne kadar IL-6 ile ön işleme tabi tutulmuş SGN'lerdeki hücre içi Ca^{+2} , glutamata yanıt olarak akut ve geçici bir yükselme oluştursa da, glutamat uygulamasından önce hızla düştüler ve bazal seviyelere geri döndüler. Anti-gp130 monoklonal antikoru (mAb), IL-6'nın glutamat kaynaklı hücre içi Ca^{+2} aşırı yükü üzerindeki baskılayıcı etkisini bloke etti. Bu sonuçlar, IL-6'nın nöronları glutamat kaynaklı nörotoksositeye karşı koruyabildiğini ortaya koyuyor ve IL-6'nın nöroprotektif etkisinin, glutamatın uyardığı hücre içi Ca^{+2} aşırı yükünü baskılamak için gp130 sinyal transdüksiyon yolu yoluyla olabileceğini öne sürüyor (Peng ve ark. ,2005).

İnterlökin-6'nın (insan rekombinantı), kültürlenmiş 20 günlük fetal sıçan hipokampal nöronlarının glutamat kaynaklı nöron ölümü üzerindeki etkisini incelenmiştir. Kültürde 7 gün kaldıktan sonra hipokampal nöronlar, l-glutamat ve ayrıca N-metil-d-aspartatın eklenmesiyle belirgin şekilde dejenere oldu. Güçlü bir N-metil-d-aspartat antagonisti olan MK801'in eklenmesiyle nöron ölümü önlendi. 50 ng/ml konsantrasyonundaki İnterlökin-6, glutamatın neden olduğu nöron ölümü üzerinde önemli bir önleyici etkiye sahiptir. Temel fibroblast büyüme faktörünün 100 ng/ml konsantrasyonunda hipokampal nöronlar üzerinde de önemli koruyucu etki sağladığı ancak sinir büyüme faktörünün toksisiteyi önlemede etkisiz olduğu görülmüştür. Glutamatın iskemi ve çeşitli nörolojik hastalıklar gibi nöron ölümü patogeneğinde önemli bir rol oynadığı öne sürülmektedir. İnterlökin-6'nın bu olaylarda bir bakıma fizyolojik veya patolojik rolü olabilir (Yamada ve ark. ,1994).

Yapılan alışmalarda Tosilizumab, romatoid artrit ve sitokin salınım sendromu dahil farklı insan inflamatuvar hastalıklarının tedavisi için onaylanmış humanize bir monoklonal antikordur. Tosilizumab, interlökin-6 reseptörüne (IL-6R) bağlanır ve böylece proinflamatuvar sitokin IL-6'nın sinyalini bloke eder. İlk alışmalar ve tüm otorite değerlendirme raporları, tosilizumabın insanlarda etkili olduğunu ancak fare veya sıçan IL-6R'sine bağlanamadığını ve dolayısıyla farede IL-6 sinyallemesini bloke edemediğini belirtmektedir. Bununla birlikte, yakın zamanda yapılan birkaç çalışma, farelerde tosilizumab kullanımını tanımladı ve IL-6 blokajına atfedilen biyolojik etkileri bildirdi. Bu çalışmada tosilizumabın farklı insan ve fare hücre dizilerini kullanarak IL-6 sinyalini bloke etme yeteneğini araştırılmıştır. Sonuç olarak, tosilizumabın insan IL-6R yoluyla sinyalleşmeyi bloke ettiği ancak murin hücrelerinde IL-6 sinyalleşmesini bloke etmediği yönündeki orijinal teknoloji durumunu kesin olarak doğrulamaktadır. Enflamasyon, sinir sistemindeki nörodejeneratif süreçle yakından ilişkilidir (Takeuchi ve ark. , 2013). Organizmadaki inflamasyonun ana modlatörü olan NF-kB'nin aktivasyonu, TNF- α ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin ve diğer kemokinlerin salınmasına yol açar (Bonizzi ve Karin 2004; Ulivi ve ark. 2008) . Glutamatın neden olduğu sitotoksitenin, sinir sistemi bozukluklarıyla ilişkili proinflamatuvar sitokinleri arttırdığı gösterilmiştir (ChaparroHuerta ve ark. 2005). Yapılan çalışmadan sonuç olarak KBB'deki proinflamatuvar sitokin üretimini inhibe ederek antiinflamatuvar etkiye sahip olabileceği ortaya koymuştur.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

