



ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**UZUN SÜRELİ AÇLIK MODELİ UYGULANMIŞ NÖRON
HÜCRELERİNDE, DİYABETES MELLİTUS (DM)
TEDAVİSİNDE KULLANILAN PEROKSİZOM
PROLİFERATÖR AKTİVE EDİLMİŞ RESEPTÖR GAMMA
(PPAR_γ) AGONİSTİNİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

ARZU PINARBAŞI
DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Fehime Aksungar

İSTANBUL-2022



ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**UZUN SÜRELİ AÇLIK MODELİ UYGULANMIŞ NÖRON
HÜCRELERİNDE, DİYABETES MELLİTUS (DM)
TEDAVİSİNDE KULLANILAN PEROKSİZOM
PROLİFERATÖR AKTİVE EDİLMİŞ RESEPTÖR GAMMA
(PPAR_γ) AGONİSTİNİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

ARZU PINARBAŞI
DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Fehime Aksungar

İSTANBUL-2022

Anabilim Dalı : Biyokimya ve Moleküler Biyoloji
Program : Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Doktora
Tez Başlığı : Uzun Süreli Açlık Modeli Uygulanmış Nöron
Hücrelerinde, Diyabetes Mellitus (DM) Tedavisinde
Kullanılan Peroksizom Proliferatör Aktive Edilmiş
Reseptör Gamma (PPAR_γ) Agonistinin Etkilerinin
Araştırılması
Öğrencinin Adı-Soyadı : Arzu Pınarbaşı
Savunma Sınavı Tarihi : 18/02/2022

Bu tez çalışması jürimiz tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Üye (Jüri Başkanı)	Doç. Dr. Cemaliye AKYERLİ BOYLU Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi	
Üye (Tez Danışmanı)	Prof. Dr. Fehime AKSUNGAR Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi	
Üye	Doç. Dr. Saime BATIREL Marmara Üniversitesi	
Üye	Doç. Dr. Mustafa Erinç SİTAR Maltepe Üniversitesi	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Yasemin FURTUN UÇAL Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi	

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu tezin planlamasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaktan da kaynaklar listesine aldığımı. Yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patenti ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

18/02/2022

Arzu PINARBAŞI

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Yanında bana çalışma şansı tanıyan, benim ile engin bilgilerini-tecrübelerini cömertçe paylaşan ve bana bu zorlu yolda eşsiz sabır-güler yüz gösteren, en kötü anımda bana moral veren, en yoğun anında bile bana vakit ayıran, değerli Hocam Prof. Dr. Fehime AKSUNGAR'a minnettarım.

Prof. Dr. Aysel ÖZPINAR'a yönetim, ilgi, yardımlarından ve tez izleme komitemde yer almayı kabul ettiği için, Doç. Dr. Saime BATIREL'e tez izleme komitemde ayrıca Doç. Dr. Cemaliye AKYERLİ BOYLU, Doç. Dr. Mustafa Erinç SİTAR, Dr. Öğr. Görevlisi Yasemin FURTUN UÇAL'a savunma jürimde yer almayı kabul ettikleri ve yapıcı değerlendirmeleri için sonsuz teşekkürü borç biliyorum.

Ayrıca çalışmalarımnda; yakın ilgilerini esirgemeyen, değerli fikirlerinden ve deneyimlerinden yararlandığım Doç. Dr. Devrim ÖZ ARLAN'a şükranlarımı sunuyorum .

Tüm sevecenliği ve nezaketi ile deneylerimde bana çok büyük destek veren Uz. Bio. Meltem PAK'a, Uz. Bio. Murat KOLAY'a ve Uz. Bio. Emel AKGÜN'e gönül borcum var.

Annem Nihal PINARBAŞI'na ve babam Bekir PINARBAŞI'na bana karşı her daim gösterdikleri limitsiz özveri, maddi-manevi destek, sevgi, ilgi ve anlayışları için sonsuz müteşekkirim.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
RESİMLER LİSTESİ.....	xi
TABLolar LİSTESİ.....	xii
ÖZET.....	1
ABSTRACT	2
1 GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2 GENEL BİLGİLER	6
2.1 Uzun Süreli Açlık ve Ketojenik Diyetin Etki Mekanizması	9
2.2 Peroksisom Proliferatör ile Aktive Edilmiş Reseptörler (PPARs).....	13
2.3 Tiazolidinedionlar.....	20
2.3.1 Pioglitazon	22
2.4 Mitokondriyal Fonksiyonların Değerlendirilmesi.....	24
3 GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1 Gereçler ve Kimyasallar	26
3.1.1 Kullanılan hücre hattı serisi	27
3.2 Yöntemler	28
3.2.1 Besiyerlerinin hazırlanışı	28
3.2.1.1 Kontrol besiyerinin hazırlanışı (K).....	28
3.2.1.2 Dondurma besiyerinin hazırlanışı	28
3.2.1.3 Uzun süreli açlık/kalori kısıtlanması modeli besiyerlerinin hazırlanışı.....	28
3.2.1.4 Betahidroksi butirat (BOHB) stok solüsyonu/besiyerinin hazırlanışı ..	28
3.2.1.5 PPAR gamma agonisti içeren solüsyonun/besiyerinin hazırlanışı.....	29
3.2.2 Hücre kültürü çalışmaları.....	29
3.2.2.1 Dondurulmuş hücrelerin çözülmesi.....	30
3.2.2.2 Hücrelerin sayımı	30
3.2.2.3 Besiyeri değişim protokolü	30
3.2.2.4 Konfluent hücrelerin pasajlanması	31
3.2.2.5 Hücrelerin dondurulması	31
3.2.2.6 Hücre canlılığının kontrolü	32

3.2.2.7	Optimizasyon çalışmaları	32
3.2.2.8	Biyokimyasal analizlerin yapılması	34
3.2.2.9	Sitrat sentaz aktivitesi ölçümü	34
3.2.2.10	Hücre popülasyonunun iki katına çıkma süresi çalışması (Hücre büyüme deneyleri)	35
3.2.2.11	MTT (hücre canlılığı çalışması)	36
3.2.2.12	Veri analizleri	37
4	BULGULAR	38
4.1	Grupların Belirlenmesi İçin Gerçekleştirilen Optimizasyon Çalışması	38
4.2	Nöron Hücrelerinde Açlık Modeli Optimizasyon Çalışması	38
4.3	Ana Deneyler Sırasında Enerji Metabolitleri	41
4.4	Hücre Canlılığı (MTT) Çalışması	42
4.5	Hücre Popülasyonu İki Katına Çıkma Süreleri (Hücre Proliferasyonu) ...	43
4.6	Sitrat Sentaz Aktivite Sonuçları	45
5	TARTIŞMA	47
6	SONUÇ	54
7	KAYNAKLAR	55
8	EKLER	63
Ek 1:	Makale	63
9	ÖZGEÇMİŞ	71

KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ

ADP	Adenozin Difosfat
AF-1	Activation Function-1
α	Alfa
ALS	Amyotrofik Lateral Skleroz
ATP	Adenozin Trifosfat
β	Beta
βOHB	Beta Hidroksi Butirat
CO₂	Karbondioksit
COX-2	Cyclooxygenase-2
δ	Delta
D	DMEM
DK	DMEM+5mM Beta Hidroksi Butirat
DM	Diyabetes Mellitus
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DS	DMEM+%10 FBS
DSK	DMEM+%10 FBS+ 5mM Beta Hidroksi Butirat.
EBSS	Earle's Balanced Salt Solution
EDS	EBSS:DMEM (1:1)+%10FBS
EDSK	EDS+5mM Beta Hidroksi Butirat
EPS	EBSS:PBS (1:1)+%10FBS
EPSK	EPS+ 5mM Beta Hidroksi Butirat
ES	EBSS+%10 FBS
ESK	ES+ 5mM Beta Hidroksi Butirat
FADH₂	Flavin Adenin Dinükleotit
F	Açlık grubu
FBS	Fetal Bovine Serum
FB	Keton ilave Edilmiş Açlık Grubu

FBP	Pioglitazon İlave Edilmiş FB Brubu
γ	Gamma
HDAC	Histon Deasetilazları
HDL	Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
HEPA	Yüksek Verimli Hava Parçacıkları
IF	Aralıklı Oruç
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
kDa	Kilodalton
LDH	Laktat Dehidrogenaz
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
mtDNA	Mitokondriyal DNA
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
MTT	Dimethylthiazol
K	Kontrol Besiyeri
NADH₂	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
KB	Keton Kontrol Grup
KBP	Pioglitazon İlave Edilmiş Kontrol Grup
NO	Nitrik Oksit
OD	Optik Yoğunluk
P	Olasılık
p38 MAPK	p38 Mitojenle aktive edilen protein kinaz
PBS	Fosfat Tamponlu Tuzlu Su
Pen-Strep	Penisilin-Streptomisin
p-ERK	Phospho-Extracellular Signal Related Kinase
PPAR	Peroksizom Proliferatör Aktive Edilmiş Reseptör
PPRE	PPAR Response Element
PS	PBS+%10FBS
PSK	PS+ 5mM Beta Hidroksi Butirat
RNA	Ribonükleik Asit
RXR	Retinoid X Reseptörü
RXR/RAR	Retinoid X Reseptör/Retinoik Asit Reseptörü

SD	Standart Deviation
SE	Status Epileptikus
SOD	Süperoksit dismutaz



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Kalori kısıtlamasının etkileri..	6
Şekil 2. Kalori kısıtlaması ile değişen metabolik regülatörler..	7
Şekil 3. Brandhorst ve arkadaşlarının aralıklı beslenme çalışmaları.	8
Şekil 4. Uzun süreli açlık.	10
Şekil 5. Keton cisimlerinin sentezi.....	12
Şekil 6. PPAR-Gamma'nın etkileri.....	15
Şekil 7. PPAR γ aktivasyonu..	16
Şekil 8. PPAR anlatım regülasyonu.....	17
Şekil 9. PPAR'ın yapısı.	18
Şekil 10. Transaktivasyon mekanizması.....	20
Şekil 11. Tiazolidinedionların etki mekanizması.....	22
Şekil 12. Pioglitazonun kimyasal yapısı.	23
Şekil 13. Hücre popülasyonu iki katına çıkma süresi deney planı.....	36
Şekil 14. Hücre canlılığı optimizasyon çalışmaları.	39
Şekil 15. Hücre canlılığı (MTT) sonuçları.....	42
Şekil 16. Hücre büyüme eğrileri.	44
Şekil 17. Sitrat sentaz aktivitesi bulguları.....	46
Şekil 18. PPAR- γ agonistinin nörodejenerasyonda ki etki mekanizmaları.....	49

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1. SH-SY5Y hücreleri.....	27
Resim 2. Açlık modeli optimizasyon çalışması resimleri.....	40
Resim 3. FB ve FBP besiyerinde büyütülmüş hücre resimleri.	45



TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1. PPAR izoformları ve organ ve dokulardaki metabolik rolleri.....	18
Tablo 2. PPAR- γ agonistleri	21
Tablo 3. Kullanılan cihazlar.....	26
Tablo 4. Kullanılan kimyasallar/kitler.	26
Tablo 5. Kullanılan plastik/cam malzemeler.	27
Tablo 6. Deney grupları ve besiyeri içerikleri.	33
Tablo 7. Optimizasyon çalışmalarında metabolik parametrelerin karşılaştırılması...	38
Tablo 8. Deney öncesi/sonrası besiyer gruplarının enerji metabolitleri.	41

ÖZET

Uzun Süreli Açlık Modeli Uygulanmış Nöron Hücrelerinde, Diyabetes Mellitus (DM) Tedavisinde Kullanılan Peroksizom Proliferatör Aktive Edilmiş Reseptör Gamma (PPAR γ) Agonistinin Etkilerinin Araştırılması

Diyabetes Mellitus (DM) tedavisinde kullanılan Peroksizom Proliferatör Aktive Edilmiş Reseptör Gamma (PPAR γ) agonistleri, açlık ve düşük glukoz durumlarında ketogenez dahil metabolizmanın düzenlenmesinde önemli rollere sahiptirler. Son zamanlarda PPAR γ 'nın nöron hücreleri üzerinde antioksidan, anti-enflamatuvar etkilere sahip olduğu düşünülmektedir. Bu bilgiler ışığında; glukozu azaltılmış ve keton eklenmiş açlık modelinde, SH-SY5Y nöron hücrelerinde pioglitazonun (PPAR γ agonisti) nöron hücre proliferasyonu, canlılığı, enerji metabolizması ve mitokondriyal fonksiyonlar üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Pioglitazon uygulanmasından önce ve sonra; enerji metabolitleri (glukoz, laktat, keton (β OHB)), laktat dehidrogenaz aktivitesi, mitokondriyal sitrat sentaz aktivitesi, hücre proliferasyon süreleri ve canlılık oranları araştırılmıştır. Glukozu azaltılmış, keton ilave edilmiş nöron kültürlerine pioglitazon eklendiğinde; metabolik parametrelerde, mitokondriyal fonksiyonlarda, hücre popülasyonu iki katına çıkma sürelerinde ve canlılık oranlarında kontrol gruplarına göre artışlar gözlenmiştir. PPAR γ agonisti uygulanan nöronlarda mitokondriyal sitrat sentaz aktivitesi, laktat ve LDH seviyelerindeki değişiklikler daha önce literatürde gösterilmemiştir. Sonuçlar, pioglitazonun özellikle keton cisimlerinin varlığında nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde etkili bir alternatif olduğunu düşündürmektedir.

Anahtar Sözcükler: Açlık, Keton cisimleri, Nöron kültürleri, Pioglitazone, PPAR γ .

ABSTRACT

Investigation Of The Effects Of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPAR γ) Agonist Used In The Treatment Of Diabetes Mellitus (DM) On Prolonged Fasting Model Applied Neuron Cultures

Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma (PPAR γ), agonists used for the treatment of Diabetes Mellitus (DM), has important roles on the regulation of metabolism including ketogenesis in fasting and low glucose states. Recently PPAR γ is thought to have anti-oxidant, anti-inflammatory effects on neuronal cells. In the light of these information; it was aimed to investigate the effects of pioglitazone (PPAR γ agonist) on neuron cell proliferation, viability, energy metabolism and mitochondrial functions on SH-SY5Y neuron cells in a glucose-reduced and ketone-supplemented fasting model. Before and after pioglitazone treatment; energy metabolites (glucose, lactate, ketone (β OHB)), lactate dehydrogenase activity, mitochondrial citrate synthase activity, cell proliferation times and viability rates were investigated. PPAR γ agonist addition to glucose deprived, ketone added neurons caused positive improvements in energy metabolites, mitochondrial function, doubling time and survival rates according to the control groups. Changes in mitochondrial citrate synthase activity, lactate and LDH levels of neuronal cells treated with PPAR γ agonist have not been previously shown. Results suggest that, pioglitazone can be an effective alternative for the treatment of neurodegenerative diseases especially with the presence of ketone bodies.

Keywords: Fasting, Ketone bodies, Neuron cultures, Pioglitazone, PPAR γ .

1 GİRİŞ VE AMAÇ

Son yıllarda, kalori kısıtlamasının ve uzun süreli açlığın beyin fonksiyonlarına etkileri üzerine deneysel ve klinik çalışmalar yapılmaktadır (1). Kalori kısıtlaması, alınan besin miktarının eksik beslenmeye yol açmayacak şekilde sınırlandırılmasıdır (undernutrition without malnutrition). Kalori kısıtlamasının; yaşlanma, metabolik sendrom, diyabet, kanser, immün cevabın oluşturulması ve ömrün uzamasındaki olumlu etkileri ispatlanmıştır (2,3,4). Son yıllarda, kalori kısıtlamasına alternatif yeni bir beslenme modelinden bahsedilmektedir. Bu beslenme biçimi, alınan kaloriye kısıtlama getirmeksizin uzun süreli aralıklarla (8-16 saat) beslenmedir (Intermittent Fasting-IF). Aralıklı beslenmenin; lipit düzeyleri, enflamasyon, beyin fonksiyonları, yaşlanma, kronik hastalık ve genel sağlık durumu üzerine olumlu etkileri gösterilmiştir (5, 6, 7). İnsanlarda uygulanan uzun süreli açlık “Uzamış Açlık” modeli ise 12 saatten fazla herhangi bir yiyeceğin tüketilmemesidir. Uzamış açlık/kalori kısıtlaması modelleri, diğer beslenme modellerinden ayrılmaktadır. Her iki beslenmede de beyin tarafından alternatif enerji kaynağı olarak keton cisimlerinin kullanıldığı bilinmektedir (8, 9, 10). Bu beslenme biçimlerine ek olarak vücutta ketonların artmasını sağlayan ketojenik diyet, özellikle ilaç tedavisine yanıt vermeyen dirençli epilepsi hastalarında uygulanmakta ve olumlu sonuçlar alınmaktadır (11). Ketojenik diyet; yüksek yağ ve protein, düşük oranda karbonhidrattan oluşmaktadır. Ketojenik diyetteki bu içerik, düşük glukoz seviyelerine ve bunun sonucu olarak da keton sentezlemesine neden olur (12, 13). Ketojenik diyetin birçok mekanizma ile PPAR γ 'yı aktive ettiği gösterilmiştir (14, 15). Yapılan araştırmalarda, ketojenik diyetin mitokondriyal sitrat sentaz enziminin aktivitesini arttırdığından da bahsedilmektedir (16). Bunlara ek olarak vücutta yüksek miktarda keton bulunmasının nöron ve periferik hücrelerde, lipit ve enerji metabolizmasını düzenleyen, tip II nükleer transkripsiyon faktörü Peroksizom Proliferatör Aktive Edilmiş Reseptör (PPAR)'ın aktivasyonunu sağladığı da gösterilmiştir (17). Uzun süreli açlık sürecinde de yüksek konsantrasyonlarda salgılanan keton cisimlerinin PPAR γ yollarını aktive ettiği düşünülmektedir (15).

Peroksizom Proliferatör Aktive Edilmiş Reseptörler (PPAR)'lar, nükleer reseptörler ve liganda bağlı transkripsiyon faktörleri olan nükleer hormon faktörlerinin süper ailesine ait proteinlerdir (18). Yapısal olarak, PPAR'lar steroid veya tiroid hormonu reseptörlerine benzerler ve küçük lipofilik ligandlara yanıt olarak uyarılırlar. Hormonların, vitaminlerin, endojen metabolitlerin ve ksenobiyotik bileşiklerin sensörleri olarak görev yapan PPAR'lar, çok sayıda genin ekspresyonunu kontrol eden nükleer reseptörlerdir (19). PPAR'ların, üç izoformu vardır ve enerji metabolizmasında önemli rol oynarlar. Fakat sadece PPAR γ 'nın, tiazolidinedionlar tarafından aktive edildiği düşünülmektedir (18). Tiazolidinedionlar (TZD'ler), yaygın olarak çalışılan PPAR γ ligandıdır.

Yapılan literatür araştırmasında, ketojenik ortamda mitokondriyal fonksiyonlar üzerine yeterli sayıda çalışma olmadığı dikkati çekmektedir. Oysa mitokondri, hücrel metabolik fonksiyonların yer aldığı önemli bir organdır. Tüm hücrel fonksiyonlar için gerekli olan biyolojik enerjinin; krebs döngüsü ve oksidatif fosforilasyon ile elde edilmesi, hücrelerin enerji jeneratörü olarak adlandırılan mitokondrilere bağlıdır. Dolayısı ile metabolik olarak vücut enerji metabolizmalarında varsayılan bir farklılığın, mitokondriyal fonksiyonlar ile ilişkilendirilerek aydınlatılması gerekmektedir.

Bu çalışmada yola çıkış noktamız; Diyabetes Mellitus tedavisinde kullanılan PPAR gama agonistlerinin; diğer bir çok metabolik hastalıkta (metabolik sendrom, obezite vb), ayrıca bazı kronik nöroenflamatuvar hastalıklarda yararlı etkilerinin gösterilmiş olmasıdır (14, 20, 21, 22, 23). Pioglitazonun mitokondriyal biyogenez etkileri üzerine yapılan bir çalışmada SH-SY5Y (human nöroblastom-ATCC/CRL 2266) hücreleri kullanılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır (24). PPAR gama agonistlerinin etki mekanizmalarının aydınlatılması ile nörodejeneratif hastalıkların tedavisine büyük katkı sağlanabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmamızda yukarıdaki bilgiler ışığında SH-SY5Y (human nöroblastom-ATCC/CRL 2266) hücrelerine glukoz kısıtlaması sırasında keton ilavesi yapılarak uzun süreli açlık modeli uygulandı. Bu uygulama sırasında inkübasyon besiyerlerine PPAR gama agonisti (pioglitazon)

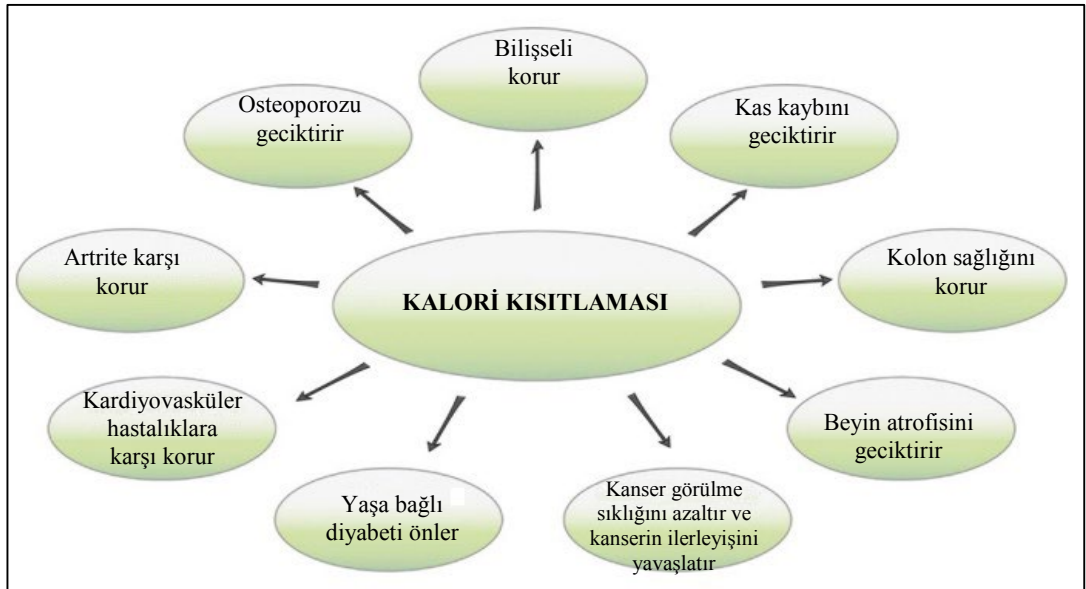
eklenerek enerji metabolizmaları, mitokondriyal fonksiyon ve hücre canlılıkları incelendi.



2 GENEL BİLGİLER

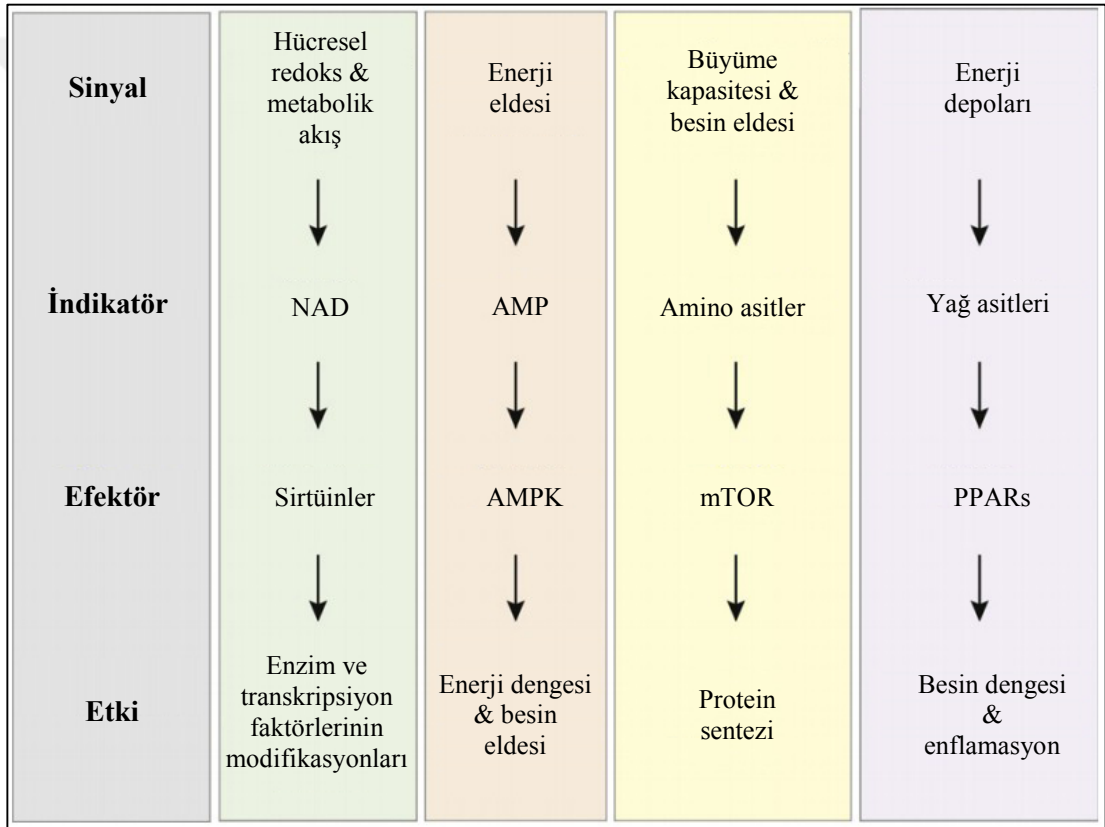
Yaşamımızın sağlıklı sürdürülmesi ve sağlıklı yaşam süremizin uzatılması için ispatlanmış tek yol uygun beslenme şeklidir (25). Beslenme bozuklukları; diyabet, obezite, hipertansiyon, gastrointestinal ve kardiyovasküler hastalıklar, gelişim geriliği, çeşitli metabolik hastalıklar ve kanser başta olmak üzere birçok sağlık sorununa neden olmaktadır (2, 26).