- Bu tez çalışmasında yapılan değerlendirme sonuçlarına göre, Tosilizumab'ın 25 µM dozunun Glutamat ile oluşturulan nöronal hasar sonucunda hücre canlılığını artırdığını göstermiştir. Aynı zamanda, Tosilizumab'ın azalan dozlarına karşı hücre canlılığı da giderek azaldığı için doz cevabının olduğu görülmüştür.
- Tosilizumab'ın 25 µM dozu glutamat ile oluşturulan nöronal hasar sonucunda TOS, NO ve iNOS seviyelerini anlamlı olarak arttırdığı gösterilmiştir. TAS sonuçlarına hücrelere göre kıyaslandığında TAS seviyesinde azalma görülmüştür.
- Tosilizumab'ın apoptoz sürecinden nasıl etkilendiğini değerlendirmek için yapılan TUNEL sonuçlarına göre C6 glioma hücrelerine glutamat uygulanması kontrolle kıyaslandığında anlamlı olarak TUNEL pozitif hücre sayısı artmıştır. Fakat tosilizumab ile IL-6 inhibisyonu sonrası glutamat uygulanması tek başına glutamat'a maruz kalan hücrelerle kıyaslandığında TUNEL pozitif hücre sayısını azaltmıştır. Tek başına glutamat uygulamaksızın tosilizumab'ın ise TUNEL hücre oranı, kontrolle kıyaslandığında değiştirmemiştir. Sonuç olarak tosilizumab'ın ve glutamatın beraber uygulandığı grup ile tek başına glutamata maruz kalan hücreler kıyaslandığında canlı hücre oranı artırdığı gösterilmiştir.
- IL-6 protein ekspresyonunun değerlendirildiği IL-6 boyamasına göre glutamat grubunda IL-6R protein seviyeleri anlamlı olarak artarken tosilizumab'ın ile IL-6R inhibisyonun yapılması sonucunda IL-6R protein seviyeleri azalmış, tosilizumab'ın ve glutamat ile beraber uygulandığı hücrelerde de aynı şekilde IL-6R protein seviyeleri anlamlı olarak azalmıştır.
- Mevcut bulgular sonucunda IL-6 inhibisyonunun glutamatta glial hasarı engellediği görülmektedir. Ancak, bu hipotezin tamamen kanıtlanabilmesi için in vivo ve ex vivo gibi ileri düzeyde çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKÇA

- Akkulak, A. (2022). Glioblastoma Primer Beyin Tümörlerinde Sirt4'ün Glutamat Metabolizması İle İlişkisinin İncelenmesi Ve Potansiyel Tümör Baskılayıcı Özelliğinin Araştırılması (Master's thesis).
- Alix, J. J., & de Jesus Domingues, A. M. (2011). White matter synapses: form, function, and dysfunction. *Neurology*, 76(4), 397-404.
- Alraouji, N. N., Al-Mohanna, F. H., Ghebeh, H., Arafah, M., Almeer, R., Al-Tweigeri, T., & Aboussekhra, A. (2020). Tocilizumab potentiates cisplatin cytotoxicity and targets cancer stem cells in triple-negative breast cancer. *Molecular Carcinogenesis*, 59(9), 1041-1051.
- Alyu, F., & Dikmen, M. (2017). Inflammatory aspects of epileptogenesis: contribution of molecular inflammatory mechanisms. *Acta neuropsychiatrica*, 29(1), 1-16.
- Alyu, F., & Dikmen, M. (2017). Inflammatory aspects of epileptogenesis: contribution of molecular inflammatory mechanisms. *Acta neuropsychiatrica*, 29(1), 1-16.
- Assessment Report For RoActemra [Internet]. 1st ed. London: European Medicines Agency; 2009 [accessed 2017 Jan 3]
- Bains, M., & Hall, E. D. (2012). Antioxidant therapies in traumatic brain and spinal cord injury. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1822(5), 675-684.
- Barrientos, R. M., Kitt, M. M., Watkins, L. R., & Maier, S. F. (2015). Neuroinflammation in the normal aging hippocampus. *Neuroscience*, 309, 84-99.
- Bauer, J., Vezzani, A., & Bien, C. G. (2012). Epileptic encephalitis: the role of the innate and adaptive immune system. *Brain Pathology*, 22(3), 412-421.
- Bidwell, J., Keen, L., Gallagher, G., Kimberly, R., Huizinga, T., McDermott, M. F., ... & D'Alfonso, S. (1999). Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. *Genes & immunity*, 1(1), 3-19.
- Brosnan, J. T., & Brosnan, M. E. (2013). Glutamate: a truly functional amino acid. *Amino acids*, 45, 413-418.

- D Skaper, S., Facci, L., & Giusti, P. (2014). Neuroinflammation, microglia and mast cells in the pathophysiology of neurocognitive disorders: a review. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*, 13(10), 1654-1666.
- Dağdelen, D. N. (2021). *GLT-1 (glutamat transporter-1) yıkım yolağının glioblastoma hücrelerinde incelenmesi* (Master's thesis, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü)
- DALKILIÇ, E., GÜL, C. B., & ALKIŞ, N. (2012). İnterlökin-6: İnflamasyonda başrol oyuncularından. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 38(2), 157-160.
- Danbolt, N. C. (2001). Glutamate uptake. *Progress in neurobiology*, 65(1), 1-105.
- de Hooge, A. S., van de Loo, F. A., Arntz, O. J., & van den Berg, W. B. (2000). Involvement of IL-6, apart from its role in immunity, in mediating a chronic response during experimental arthritis. *The American journal of pathology*, 157(6), 2081-2091.
- Dehnes, Y., Chaudhry, F. A., Ullensvang, K., Lehre, K. P., Storm-Mathisen, J., & Danbolt, N. C. (1998). The glutamate transporter EAAT4 in rat cerebellar Purkinje cells: a glutamate-gated chloride channel concentrated near the synapse in parts of the dendritic membrane facing astroglia. *Journal of Neuroscience*, 18(10), 3606-3619.
- El-Haggar, S. M., Hegazy, S. K., Mustafa, W., & Khriea, M. O. (2023). Possible immuno-modulatory effects of tocilizumab in patients with refractory status epilepticus. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*, 27(4).
- Ezza, H. S. A., & Khadrawy, Y. A. (2014). Glutamate excitotoxicity and neurodegeneration. *J. Mol. Genet. Med*, 8(4), 1747-0862.
- Fairman, W. A., & Amara, S. G. (1999). Functional diversity of excitatory amino acid transporters: ion channel and transport modes. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 277(4), F481-F486.
- Farooqui, A. A. (2010). *Neurochemical aspects of neurotraumatic and neurodegenerative diseases*. Springer Science & Business Media.

- Ferraguti, F., & Shigemoto, R. (2006). Metabotropic glutamate receptors. *Cell and tissue research*, 326(2), 483-504
- Frohman, E. M., Frohman, T. C., Gupta, S., de Fougères, A., & van den Noort, S. (1991). Expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in Alzheimer's disease. *Journal of the neurological sciences*, 106(1), 105-111.
- Furness, D. N., Dehnes, Y., Akhtar, A. Q., Rossi, D. J., Hamann, M., Grutle, N. J., ... & Danbolt, N. C. (2008). A quantitative assessment of glutamate uptake into hippocampal synaptic terminals and astrocytes: new insights into a neuronal role for excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2). *Neuroscience*, 157(1), 80-94.
- Girardin, M. L., Flamand, T., Roignot, O., Abi Warde, M. T., Mutschler, V., Vouilleminot, P., ... & De Saint-Martin, A. (2023). Treatment of new onset refractory status epilepticus/febrile infection-related epilepsy syndrome with tocilizumab in a child and a young adult. *Epilepsia*, 64(6), e87-e92.
- Hata, H., Sakaguchi, N., Yoshitomi, H., Iwakura, Y., Sekikawa, K., Azuma, Y., ... & Sakaguchi, S. (2004). Distinct contribution of IL-6, TNF- α , IL-1, and IL-10 to T cell-mediated spontaneous autoimmune arthritis in mice. *The Journal of clinical investigation*, 114(4), 582-588.
- Hata, H., Sakaguchi, N., Yoshitomi, H., Iwakura, Y., Sekikawa, K., Azuma, Y., ... & Sakaguchi, S. (2004). Distinct contribution of IL-6, TNF- α , IL-1, and IL-10 to T cell-mediated spontaneous autoimmune arthritis in mice. *The Journal of clinical investigation*, 114(4), 582-588.
- Haugeto, Ø., Ullensvang, K., Levy, L. M., Chaudhry, F. A., Honoré, T., Nielsen, M., ... & Danbolt, N. C. (1996). Brain glutamate transporter proteins form homomultimers. *Journal of Biological Chemistry*, 271(44), 27715-27722.
- Heneka, M. T., Kummer, M. P., & Latz, E. (2014). Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nature Reviews Immunology*, 14(7), 463-477.
- Holmseth, S., Dehnes, Y., Huang, Y. H., Follin-Arbelet, V. V., Grutle, N. J., Mylonakou, M. N., ... & Danbolt, N. C. (2012). The density of EAAC1 (EAAT3) glutamate transporters expressed by neurons in the mammalian CNS. *Journal of*