Son yıllarda kalori kısıtlaması ve uzun süreli açlığın beyin fonksiyonları üzerindeki etkileri deneysel ve klinik çalışmalarda incelenmiştir. Her iki durumda da glukoz kısıtlaması olduğundan beyin, alternatif enerji kaynağı olarak keton cisimlerini kullanmaktadır. Kalori kısıtlamasının; yaşam süresini uzattığı, yaşam kalitesini arttırdığı, kanser ve yaşlanmaya bağlı hastalıkları iyileştirdiği gösterilmiştir (2, 5, 6) (Şekil 1).



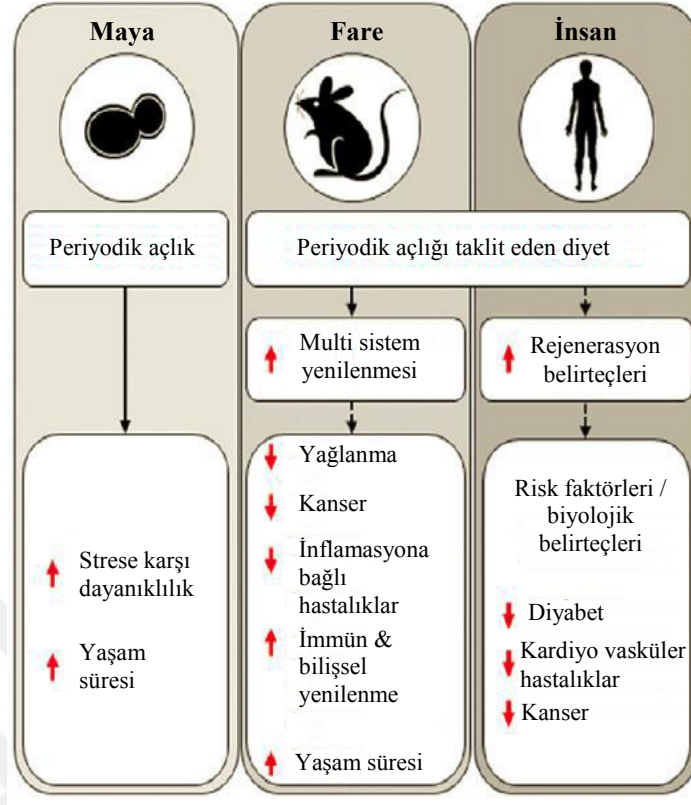
Şekil 1. Kalori kısıtlamasının etkileri. Kalori kısıtlamasının, çeşitli yaşlanma kriterlerine üzerine etkileri ile ilgili kemirgen ve insan dışındaki primatlarda (farelerde) yapılan çalışmaların sonuçları gösterilmektedir (2).

Metabolik regülatörlerin, kalori kısıtlaması ile yaşlanmanın geciktirilmesinde önemli rolleri vardır (2) (Şekil 2). Besin ve enerji algılama faktörleri; büyüme, metabolizma ve enflamasyon ile ilgili yollardan hücre içi/dışı sinyaller alırlar (2) (Şekil 2). Yağ tüketimindeki değişikliklerin, hücresel yapılarda yer alan yağ asitlerinin türünü ve sayısını etkilediği bilinmektedir (2). Lipidlerin taşınması-kullanımı, insan ve yaşlanma çalışmalarının ortak temalarıdır. Ayrıca lipid metabolizmasında meydana gelen değişikliklerin, kalori kısıtlaması modelindeki mekanizmalarda da yeri önemlidir (2).



Şekil 2. Kalori kısıtlaması ile değişen metabolik regülatörler. Kalori kısıtlaması diyet uygulaması sonucu bir çok besin ve enerji algılama faktörleri değişmektedir (2).

Kalori kısıtlamasının yukarıda bahsedilen olumlu etkileri; insanlar üzerinde yapılan çalışmalar yanında fareler, kemirgen ve insan dışında primatlarla yapılan çalışmalarla da desteklenmiştir.



Şekil 3. Brandhorst ve arkadaşlarının aralıklı beslenme çalışmaları. Aralıklı beslenmenin; mayalar, fareler ve insanlar üzerindeki etkileri (6).

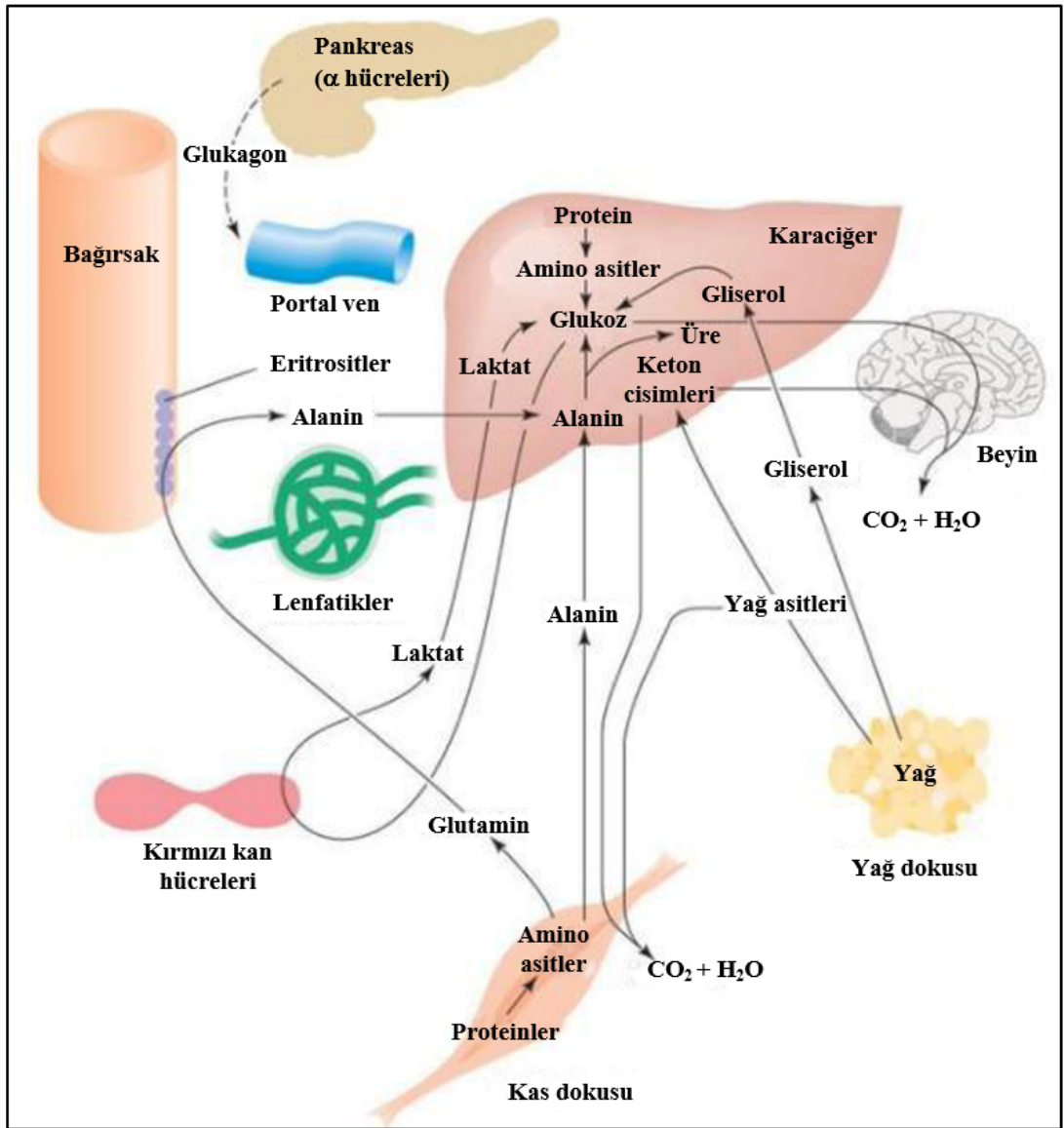
Ancak birçok kişi kalori kısıtlaması diyetlerini uzun süreli olarak devam ettirilmesinde zorlanmaktadır. Dolayısı ile alternatif beslenme modeli olarak, aynı biyolojik etkilere sahip olduğu düşünülen “Uzamış Açlık” önerilmektedir (5, 7, 27). Bahsi geçen uzamış açlığın bir çok olumlu etikeleri maya, fare ve insan deneyleri ile de işaret edilmektedir (Şekil 3) (6).

2.1 Uzun Süreli Açlık ve Ketojenik Diyetin Etki Mekanizması

Uzun süreli açlık, 12 saatten fazla süre ile hiçbir yiyeceğin tüketilmemesi olarak tanımlanmaktadır (26, 28). Ketojenik diyet ise düşük karbonhidrat, yeterli protein ve yüksek oranda yağ içermektedir.

Karaciğer ve kas hücrelerinde bulunan glikojen, glukozun depo şeklidir. Tokluk sırasında kan glukoz düzeyi yükselmekte ve insülin salgısı artmaktadır. İnsülin, dolaşımda bulunan glukozun hücrelere girişini sağlamaktadır. Açlık sırasında ise kan glukozu düşmektedir. Glukagon hormonu, kan glukoz homeostazisini sağlamak için salgılanmaktadır. Glukagon, karaciğerde depo şeklinde bulunan glikojenin glikojenoliz yoluyla yıkımını gerçekleştirmektedir. Glikojenin yıkımı ile serbest glukoz salınmakta ve glukoz homeostazisi sağlanmaktadır (29).

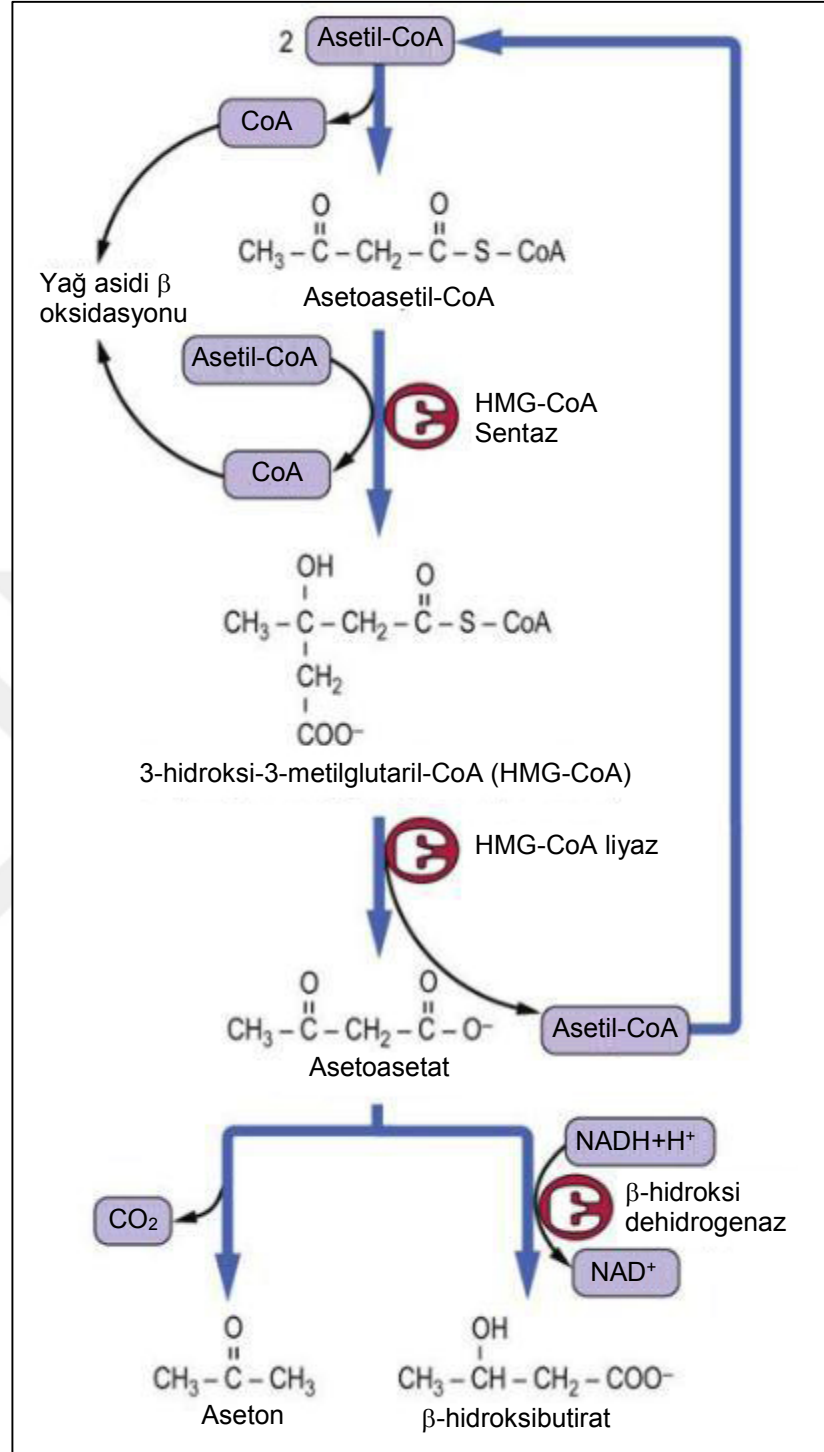
Beyin, temel enerji kaynağı olarak glukoz kullanmaktadır fakat uzun süreli açlık durumunda glukoz temini için karaciğerdeki glikojen depoları yetersiz kalmaktadır (29). Glukoz homeostazisi için proteinler yıkılır ve aminoasitler açığa çıkar. Bu şekilde glukoneojenik aminoasitlerden, glukoneogenez yoluyla glukoz sağlanmaktadır. Bu arada yağ asitleri yıkımı da başlamaktadır. Yağ asitleri de β -oksidasyonla Asetil CoA moleküllerine kadar yıkıma uğramaktadır. Glukoz, yağ asitleri ve aminoasitler metabolize olduklarında Asetil CoA oluşturmaktadır. Asetil CoA, krebs (trikarboksilik asit) döngüsüne katılmaktadır (Şekil 4).



Şekil 4. Uzun süreli açlık. Uzun süreli (>12 saat) açlık durumunda dokuların metabolik etkileşimleri (30).

Uzamış açlık sırasında; Asetil CoA’lardan, karaciğer hücresi mitokondrilerinde keton cisimleri meydana gelmektedir. Keton cisimleri; asetoasetat, 3-hidroksi bütirat ve aseton olmak üzere üçe ayrılmaktadır. Karaciğer hücrelerinde bulunan 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA sentaz enzimi (HMG CoA sentaz) ile Asetil CoA molekülleri birleşerek keton cisimlerini oluşturmaktadırlar. 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA sentaz enzimi, aynı zamanda keton cisimlerinin sentezinde hız kısıtlayıcı basamakta rol

almaktadır (Şekil 5). Aseton, akciğerlerden solunum yoluyla kullanılmadan atılmaktadır. Açlık esnasında daha az olmakla birlikte, ketoza giren hastalarda meydana gelen karakteristik koku asetondan kaynaklanmaktadır. Karaciğer hücreleri, keton cisimlerini parçalayan enzime sahip olmadıkları için, keton cisimleri kan dolaşımına geçmektedirler. Uzun süreli açlıkta, glukoz düzeyi düştüğü için mitokondrisi olan hücreler enerji kaynağı olarak keton cisimlerini kullanmaya başlamaktadır. Hücrelerde, keton cisimlerinden de Asetil CoA meydana gelmektedir. Meydana gelen asetil CoA'nın, krebs döngüsüne katılması ile de ATP sentezlenmektedir. Beyin için temel enerji kaynağı glukoz olmasına rağmen, uzun süreli açlıkta kan-beyin bariyerini geçebilen keton cisimleri de enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır (8, 10). Keton cisimlerinden; aseton metabolize olmadan solunum yoluyla atıldığından, asetoasetat ise 3-hidroksi bütirat üretimi sırasında bir ara ürün olarak kabul edildiği için, 3-hidroksi bütirat (β OHB) keton cisimlerinin başlıcası olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca, uzun süreli açlık sırasında enerji kaynağının çoğunluğu β OHB'dan gelmektedir (10).



Şekil 5. Keton cisimlerinin sentezi. Asetil CoA'dan keton cisimleri sentezlenmesi (29).

Ketojenik diyet: Ketojenik diyetin temelini oluşturan ilk araştırma 1922 yılında Wilder tarafından yayınlanmış ve ilaca dirençli epilepsi hastalarında pozitif etkileri

gözlemlenmiştir (8, 31, 32). 1940'lı yıllarda ise yeni anti-epileptik ilaçların geliştirilmesi ile ketojenik diyet popüleritesini kaybetmiştir. Hollywood yapımcısı Jim Abrahams'ın oğlu Charlie'nin ilaç tedavisine yanıt vermeyen epilepsi nöbetlerinin kontrolünün sağlanması için ketojenik diyet uygulanmış ve olumlu sonuç alınmıştır. Bunun üzerine ketojenik diyetin tanıtımı ve geliştirilmesi için Jim Abrahams tarafından "Charlie Foundation" derneği kurulmuştur. Jim Abrahams tarafından 1997 yılında, ketojenik diyetin etkinliğini gösteren "First Do No Harm" isimli film çekilmiştir. Ketojenik diyet, 2000'li yıllarda anti epileptik tedaviye rağmen nöbet kontrolü sağlanamayan epilepsi hastalarının tedavisinde, tekrar dikkatleri çekmiştir (32, 33).

Ketojenik diyet, açlık metabolizması ile uyumlu olarak düşük karbonhidrat, yeterli protein ve yüksek oranda yağ içermektedir. Ketojenik diyet uygulanmasının hemen ardından plazma; keton, insülin, glukoz, glukagon ve serbest yağ asit düzeylerinde değişiklikler meydana gelmektedir. Meydana gelen bu değişiklikler, farklı nörobiyolojik yollar üzerinde etki göstererek nöbet sıklığının azalmasını sağlamaktadır (8, 11, 32). Keton cisimleri ve ketojenik diyet ile yapılan bir çalışmada; diyet süresince ketogenez ve yağ asidi oksidasyonunun, PPAR γ etkileşimi ile düzenlendiği ispat edilmiştir (15).

2.2 Peroksizom Proliferatör ile Aktive Edilmiş Reseptörler (PPARs)

PPAR'lar, ilk olarak kemirgen karaciğerinde gösterilmiş ligant bağımlı nükleer reseptörlerdir (34). Nükleer reseptörler, hedef genlerin anlatımını düzenleyen transkripsiyon faktörleridir. Hedef genlerde; hücre bölünmesi, organogenez, homeostaz gibi işlevleri vardır (34). Nükleer reseptör ailesi; vitamin D reseptörleri, tiroid hormon reseptörler, retinoid reseptörler, steroid reseptörler, endojen ligandı ve daha bilinmeyen çeşitli reseptörlerden meydana gelmektedir. Özgün ligantların, bu reseptörlere bağlanmasıyla oluşan ekstrasellüler sinyaller hücrenin yanıt oluşturmalarını

sağlamaktadır. PPAR'ların; PPAR α , PPAR β/δ ve PPAR γ , olmak üzere üç farklı izotipi vardır (23, 35, 36).

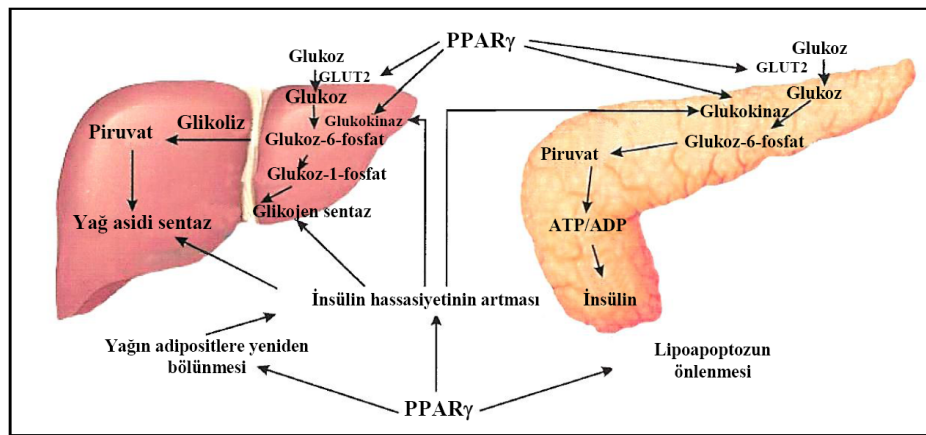
PPAR- α geni, nükleer reseptör transkripsiyon faktör ailesinden olan PPAR (Peroksizom Proliferatör ile Aktive Edilmiş Reseptör)'ı kodlamaktadır. Bu reseptör, özellikle mitokondriyal yağ asidi oksidasyonunda etkili genlerin anlatımında merkezi regülatör olarak rol oynamaktadır. PPAR- α 'nın anlatımı; mitokondri ve peroksizomal yağ asidi beta oksidasyon oranının yüksek olduğu karaciğer, kalp, böbrek, iskelet kası, kahverengi yağ dokularında yüksek oranda yapılmaktadır. Ayrıca; damar çeperi, monosit-makrofaj, düz kas ve endotelial hücrelerde de anlatımları vardır (23, 37, 38). PPAR- α 'nın ana yolağı ligant bağımlı aktivasyondur. PPAR- α ve retinoid-X reseptörü birlikte meydana getirdikleri heterodimerizasyon sonucu konformasyonel değişiklik meydana gelmektedir. Bu değişiklik, heterodimer kompleksin hedef genin promotor bölgesindeki PPAR Response Element (PPRE)'ye bağlanmasını güçleştirmektedir. Doğal PPAR- α 'nın ligantları, doymuş ve doymamış yağ asitleridir. Hedef genin aktivasyonu ile ansatürasyon oranı doğru orantılı olarak artmaktadır. Doğal ligantlardan başka ayrıca sentetik olarak (cilofibrate) ve ikinci generasyon fibratlar da PPAR- α 'yı aktive edebilme yetilerine sahiptirler (36, 39, 40).

PPAR β/δ izotipinin, hemen her yerde ifade edildiğinden özel dokulardaki ligant-aracılı etkilerini belirlemek zor olmaktadır (23, 41). Bu sebeple diğer izotiplerine göre önceleri önemi anlaşılamamıştır (41, 42). Daha sonra oluşturulan obez ve diyabetik hayvan modellerinde, HDL-kolesterolü yükselttiği ve beyaz adipoz doku yağ deposu, trigliserit, açlık insülin, LDL düzeylerini düşürdüğü ispat edilmiştir (43, 44). Dolayısı ile PPAR β/δ 'nın hiperlipidemi de uygun bir hedef olduğu gösterilmesi ile tekrar dikkatleri üzerine çekmiştir (43, 44).

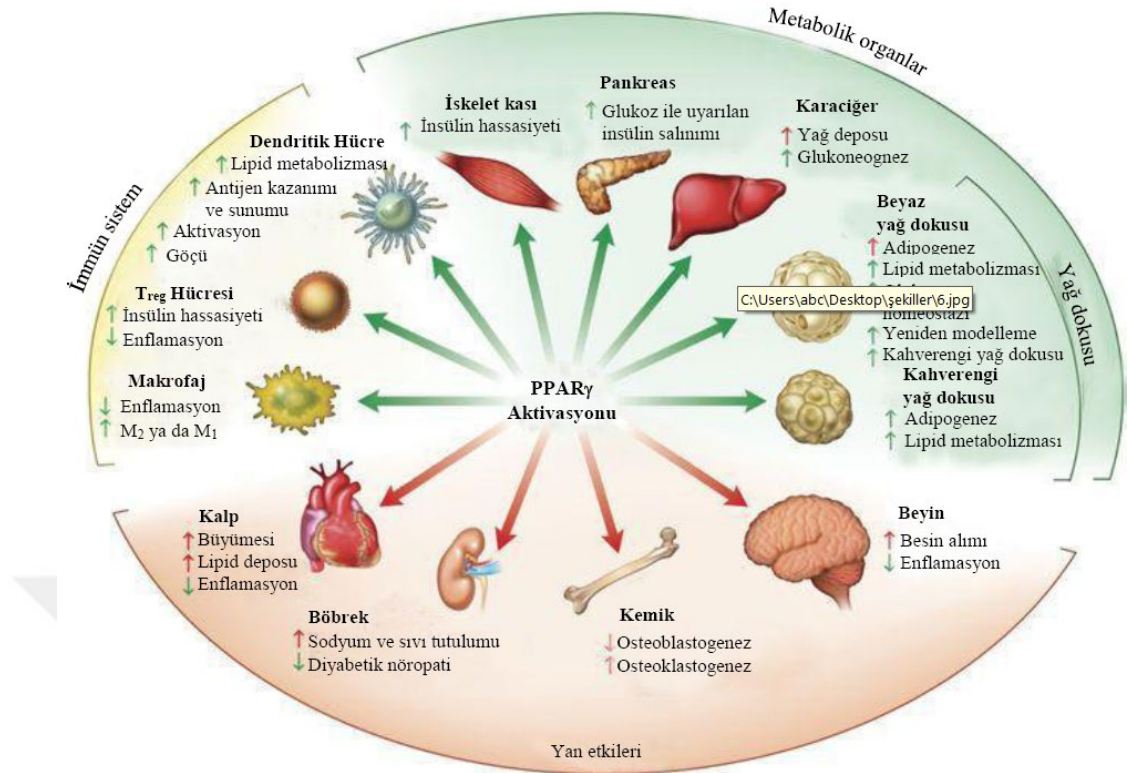
PPAR γ 'nın, PPAR γ 1 ve PPAR γ 2 olmak üzere iki izoformu vardır. PPAR γ 2, PPAR γ 1'den amino ucundaki 30 amino asitlik ilave dizisi ile ayrılmaktadır. PPAR γ 1'in anlatımı daha çok makrofajlarda, kolonda, iskelet kasında ve karaciğerde

yapılmaktadır. PPAR γ 2'nin anlatımı ise daha çok beyaz ve kahverengi yağ hücrelerinde gerçekleştirilmektedir. Özellikle PPAR γ 2 izoformunun adipogenez, lipit metabolizması ve insülin hassasiyeti üzerine pozitif etkilerinin yanında anti-enflamatuvar, anti-oksidan etkilerinin de olduğuna değinilmektedir (45).