- Ibrahim, Y. F., Moussa, R. A., Bayoumi, A. M., & Ahmed, A. S. F. (2020). Tocilizumab attenuates acute lung and kidney injuries and improves survival in a rat model of sepsis via down-regulation of NF- κ B/JNK: a possible role of P-glycoprotein. *Inflammopharmacology*, 28, 215-230.
- Julio-Pieper M, Flor PJ, Dinan TG, Cryan JF. Exciting times beyond the brain: metabotropic glutamate receptors in peripheral and non-neural tissues. *Pharmacological reviews*. 2011; 63: 35-58.
- Kempuraj, D., Khan, M. M., Thangavel, R., Xiong, Z., Yang, E., & Zaheer, A. (2013). Glia maturation factor induces interleukin-33 release from astrocytes: implications for neurodegenerative diseases. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 8, 643-650.
- Kempuraj, D., Thangavel, R., Selvakumar, G. P., Zaheer, S., Ahmed, M. E., Raikwar, S. P., ... & Zaheer, A. (2017). Brain and peripheral atypical inflammatory mediators potentiate neuroinflammation and neurodegeneration. *Frontiers in cellular neuroscience*, 11, 216.
- Kew, J. N., & Kemp, J. A. (2005). Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology*, 179, 4-29.
- Kim, K., Lee, S. G., Kegelmann, T. P., Su, Z. Z., Das, S. K., Dash, R., ... & Fisher, P. B. (2011). Role of excitatory amino acid transporter-2 (EAAT2) and glutamate in neurodegeneration: opportunities for developing novel therapeutics. *Journal of cellular physiology*, 226(10), 2484-2493.
- Kishimoto T. Interleukin-6: from basic science to medicine 40 years in immunology. *Annu Rev Immunol* 2005; 23:1-21; PMID:15771564;
- Legendre, F., Dudhia, J., Pujol, J. P., & Bogdanowicz, P. (2003). JAK/STAT but not ERK1/ERK2 pathway mediates interleukin (IL)-6/soluble IL-6R down-regulation of type II collagen, aggrecan core, and link protein transcription in articular chondrocytes: association with a down-regulation of SOX9 expression. *Journal of Biological Chemistry*, 278(5), 2903-2912.