PPAR γ ; sitokinler, indüklenabilir Nitrik Oksit Sentaz (iNOS), enflamasyonu önleyen prostaglandinler ile prostaglandinlerin sentezinden sorumlu olan Cyclooxygenase-2 (COX-2)'yi stimüle etmektedir. PPAR γ ; bir den fazla proenflamatuvar genin ifadesini de baskılayarak, enflamatuvar cevabın regülasyonunu sağlamaktadır (46). PPAR γ ; adiposit farklılaşmasında, lipit metabolizmasında, glukoz homeostazında da rol oynamaktadır (Şekil 6) (19, 46, 47, 48). PPAR γ 'nın, hedef genlerin anlatımının düzenlenmesine katkı sağladığı gibi anti-aterosklerotik etkisi de gösterilmiştir. PPAR γ ligantları; GLUT2, glukokinaz, glikojen sentez gibi glukoz homeostazı üzerinde etkisi olan ve yağ asidi sentaz gibi adiposit hücrelerinden salgılanan hormonların da regülasyonunu sağlamaktadır (49). Ayrıca, PPAR γ preadipositlerin adipositlere değişiminde önemli rolü olan bir transkripsiyon faktörüdür. PPAR γ 'nın; farklı sistem, organ ve dokular üzerin de etkileri Şekil 7 de görülmektedir (20, 36).

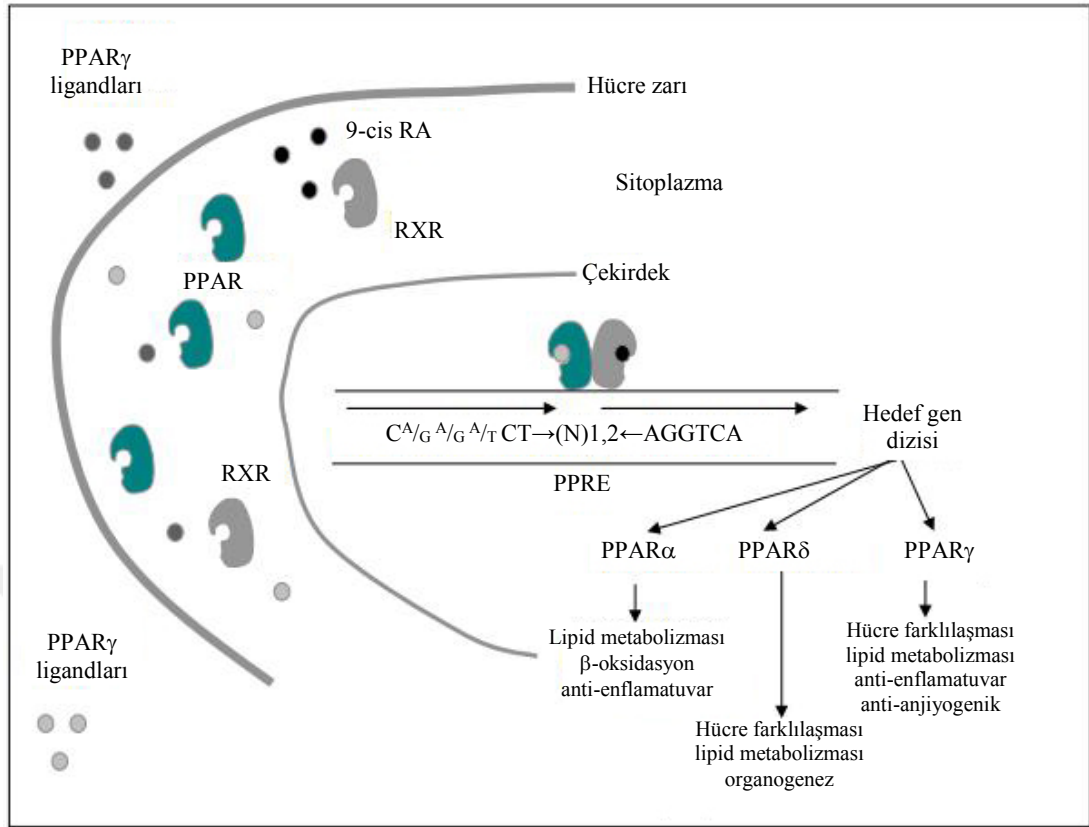


Şekil 6. PPAR-Gamma'nın etkileri. Aktive edilmiş PPAR-Gamma'nın karaciğer ve β -hücrelerinde bulunan glukoz sensörleri üzerindeki etkilerinin şematik gösterimi (50).



Şekil 7. PPAR γ aktivasyonu. PPAR γ 'nın aktive edilmesinin olumlu (yeşil oklar) ve olumsuz etkileri (kırmızı oklar) (20).

PPAR'lar, insandaki diğer transkripsiyon faktörlerinde olduğu gibi, gen ekspresyonun regülasyonundan da sorumludurlar (Şekil 8). PPAR'ların, izole edilmiş farklı izoformlarının olduğu ve bunların farklı dokularda dağılım gösterdiklerine işaret edilmektedirler (36, 51).



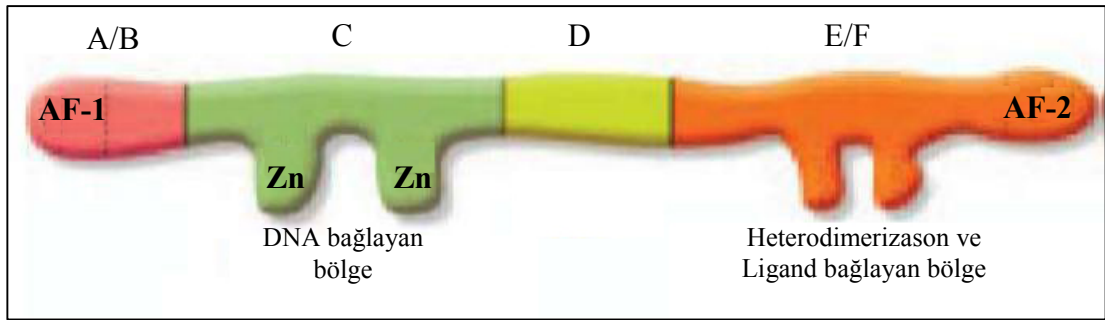
Şekil 8. PPAR anlatım regülasyonu. Gen ekspresyon regülasyonu mekanizmasının ve PPAR izoformlarının fonksiyonlarının şematik görünümü (52).

PPAR izoformları, dokularda farklı olarak eksprese olmakta ve organogenez dönemine göre de dağılım paterni artarak ya da azalarak değişiklik göstermektedirler (53). İzoformların metabolik özelliklerinde de farklılık kaydedilmiştir (Tablo 1). PPAR- α 'nın; özellikle karaciğer-böbrek ve kalp dokusunda anlatımı yapılırken, PPAR- γ 'nın adipoz dokuda anlatımı yapılmaktadır. PPAR α , hücrede yağ asidi β oksidasyonu ve lipoprotein sentezinin aktive edilmesinde rol alırken, PPAR- γ 'nın etkisi adiposit farklılaşmasında ve trigliserit sentezindedir (10, 36).

Tablo 1. PPAR izoformları ve organ ve dokulardaki metabolik rolleri (54).

	PPARα	PPARγ	PPAR β
Ekspresyon bölgeleri	Karaciğer, böbrek, kalp	Adipoz doku, makrofaj	Adipoz doku, deri ve beyin gibi birçok dokuda
Aktive edilen hücresel olaylar	Yağ asidi β oksidasyon, lipoprotein sentezi, aminoasit katabolizması	Adiposit farklılaşması, trigliserid sentezi	Yağ asidi β oksidasyonu
Fizyolojik fonksiyon	Açlıkta metabolik cevabın düzenlenmesi	Adiposit farklılaşması, yağ asidi depolama	Kas lifi tipi belirlemesi
Hedef gen örnekleri	Karnitin palmitoil transferaz I, HMG CoA sentaz 2, apoA-1	Yağ asidi-bağlayan protein 4, lipoprotein lipaz, adiponektin	Açıl-KoA oksidaz, karnitin palmitoil transferaz I

PPAR'ların korunmuş fonksiyonel bölgeleri vardır (Şekil 9) (35). A/B bölgesi içerisinde yer alan 1. aktivasyon bölgesinin AF-1 (Activation Function-1), liganattan bağımsız transaktivasyon fonksiyonlarından bahsedilmektedir. A/B bölgesi değişken dizilere ve uzunluklara sahiptir (55). Bununla birlikte, bu bölgede birden fazla kesip-ekleme yoluyla (splicing) oluşmuş farklılıkların yer alması, aynı nükleer reseptörlerin farklı izoformlarının olduğunu da ispatlamaktadır (36, 53).



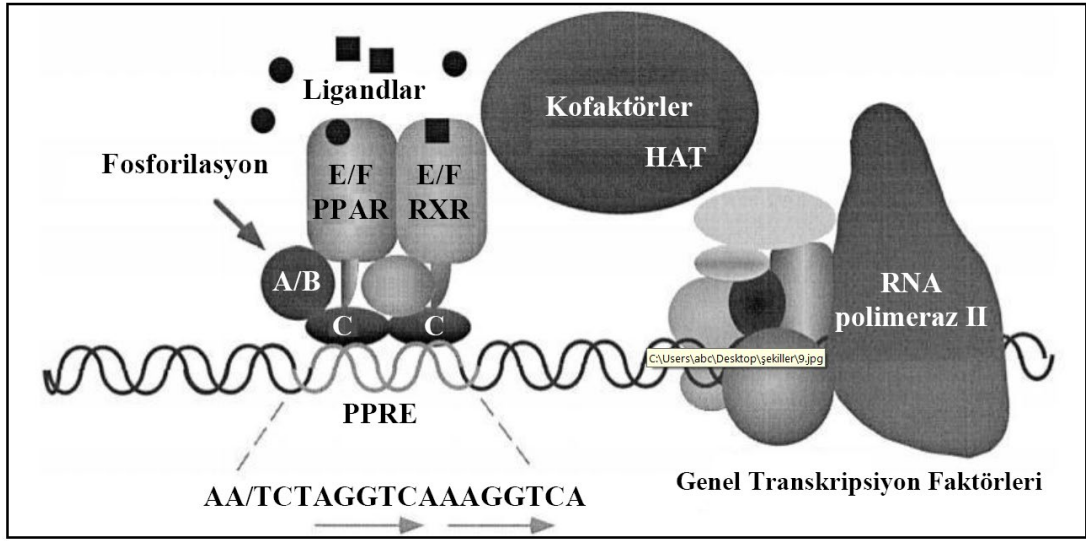
Şekil 9. PPAR'ın yapısı.

(A/B: Transaktivasyon ve fosforilasyon bölgesi, C: İki çinko parmak yapısıyla DNA bağlayan bölge, D: Menteşe bölgesi, E/F: Ligan bağlayan bölge, AF-1: 1. aktivasyon fonksiyonu bölgesi, AF-2: 2.aktivasyon fonksiyonu bölgesi (35)).

Deoksiribonükleik Asit (DNA) bağlayan bölge (C bölgesi), nükleer reseptörlerin en fazla korunmuş bölgeleridir. İki adet çinko parmak şeklinde katlanmaları vardır (26, 35).

PPAR; P-kutusunun primer dizisinin (CEGCKG, bütün PPAR proteinlerinde aynıdır) hedef genin promotor bölgesindeki PPAR Response Element (PPRE)'e bağlanması ile meydana gelmektedir (53). P-kutusu üzerindeki mutasyonlar transkripsiyonu durdurabilmektedir. PPAR, nükleer reseptör ailesinin başka bir üyesi olan 9-Cis Retinoik Asit Reseptörü ile heterodimer oluşturmakta ve bu heterodimer de DNA üzerindeki PPRE'ye bağlanmaktadır (36, 52).

PPAR liganda bağlanınca, özgün yapısal değişiklik meydana gelmektedir. Başka bir transkripsiyon faktörü olan Retinoid X Reseptör/Retinoik Asit Reseptörü (RXR/RAR)'a bağlanmaktadır. PPAR'lar daha sonra bir veya daha fazla koaktivatör proteinle etkileşime girmektedirler. Heterodimerik kompleksin oluşması gerçekleştikten sonra, kompleks nükleus içine transfer olarak hedef genin promotor bölgesinde bulunan PPRE'ye bağlanmaktadır. Ribonükleik Asit (RNA) polimeraz II ve başka transkripsiyon faktörlerinin de katılımı ile hedef genin transkripsiyonu yapılmaktadır (Şekil 10) (52, 53, 55). Ayrıca, PPAR'ların diğer transkripsiyon faktörleriyle etkileşmesi ile transkripsiyonu baskılama özelliğinin olduğu da ispatlanmıştır (26, 56).



Şekil 10. Transaktivasyon mekanizması. PPAR'ların hedef genlerde ki gen anlatımı (55).