- Lehre, K. P., & Danbolt, N. C. (1998). The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. *Journal of Neuroscience*, 18(21), 8751-8757.
- Lokau, J., Kleinegger, F., Garbers, Y., Waetzig, G. H., Grötzinger, J., Rose-John, S., ... & Garbers, C. (2020). Tocilizumab does not block interleukin-6 (IL-6) signaling in murine cells. *PloS one*, 15(5), e0232612.
- M Ribeiro, F., Paquet, M., P Cregan, S., & SG Ferguson, S. (2010). Group I metabotropic glutamate receptor signalling and its implication in neurological disease. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*, 9(5), 574-595.
- Matsuoka, Y., Yoshida, R., Kawahara, K., Sakata, J., Arita, H., Nkashima, H., ... & Nakayama, H. (2022). The antioxidative stress regulator Nrf2 potentiates radioresistance of oral squamous cell carcinoma accompanied with metabolic modulation. *Laboratory Investigation*, 102(8), 896-907.
- Mcferrin, M. B., & Sontheimer, H. (2006). A role for ion channels in glioma cell invasion. *Neuron glia biology*, 2(1), 39-49.
- Melton, L., & Coombs, A. (2008). Actemra poised to launch IL-6 inhibitors. *Nature Biotechnology*, 26(9), 957-960.
- Mihara, M., Hashizume, M., Yoshida, H., Suzuki, M., & Shiina, M. (2012). IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clinical science*, 122(4), 143-159.
- Mihara, M., Hashizume, M., Yoshida, H., Suzuki, M., & Shiina, M. (2012). IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clinical science*, 122(4), 143-159.
- Minichsdorfer, C., Wasinger, C., Sieczkowski, E., Atil, B., & Hohenegger, M. (2015). Tocilizumab unmasks a stage-dependent interleukin-6 component in statin-induced apoptosis of metastatic melanoma cells. *Melanoma research*, 25(4), 284.

- Muto, T., Tsuchiya, D., Morikawa, K., & Jingami, H. (2007). Structures of the extracellular regions of the group II/III metabotropic glutamate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(10), 3759-3764.
- Nakanishi, S., Nakajima, Y., Masu, M., Ueda, Y., Nakahara, K., Watanabe, D., ... & Okada, M. (1998). Glutamate receptors: brain function and signal transduction. *Brain Research Reviews*, 26(2-3), 230-235.
- Niswender, C. M., & Conn, P. J. (2010). Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 50, 295-322.
- Peng, Y. P., Qiu, Y. H., Lu, J. H., & Wang, J. J. (2005). Interleukin-6 protects cultured cerebellar granule neurons against glutamate-induced neurotoxicity. *Neuroscience letters*, 374(3), 192-196.
- Pow, D. V., & Barnett, N. L. (2000). Developmental expression of excitatory amino acid transporter 5: a photoreceptor and bipolar cell glutamate transporter in rat retina. *Neuroscience letters*, 280(1), 21-24.
- Prickett, T. D., & Samuels, Y. (2012). Molecular pathways: dysregulated glutamatergic signaling pathways in cancer. *Clinical Cancer Research*, 18(16), 4240-4246.
- Ransom, C. B., & Sontheimer, H. (2001). BK channels in human glioma cells. *Journal of Neurophysiology*, 85(2), 790-803.
- Rose-John, S. (2012). IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *International journal of biological sciences*, 8(9), 1237.
- Ruiz-Limon, P., Ortega, R., de la Rosa, I. A., Del Carmen Abalos-Aguilera, M., Perez-Sanchez, C., Jimenez-Gomez, Y., ... & Barbarroja, N. (2017). Tocilizumab improves the proatherothrombotic profile of rheumatoid arthritis patients modulating endothelial dysfunction, NETosis, and inflammation. *Translational Research*, 183, 87-103.
- Sparkman, N. L., Buchanan, J. B., Heyen, J. R., Chen, J., Beverly, J. L., & Johnson, R. W. (2006). Interleukin-6 facilitates lipopolysaccharide-induced disruption in