2.3 Tiazolidinedionlar

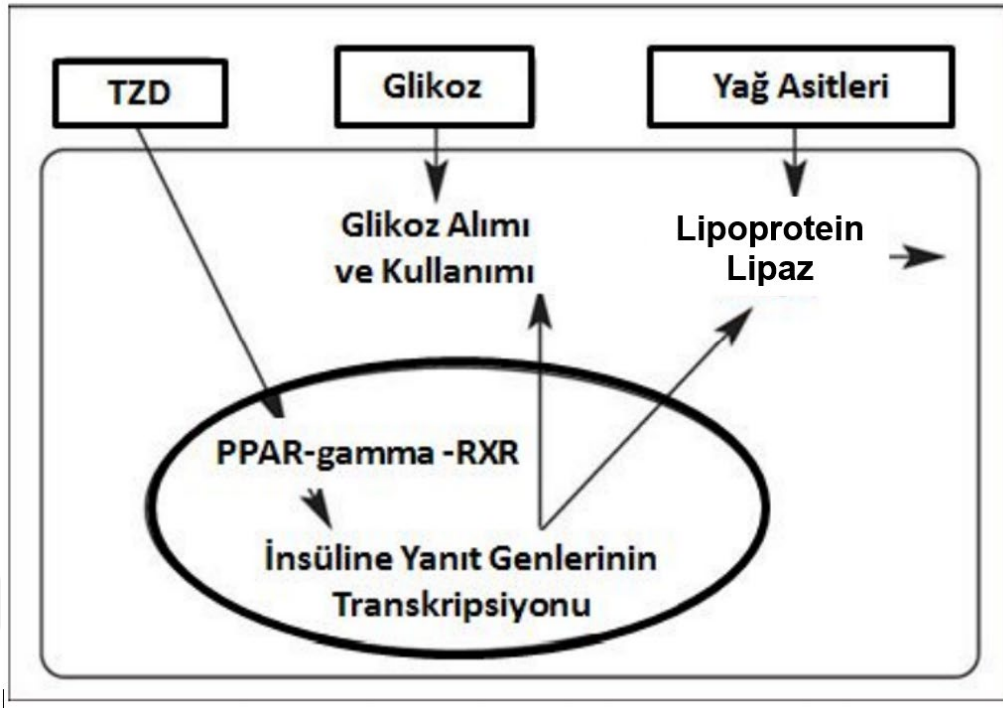
Diyabetes Mellitus (DM) hastalığı, glukoz homeostazının bozulmasıdır. Pankreasta bulunan ve insülin salgılamakla görevli olan beta hücrelerinin çeşitli nedenlerle tahrip olması sonucu yeterli insülin salgılayamaması sonucu gelişen Tip I ve insülin direnci sonucu gelişen Tip II diyabet olmak üzere 2 tip DM hastalığı vardır. Her iki tipin tedavisinde de kandaki glukoz seviyesinin normal sınırlar içerisinde tutulması esastır. DM tedavisi için geliştirilen ilk farmakolojik yaklaşımların gastrointestinal sistem, kardiyovasküler sistem gibi bazı sistemlere ve karaciğere yan etkileri mevcuttur. Yeni nesil geliştirilen anti-diyabetik ilaçlar ile bahsi geçen yan etkiler bertaraf edilmeye çalışılmaktadır (57, 58, 59, 60) .

DM tedavisinde günümüzde sıklıkla kullanılan tiazolidinedionlar (glitazonlar), PPAR- γ agonistidirler başka bir deyiş ile yaygın olarak incelenen PPAR γ ligandlarıdır. Hormonların, vitaminlerin, endojen metabolitlerin ve ksenobiyotik bileşiklerin sensörleri olarak görev yapan PPAR γ 'lar, çok sayıda genin ekspresyonunu

kontrol eden nükleer reseptörlerdir. PPAR- γ 'nın adiposit farklılaşmasını, yağ asidi depolamasını, glukoz metabolizmasını düzenlediği bilinmektedir ve antidiyabetik ilaçların hedefidir (19, 47, 48). PPAR- γ 'nın farklı agonistleri de olmasına rağmen en popüler olanları tiazolidinedionlardır (Tablo 2) (57). Tiazolidinedionlar; troglitazon, pioglitazon ve rosiglitazon olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. Tiazolidinedionların ilk örneği olan ciglitazon ilk defa 1982 yılında tanımlanmıştır. Fakat etkisinin az ve yan etkilerinin fazla oluşu sebebi ile klinikte kullanılamamıştır. Ardından kullanılan troglitazon ise hepatotoksisteye ve ölümlere neden olması ile 2000 yılında piyasadan çekilmiştir (58). Tiazolidinedionlar; karaciğer, yağ ve kas dokusunda PPAR- γ reseptörlerini stimüle ederek, dokuların insüline karşı olan hassasiyetini artırmaktadırlar (Şekil 11). Yeni nesil Tiazolidinedionların ise, etkinlikleri ve güvenlilikleri ispat edilmiştir (59, 60).

Tablo 2. PPAR- γ agonistleri (57).

Doğal PPAR-γ agonist		Linoleik asit Linolenik asit Araşidonik asit, Eikozapentaenoik asit, Oleik asit 15-Deoxy-d 12,14- prostaglandin J2 (15d-PGJ2) 12, 15-hidroksieikozatetraenoik asit (HETE) 9,13-hidroksioktadekadienoik asit (HODE) Lizofosfatidik asit (LPA) Okside fosdolipidler
Sentetik PPAR-γ agonist	TZD	Ciglitazon Troglitazon Rosiglitazon Pioglitazon
	TZD olmayanlar	GW1929 GW7845
	PPAR-α/γ agonist	Muraglitazor GW409544 Naveglitazor Tesaglitazor Netoglitazon
	PPAR-$\alpha/\gamma/\delta$ agonist	Bezafibrat
PPAR-γ antagonist		BADGE GW9662 LG100641 PD068235 SR202



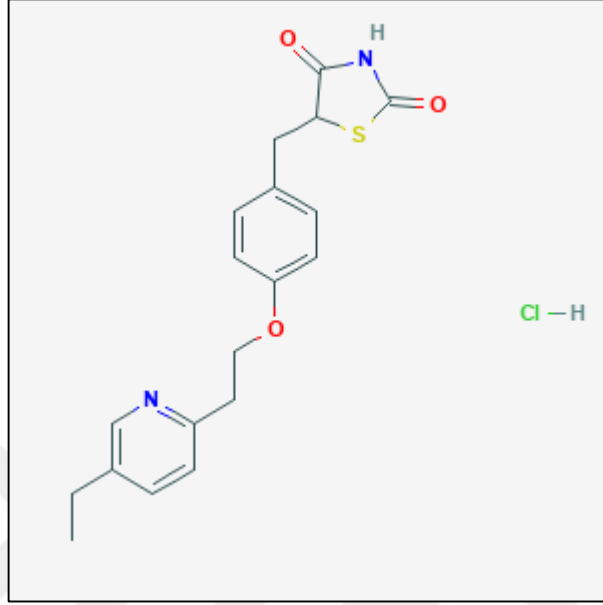
Şekil 11. Tiazolidinedionların etki mekanizması. Tiazolidinedionların glukoz ve yağ asitleri üzerine etkileri (59, 61, 62).

Tiazolidinedionlar, özellikle adipositlerde bir nükleer transkripsiyon faktörü olan nükleer reseptörlere (PPAR γ) bağlanarak aktive etmektedirler. Diğer bir deyiş ile bu reseptörlerin agonistidirler (61, 62). Kemirgenlerde, tiazolidinedionların subkutan yağ depolarında adipogenezi stimüle ederek küçük yağ hücrelerini sayıca arttırdığı gösterilmiştir (63). PPAR γ ligantları, adipositlerden ayrılan serbest yağ asitleri üzerinde etkili olan ve adiposit hormonlarını kodlayan genlerin anlatımının düzenlenmesinden de sorumludurlar (25, 41).

2.3.1 Pioglitazon

Tiazolidinedion grubu ilaç olan pioglitazon hidroklorür; anti diyabetik özellikte, oral olarak kullanılan, 392.898 g/mol molekül ağırlığında, IUPAC adı: 5- ((4-(2-(5-ethylpyridin-2-yl) ethoxy)phenyl)methyl) -1,3- thiazolidine-2,4-dione; hydrochloride

ve molekül formülü $C_{19}H_{21}ClN_2O_3S$ olan aktif tiazolidinedion hidroklorür tuzudur (59, 64) (Şekil 12).



Şekil 12. Pioglitazonun kimyasal yapısı (65).

Pioglitazonun, glisemik kontrolün yanı sıra tip 2 diyabetli hastalarda kardiyovasküler hastalıklar riski üzerine pozitif etkileri olduğu da kanıtlanmıştır (66, 67). 2000 yılında kullanılmaya başlanan pioglitazon, günümüzde kullanılmakta olan tek tiazolidinedion grubu ilaçtır. Hem egzersiz hem de diyet ile kontrol edilemeyen kilolu diyabet hastalarında oral monoterapide kullanım onayı 2002 senesinde alınmıştır (68). Pankreas β -hücre fonksiyonlarının %50'si normal olan diyabet hastalarında, pioglitazon kullanılan monoterapide HbA1c'de %1,5 ve açlık kan glukoz değerlerinde ortalama 4 μ g/dL düşüş gözlemlenmiştir. β -hücre fonksiyonları %50'den daha fazla bozuk olan hastalarda ise diğer ajanlarla kombine olarak kullanılması önerilmektedir (69).

2.4 Mitokondriyal Fonksiyonların Değerlendirilmesi

Mitokondri, bütün ökaryot hücrelerin sitoplazmasında yer alan 0.5- 1 µm çapında çubuk ya da yuvarlak şekilli organeldir. Mitokondri, dış membran ve iç membran olmak üzere iki ayrı membran sistemine sahip olup iç membran; geniş bir yapıya sahiptir, sıkı bir şekilde katlanmış ve üzerinde çıkıntı şeklinde bulunan “krista” olarak adlandırılan yapılar bulunmaktadır. Dış membrana paralel olarak düzenlenmiş kıvrımlar şeklindedirler. İki membran arasında kalan boşluğa membranlar arası boşluk ve iç membranın kapladığı yoğun sıvıya matriks adı verilmiştir. Dış membran geçirgendir ve bu geçirgenlik porin adı verilen transmembran protein kanallar aracılığı ile olmaktadır. Dış membran, 10 kilodalton (kDa)’dan küçük molekülleri ve iyonları bu kanallar aracılığı ile geçirebilmektedir. İç membran ise sadece özel yapılı protein taşıyıcıları aracılığı ile Adenozin Difosfat (ADP) ve uzun zincirli yağ asitlerinin de dahil olduğu özel moleküllere karşı geçirgendir (70, 71, 72).

Mitokondri iç membranı; oksidatif fosforilasyon ile ilgili enzimleri içerdiğinden ötürü, mitokondriler “hücrelerin enerji merkezleri” olarak tasvir edilmektedir (72, 73). Kristaların sayısı ve morfolojisi hücrenin enerji gereksinimine göre değişmektedir. Sıkı bir şekilde katlanmış ve geniş bir yapıya sahip olan krista lamelleri, kas ve nöronlarda geniş bir yüzeyi kaplamaktadır (74). Elektron mikroskop analizlerinde, mitokondri iç ve dış membranında “benekli bölgeler” tespit edilmiştir. Son yapılan çalışmalara göre bu bölgelerin, proteinlerin transportunda önemli bir görevi olduğu tahmin edilmektedir (72, 73).

Matriks içerisinde, sitrik asit döngüsü ve yağ asidi oksidasyonu ile ilgili reaksiyonların büyük bir kısmı gerçekleşmektedir. Sitrat sentaz enzimi de mitokondrinin matriks kısmında yer almaktadır. Ayrıca, trisiklik asit siklüsünün ilk enzimidir. Hücre ekstraksiyonlarında gerçekleştirilen sitrat sentaz aktivitesi ölçümü, mitokondri aktivitesi ve fonksiyonlarının indirekt göstergesi olarak kabul edilmektedir (75). Ayrıca, trisiklik asit siklüsünün ilk enzimidir. Hücre ekstraksiyonlarında

gerçekleştirilen sitrat sentaz aktivitesi ölçümü, mitokondri aktivitesinin indirekt göstergesi olarak kabul edilmektedir. Ayrıca, mitokondriyal DNA (mtDNA) ve ribozomlar-gen ekspresyonu ile ilgili enzimler de yine matriks içerisinde yer almaktadırlar (72, 76).

Mitokondrilerin, hücrelerde dağılımlarının rastgele olmadığı ve enerji ihtiyaçlarını en kısa zamanda karşılayabilecek şekilde yer aldıkları düşünülmektedir . Mitokondriler dinamik organellerdir. Ayrıca, yalnızca hücredeki pozisyonları değil aynı zamanda fisyon-füzyon reaksiyonlarının gerçekleşmesine bağlı olarak da şekilleri, büyüklükleri, sayıları farklılık göstermektedir. Mitokondriler, steroid ve yağ asidi sentezi, aminoasit, karbonhidrat ve protein metabolizması ile kalsiyum homeostazının regülasyonunu da içeren metabolik fonksiyonları düzenler (72, 74, 77).

SH-SY5Y insan nöron hücre hattı nörolojik araştırmalar ve mitokondriyal fonksiyon çalışmalarında oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmalarımızda, bahsi geçen nöron hücre hattında mitokondri sayısının ve mitokondriyal aktivitesinin dolaylı olarak göstergesi olan sitrat sentaz testi uygulanmıştır (16).

3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereçler ve Kimyasallar

Çalışmamız sırasında kullanılan cihazlar Tablo 3’de, kimyasallar/kitler Tablo 4’de, plastik/cam malzemeler Tablo 5’te, hücre hattı serisi 3.1.1’ de yer almaktadır.

Tablo 3. Kullanılan cihazlar.

Cihaz	Markası
İnkübatör	Thermo Scientific
Laminer Hava Akım Kabini	Thermo Scientific
Mikroskoplar	Zeiss
Buzdolabı	Beko
Derin Dondurucu	Kirsch ve Haier
Azot Tankı	Thermo Scientific
Santrifüjler	Thermo Scientific
Su Banyosu	Nüve
Otoklav	Wisd
Sonikatör	Vwr
Otoanalizör	Siemens Advia, USA

Tablo 4. Kullanılan kimyasallar/kitler.

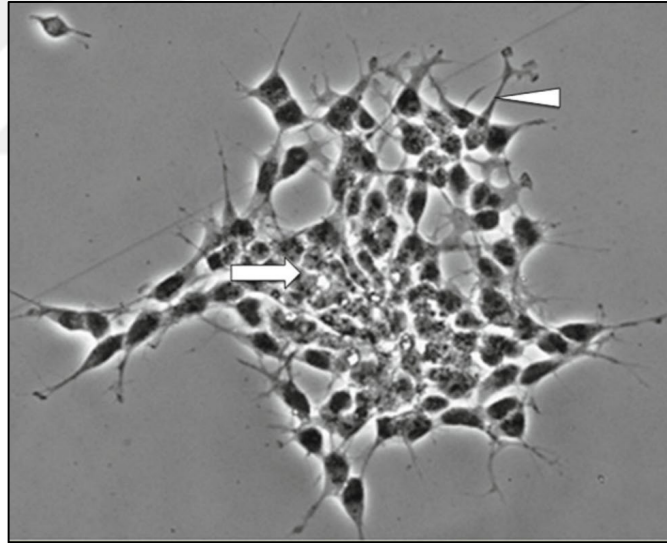
Malzeme/Kimyasal	Markası
DMEM/F12(Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Gibco-11330057
DMEM, no glucose (DMEM0)	Gibco-11966025
EBSS (Earle'nin Dengeli Tuz Çözeltisi)	Sigma-E2888
PBS (Fosfat Tamponlu Tuzlu Su)	Pan Biotech-P04 36500
FBS (Fetal Sığır Serum)	Gibco- 26140079
DMSO (Dimetil Sülfoksit)	Sigma Aldrich, D- 2650
Pen-Strep (Penisilin-Streptomisin)	Gibco- 15750060
Sitrat Sentaz Aktivite Deney Kiti	Abcam- ab119692
MTT (dimethylthiazol, hücre proliferasyon kiti)	Roche- 11465007001 (USA)
Pioglitazon	Sigma Aldrich, E6910
Betahidroksi Butirat (BOHB)	Sigma Aldrich, H9408

Tablo 5. Kullanılan plastik/cam malzemeler.

Malzeme/Kimyasal	Markası
Pipetler	Thermo Scientific
Pipet Uçları	CAPP
Hücre Kültür Kapları	TPP
Şırınga Filtresi	İsolab, 0.22µm
Hemositometre	HBG-Neubauer
Serolojik Pipetler	CAPP
Pipetör Tabanca	CAPP

3.1.1 Kullanılan hücre hattı serisi

Tezimizde ATCC'den ticari olarak satın alınan SH-SY5Y (human nöroblastom-ATCC/CRL 2266) (Resim 1) hücre hattı kullanıldı.



Resim 1. SH-SY5Y hücreleri. Sol ok küme halindeki nöron hücrelerini, sağ ok ise nöron hücrelerinin akson uzantısını göstermektedir (Zeiss marka kameralı mikroskop ile çekilmiştir).

3.2 Yöntemler

3.2.1 Besiyerlerinin hazırlanışı

3.2.1.1 Kontrol besiyerinin hazırlanışı (K)

SH-SY5Y Nöron hücreleri; %10 FBS ve %1 Penisilin/Streptomisin içeren DMEM/F12-besiyeri içerisinde kültüre edildi (Glukoz miktarı: 300mg/dL).

3.2.1.2 Dondurma besiyerinin hazırlanışı

%20 FBS, %70 DMEM/F12 ve %10 Dimetil Sülfoksit (DMSO) eklenerek hazırlandı.

3.2.1.3 Uzun süreli açlık/kalori kısıtlanması modeli besiyerlerinin hazırlanışı

Tüm keton içeren besiyerleri içerisinde 5mM Beta Hidroksi Butirat (β OHB) ve %1 oranında Pen/strep mutlak olmak üzere; açlık modeli: Earle'nin Dengeli Tuz Çözeltisi (EBSS)'a %10 oranında FBS ilave edilerek hazırlandı (glukoz miktarı 100 mg/dL). Ayrıca son inkübasyon besiyerlerinde 5mM β OHB olacak şekilde yapıldı.

3.2.1.4 Betahidroksi butirat (β OHB) stok solüsyonu/besiyerinin hazırlanışı

Molekül ağırlığı 126.09 g/mol olan betahidroksi butirat (β OHB)'tan 10ml'lik besiyeri için finalde 5mM olması için hesaplamalar yapıldı. 0,630 mg β OHB, 50 ml

steril PBS içinde çözdürölüp, 0.22 µm'lık şırınga filtresi ile filtrelendi ve steril hale getirildi. 5mM BOHB için 7600 µl besiyerine 400 µl BOHB ilave edildi.

3.2.1.5 PPAR gamma agonisti içeren solüsyonun/besiyerinin hazırlanışı

Pioglitazonun çözünme aşamasında....

Normalitesi 0. 1 (0, 1N) olan HCL asit ile 20 ml, 5 mM pioglitazon stok solüsyonu hazırlandı. 5 dakika sonikatörde, ardından yarım saat su banyosunda bekletildi ve son olarak şırınga filtresi (0, 22µm) ile filtre edildi. 5ml olan EBSS ile hazırlanmış keton içeren açlık (FB) besiyerine 5 µl olarak ilave edildi. Son inkübasyon konsantrasyonu 5µM olacak şekilde organizasyon yapıldı (24, 78).

3.2.2 Hücre kültürü çalışmaları

Donmuş şekilde elimize ulaşan hücreler, hızlıca ATCC hücre kültürü kitapçığında belirtildiği gibi çözüldü, hücre sayımı yapıldı. Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12 (DMEM/F-12), L-glutamine (1: 1) ve %10 Fetal Sığır Serumı (FBS) besiyeri ile 2×10^5 cells/cm² yoğunlukta 25 cm² hücre kültürü kaplarına ekim yapıldı, 37°C'de saklandı ve besiyerleri iki günde bir değiştirildi (hücre popülasyonu iki katına çıkma süresi verileri doğrultusunda yaklaşık 29. saati işaret etmektedir) (79). Hücreler %80-90 konfluent olduktan sonra çoğaltmak üzere tripsin ile kaldırılıp, yeni hücre kültürü kaplarına alındı. Yapılan deney planı doğrultusunda çoğaltılma yapıldıktan sonra bir miktar hücre dondurularak saklandı. Diğer bir kısmı da deney yapmak üzere uygun hücre kültürü kaplarına ekildi.

3.2.2.1 Dondurulmuş hücrelerin çözülmesi

Kriyo tüpte bulunan hücreler (37°C) su banyosunda hızlıca çözündürüldükten sonra santrifüj tüpüne 9 ml kontrol besiyeri ile alınarak 500 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı atılıp, pelet 1ml besiyeri içerisinde homojenize edildi, hücre sayımı yapıldı, hücre sayısına uygun hücre kültürü kabına ya da plakasına kontrol besiyeri ile ekildi ve 37°C sıcaklık, %95 nem ve 5%'lik CO₂ sağlayan inkübatöre alındı.

3.2.2.2 Hücrelerin sayımı

Hücreler; 3.2.2.4. konfluent hücrelerin pasajlanması protokolünde anlatıldığı gibi kaldırılıp, 500 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı atılıp, pelet 1ml kontrol besiyeri içerisinde homojenize edildi. Bu karışımdan 50 µl alınıp, 200 µl kontrol besiyeri ile süspanse edildi (1/5 oranında dilüsyon). Bu karışımdan 10 µl alınıp, üzerine 10 µl tripan mavisi ilave edildi (toplamda 1/10 dilüsyon). 10 µl bu karışımdan alınıp, Neubauer tipi hemositometre yardımı ile hücreler sayılıp, aşağıda belirtilen formül ile hesaplandı. Formül = $10^4 \times \text{dilüsyon oranı} (10) \times \text{hemositometrede sayılan hücre miktarı}$.

3.2.2.3 Besiyeri değişim protokolü

- T25'lik hücre kültürü kabına 5 ml
- T75'lik hücre kültürü kabına 10 ml
- 96 Kuyulu hücre kültürü plakasının her bir kuyusuna 100 µl
- 12 Kuyulu hücre kültürü plakasının her bir kuyusuna 1.5 ml
- 6 Kuyulu hücre kültürü plakasının her bir kuyusuna 3 ml olan eski besiyerinin çekilip, atılmak sureti ile yine aynı miktar taze besiyeri ilave edildi.

2 günde bir besiyeri değişimi yapıldı.

3.2.2.4 Konfluent hücrelerin pasajlanması

Yüzde 80-90 konfluent olan hücreler, hücre kültürü kaplarına ve plaka kuyularına pasaj yapıldı; hücre kültürü kabındaki ya da plaka kuyusundaki eski besiyeri tamamen çekildi. T25 için 1ml, T75 için 1.5 ml, 12 kuyucuklu hücre kültürü plakası için 200 µl, 6 kuyulu hücre kültürü plakası için ise 500 µl tripsin (%0.05 PBS ile seyreltilmiş) ilave edildi. 4 dakika inkübatörde (37⁰C) bekletildi. Sonrasında tripsin aktivitesini durdurmak için, eklenen tripsin miktarının üç katı kadar kontrol besiyeri ile homojenize edildi. Santrifüj tüpüne alınıp, 500 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üst sıvı atıldı ve pelet 1 ml kontrol besiyeri ile homojenize edilip, uygun hücre kültürü plakasına ya da kabına pasaj yapıldı.

3.2.2.5 Hücrelerin dondurulması

Yüzde 80-90 konfluent olan hücre kültürü kaplarındaki hücreler stok elde etmek amacı ile hızlıca donduruldu. Hücre kültürü kabındaki eski besiyerinin tamamı çekildi. T25 için 1ml, T75 için 1.5 ml tripsin (%0.05 PBS ile seyreltilmiş) ilave edildi ve 4 dakika inkübatörde bekletildi. Eklenen tripsin miktarının üç katı kadar kontrol besiyeri ilave edilmek sureti ile homojenize edildi. Santrifüj tüpüne alınıp, 500 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üst sıvı atıldı ve pelet 1 ml taze kontrol besiyeri ile homojenize edilerek, hücre sayım protokolüne uygun bir şekilde hücre sayımı yapıldı. Her bir kriyotüp içinde, 1ml dondurma besiyerine 1milyon hücre ilave edildi. Kriyotüpler; ilk 24 saat -20⁰C'de, ikinci 24 saat -80⁰C'de bekletildikten sonra uzun süreli saklanabilmesi için azot tankına (-196⁰C) alındı.

3.2.2.6 Hücre canlılığının kontrolü

Hücre sayımı yönteminde belirtildiği şekilde dilüe edilen hücre süspansiyonundan 10 µl alınıp, 10 µl tripan mavisi eklendi, mikroskopta boyanmış ve boyanmamış hücreler sayıldı (Tripan mavisi, sadece ölü hücrelerin membranlarından geçebildiği için canlı hücreler boyanmamaktadır). Hücre canlılığı % olarak ifade edildi. (Boyanmamış hücre/ Toplam hücre) X 100, formülü ile hesaplandı. Ayrıca, 3.2.2.11’de anlatılan MTT (dimethylthiazol) kiti ile de hücre canlılığı deneyleri yapıldı.

3.2.2.7 Optimizasyon çalışmaları

Hücreler 6. pasajında 100 000 olacak şekilde her birinin alanı 4 cm² olan 12 kuyulu hücre kültürü plakalarına ekildi. %80 yoğunluk görüldüğü zaman hücre kültürü plakaları kuyularından besiyerleri alındı, kuyular 1 ml steril PBS ile yıkandı. Uzun süreli açlık modeli deneylerimizin optimizasyonu için; Kontrol (K, DMEM/F12+10% FBS) (300mg/dL glukoz), F (EBSS+10% FBS) (100 mg/dL glukoz) ve G0 (DMEM0-Gibco-11966025 + 10% FBS) (0 mg/dL glukoz) olmak üzere glukoz açısından farklı 3 grup tasarlandı. Bu besiyerler toplam hacim 2 ml olacak şekilde hücre kültürü plakalarına eklendi. Hücreler sırası ile 4, 8, 12, 16, 20 saat yukarıda bahsi geçen besiyerlerde inkübe edildi. Her inkübasyonun sonunda kuyulardan besiyerleri toplandı glukoz, keton, laktat, laktat dehidrogenaz (LDH) miktarı bakılmak üzere ayrı ayrı tüplere konularak analiz edildi. Hücreler 200 µl tripsin/EDTA ile kaldırıldı. 1 ml besiyeri ile homojenize edildi. İçinden 10 µl alınarak 10 µl tripan mavisi ile karıştırıldı. Karışımdan 10 µl alınıp Neubauer tipi hemositometre lamına konularak hücre canlılığına bakıldı. Hücrelerin canlı kalma oranları, LDH seviyeleri ve simüle edilmeye çalışılan 12 saatten fazla açlık modeli uygulama durumları karşılaştırılarak en ideal inkübasyon süresinin 16 saat olduğuna karar verildi. (Tablo 8, Şekil 14).