- working memory and expression of other proinflammatory cytokines in hippocampal neuronal cell layers. *Journal of Neuroscience*, 26(42), 10709-10716.
- Seiffert, E., Dreier, J. P., Ivens, S., Bechmann, I., Tomkins, O., Heinemann, U., & Friedman, A. (2004). Lasting blood-brain barrier disruption induces epileptic focus in the rat somatosensory cortex. *Journal of Neuroscience*, 24(36), 7829-7836.
- Shabab, T., Khanabdali, R., Moghadamtousi, S. Z., Kadir, H. A., & Mohan, G. (2017). Neuroinflammation pathways: a general review. *International Journal of Neuroscience*, 127(7), 624-633.
- Sheppard, M., Laskou, F., Stapleton, P. P., Hadavi, S., & Dasgupta, B. (2017). Tocilizumab (actemra). *Human vaccines & immunotherapeutics*, 13(9), 1972-1988.
- Sheppard, M., Laskou, F., Stapleton, P. P., Hadavi, S., & Dasgupta, B. (2017). Tocilizumab (actemra). *Human vaccines & immunotherapeutics*, 13(9), 1972-1988.
- Simpson, R. J., Hammacher, A., Smith, D. K., Matthews, J. M., & Ward, L. D. (1997). Interleukin-6: Structure-function relationships. *Protein science*, 6(5), 929-955.
- Song, S. N. J., Tomosugi, N., Kawabata, H., Ishikawa, T., Nishikawa, T., & Yoshizaki, K. (2010). Down-regulation of hepcidin resulting from long-term treatment with an anti-IL-6 receptor antibody (tocilizumab) improves anemia of inflammation in multicentric Castleman disease. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 116(18), 3627-3634.
- Srirangan, S., & Choy, E. H. (2010). The role of interleukin 6 in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease*, 2(5), 247-256.
- Srirangan, S., & Choy, E. H. (2010). The role of interleukin 6 in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease*, 2(5), 247-256.

- Steinborn, B., Żarowski, M., Winczewska-Wiktor, A., Wójcicka, M., Młodzikowska-Albrecht, J., & Losy, J. (2014). Concentration of IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF α in the blood serum in children with generalized epilepsy treated by valproate. *Pharmacological Reports*, 66(6), 972-975.
- Tapiero, H., Mathe, G., Couvreur, P., & Tew, K. D. (2002). II. Glutamine and glutamate. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 56(9), 446-457.
- Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., ... & Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological reviews*, 62(3), 405-496.
- Vandenberg, R. J., & Ryan, R. M. (2013). Mechanisms of glutamate transport. *Physiological reviews*, 93(4), 1621-1657.
- Venkiteswaran, A. (2009, September). Tocilizumab. In *MAbs* (Vol. 1, No. 5, pp. 432-438). Taylor & Francis.
- von Bernhardt, R., Eugénin-von Bernhardt, L., & Eugénin, J. (2015). Microglial cell dysregulation in brain aging and neurodegeneration. *Frontiers in aging neuroscience*, 7, 124.
- Von Bernhardt, R., Eugénin-von Bernhardt, L., & Eugénin, J. (2015). Microglial cell dysregulation in brain aging and neurodegeneration. *Frontiers in aging neuroscience*, 7, 124.
- Wang, G. Y., Zhang, S. L., Wang, X. R., Feng, M., Li, C., An, Y., ... & Li, Z. G. (2015). Remission of rheumatoid arthritis and potential determinants: a national multi-center cross-sectional survey. *Clinical rheumatology*, 34, 221-230.
- Wersinger, E., Schwab, Y., Sahel, J. A., Rendon, A., Pow, D. V., Picaud, S., & Roux, M. J. (2006). The glutamate transporter EAAT5 works as a presynaptic receptor in mouse rod bipolar cells. *The Journal of physiology*, 577(1), 221-234.
- Willard, S. S., & Koochekpour, S. (2013). Glutamate, glutamate receptors, and downstream signaling pathways. *International journal of biological sciences*, 9(9), 948.

- Yamada, M., & Hatanaka, H. (1994). Interleukin-6 protects cultured rat hippocampal neurons against glutamate-induced cell death. *Brain research*, 643(1-2), 173-180.
- Ye, Z. C., & Sontheimer, H. (1999). Glioma cells release excitotoxic concentrations of glutamate. *Cancer research*, 59(17), 4383-4391.
- Yelamanchi, S. D., Jayaram, S., Thomas, J. K., Gundimeda, S., Khan, A. A., Singhal, A., ... & Gowda, H. (2016). A pathway map of glutamate metabolism. *Journal of cell communication and signaling*, 10, 69-75
- Zilka, N., Kazmerova, Z., Jadhav, S., Neradil, P., Madari, A., Obetkova, D., ... & Novak, M. (2012). Who fans the flames of Alzheimer's disease brains? Misfolded tau on the crossroad of neurodegenerative and inflammatory pathways. *Journal of neuroinflammation*, 9(1), 1-9.