Çalışma Planı: Hücreler %80 konfluent olduktan sonra; çalışmalarımız kontrol, kalori kısıtlaması, keton ve pioglitazon uygulanan besiyerler ile kültüre ettiğimiz hücreler olmak üzere 3 grup ve alt gruplarıyla birlikte toplamda 6 grup olacak şekilde planlandı:

Deney Grupları: Kontrol (K), besiyeri ile inkübe edilmiş hücreler: Bu besiyeri 300 mg/dL glukoz içermektedir (DMEM/F12 + 10% FBS) (DMEM/F12, Gibco-11330057; FBS, Gibco-26140079). Glukozdan yoksun açlık modeli (F): Earle'nin Dengeli Tuz Çözeltisi (EBSS, Sigma- E2888) + 10% FBS içeren besiyeri. Bu besiyerin glukoz oranı 100 g/ dL'idi. Alt gruplar 5mM keton (Beta-hydroxy butyrate- β OHB, Sigma Aldrich- H9408) ilave edilerek oluşturuldu. Bahsi geçen bu gruplar, fizyolojik açlık durumlarını taklit eden (FB) ve keton kontrol (KB) grubu olarak adlandırıldı. Son olarak, pioglitazon (Sigma Aldrich, E6910), (PPAR γ Agonisti) ilave edilmiş besiyerlere de "P" harfi eklendi (KBP, FBP). Gruplar, nöron hücrelerinin, besiyerlerinde sadece keton varken ve keton ile pioglitazonun birlikte olduğu ortamlarda davranışlarını gözlemlemek üzere tasarlandı (Tablo 6).

Tablo 6. Deney grupları ve besiyeri içerikleri.

	Besiyeri	FBS	β OHB	PPAR γ Agonisti	Glukoz İçeriği (mg/dL)
K	DMEM/F12	10%	0	0	300
KB	DMEM/F12	10%	5mM	0	300
KBP	DMEM/F12	10%	5mM	5 μ M	300
F	EBSS	10%	0	0	100
FB	EBSS	10%	5mM	0	100
FBP	EBSS	10%	5mM	5 μ M	100

Kontrol (K) ve açlık (F) besiyerleri kontrol grubu olarak kullanıldı. KB ve FB grupları pioglitazon ilave edilmiş (KBP ve FBP) grupları için kontrol grupları olarak kullanıldı. Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12 (DMEM/F- 12), Earle'nin Dengeli Tuz Çözeltisi (EBSS) ve Fetal Sığır Serum (FBS).

3.2.2.8 Biyokimyasal analizlerin yapılması

Besiyeri kültürlerinin glukoz kullanımlarını, hücre ve mitokondri hasarlarını kontrol etmek amacıyla; glukoz, LDH ve laktat seviyeleri ADVIA 1800 (Siemens) otoanalizör ile takip edildi.

Glukoz ölçümü; heksokinaz ve ATP, glukozu glukoz 6-fosfat ve ADP'ye dönüştürür. Glukoz 6-fosfat, glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi ile NADP oluşturur. Oluşan NADP'nin 340/ 410 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümü yapıldı. Glukozun analiz ölçüm aralığı 1-700 mg/ dL'dir.

Laktat ölçümü; laktat piruvata okside olurken NAD⁺'da NADH'ye dönüşmektedir. NADH'nin 340/383nm'de spektrofotometrik olarak ölçümleri yapıldı. Laktatın analiz aralığı, 2- 50 mg/ L'dir.

Laktat dehidrogenaz aktivitesi, piruvatın substrat olduğu NADH oksidasyonunun 340nm'de optik yoğunluğundaki azalma ile tayin edildi. LDH'nin analiz aralığı 10- 750 U/ L'dir.

Besiyerlerin deney öncesi/sonrası keton (β OHB) analizleri, Abbot Precision- Xtra POCT ile yapıldı. 10 μ l besiyeri, keton proba yüklenerek ölçümler gerçekleştirildi.

3.2.2.9 Sitrat sentaz aktivitesi ölçümü

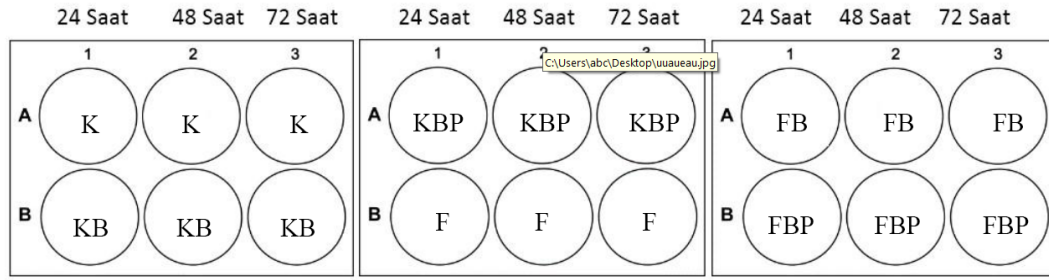
Sitrat sentaz, mitokondri matriksinde yer alan trisiklik asit siklüsünün ilk enzimidir. Hücre ekstratlarında sitrat sentaz aktivitesi ölçümü mitokondri aktivitesi ve sayısının indirekt göstergesi olarak kabul görmektedir (16).

Sitrat sentaz aktivitesi ölçüm kiti (Abcam-USA) kullanıldı. Üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde hücreler 16 saatlik inkübasyon sonucunda Tripsin/ EDTA ile santrifüj tüpüne alınıp, + 4° C ve 500g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılıp pellet iki kez PBS ile yıkandı. Yıkamaların sonucunda tüplerin içine kitte bulunan çıkarma tampon çözeltisinden 3'er ml eklenerek 20 dakika buz içinde inkübe edildi. 20 dakika sonunda, +4° C ve 16 000 g'de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda elde edilen süpernatantı temiz tüp içine alıp içerdiği protein miktarı ölçüldü. Ölçüm sonunda örnekler istenilen protein konsantrasyonuna göre tampon çözeltisi içinde seyreltilti.

Örnekler, 96 kuyulu hücre kültürü plakası kuyularına 100' er µl hacminde eklendi ve 3 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. 3 saatin sonunda kuyular yıkama tampon çözeltisi ile iki kez yıkandı. 100'er µl aktivasyon çözeltisi eklenip okunması için ELISA okuyucuda absorbansları ölçüldü. Absorbans değerleri, 412 nm'de 5. ile 30. dakikalar arasında 20' şer saniye aralıklarla kaydedildi. Sitrat sentaz enziminin en yüksek hıza ulaştığı an (Vmax), dakika olarak hesaplandı.

3.2.2.10 Hücre popülasyonunun iki katına çıkma süresi çalışması (Hücre büyüme deneyleri)

Her bir kuyuya 300.000 adet olmak üzere, 3 ml besiyeri ile 3 adet 6 kuyulu hücre kültürü plakalarına hücre ekildi. 24 Saat sonra ilk kuyular, 48 saat sonra 2. Kuyular, 72 saat sonra 3. kuyulardaki hücreler 500µl tripsin ile kaldırılarak sayıldı (Şekil 13).



Şekil 13. Hücre popülasyonu iki katına çıkma süresi deney planı.

(K (DMEM F12 + 10% FBS, 300mg/dL glukoz), KB (DMEM F12 + 10% FBS + 5 mM βOHB, 300mg/dL glukoz), KBP (DMEM F12 + 10% FBS + 5 mM βOHB+ 5 μM PPARγ Agonisti, 300mg/dL glukoz). F (EBSS + 10% FBS, 100 mg/dL glukoz), FB (EBSS+%10 FBS+5mM βOHB, 100 mg/dL glukoz) ve FBP (EBSS+%10 FBS+5mM βOHB+ 5μM pioglitazon, 100 mg/dL glukoz)).

Hücre popülasyonu iki katına çıkma süreleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (80).

Hücre popülasyonun iki katına çıkma süresi

$$= \frac{\text{süre} * \log(2)}{\log(\text{Son Konsantrasyon}) - \log(\text{İlk Konsantrasyon})}$$

3.2.2.11 MTT (hücre canlılığı çalışması)

Roche marka MTT deney kiti ile canlılık çalışması üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde yapıldı. MTT için optimizasyon çalışması: MTT (3- (4, 5-dimetiltiyazol 2- yl)- 2, 5-difeniltetrazolyum- bromür) deneyi, hücrelerin belirli koşullardaki canlılığını objektif ve sayısal olarak ortaya koymaya yarayan sitotoksosite ve canlılık deneyidir. MTT boyası canlı hücreler tarafından metabolize edilip 595nm dalga boyunda renk verirken, ölü hücrelerde renk oluşumu gözlenmez. Renk oluşum şiddeti hücre canlılığı ile doğru orantılıdır. Deneyde MTT Kiti (Katolog numarası:11465007001-Roche) kullanılmıştır. Açlık deneyi optimizasyonunda karar verilen 16 saatlik inkübasyon süresinde kullanılmak üzere MTT deneyi için gerekli hücre sayısını bulmak üzere optimizasyonlar gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.12 Veri analizleri

Optimizasyon çalışmaları dışında tüm verilerimiz yedi bağımsız deneyden ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak sunulmuştur. Sonuçlarımız, istatistiksel olarak tek yönlü ANOVA ve ardından Tukey's çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirildi. Olasılık (p) 0, 05'ten küçük olan farklar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4 BULGULAR

4.1 Grupların Belirlenmesi İçin Gerçekleştirilen Optimizasyon Çalışması

Kontrol besiyeri ile inkübe edilen hücre grubuna son konsantrasyonda 5 μ M pioglitazon olacak şekilde ilave ederek yaptığımız çalışmalarda, metabolik parametrelerde herhangi bir değişiklik saptanmadı ve çalışmalara KP ve FP grupları olmadan devam edildi (Tablo 7).

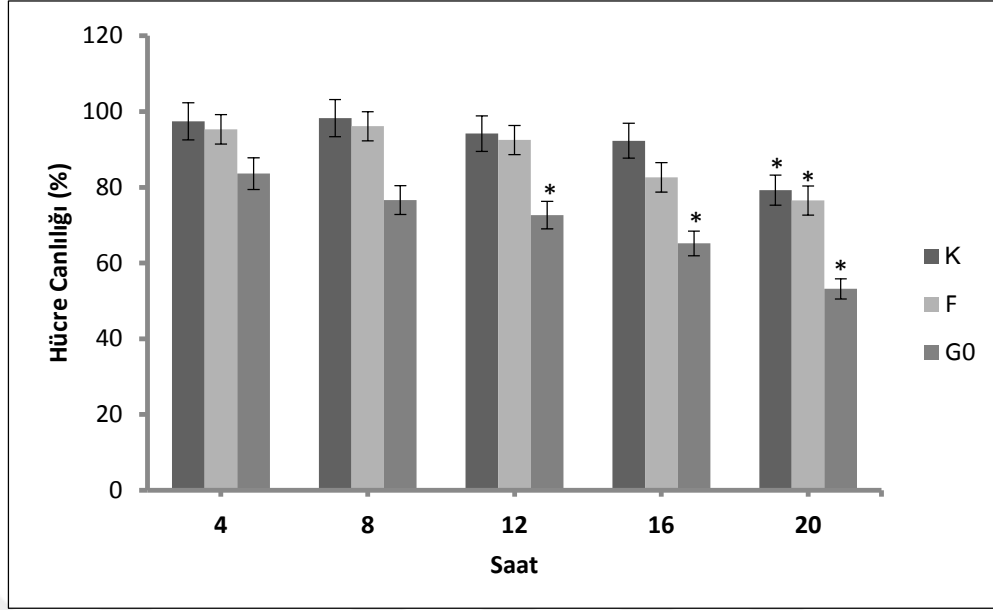
Tablo 7. Optimizasyon çalışmalarında metabolik parametrelerin karşılaştırılması.

n= 3	Laktat _i	Laktat _e	Glukoza _i	Glukoza _e	LDH _i	LDH _e	Canlılık _e
	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	U/l	U/l	%
K	14,6 $\pm$ 1,3	22,1 $\pm$ 0,92	294 $\pm$ 13	249 $\pm$ 11	18,9 $\pm$ 1,7	27,9 $\pm$ 2,6	95
KP	13,9 $\pm$ 0,94	20,7 $\pm$ 0,83	299 $\pm$ 17	256 $\pm$ 16	17,4 $\pm$ 2,8	29,4 $\pm$ 1,7	98
F	14,7 $\pm$ 1,1	36,1 $\pm$ 1,8	98 $\pm$ 13	72 $\pm$ 12	16,3 $\pm$ 0,73	32,5 $\pm$ 2,9	82
FP	14,2 $\pm$ 0,83	37,6 $\pm$ 1,3	96 $\pm$ 9	78 $\pm$ 13	18,2 $\pm$ 1,7	27,9 $\pm$ 1,6	80

(Optimizasyon çalışmaları 3 kez aynı koşullar altında tekrarlandı ve tabloya ortalama değerleri yazıldı. Deney öncesi değerler "i", deney sonrası değerler "e" ve veriler ortalama $\pm$ SD olarak ifade edildi **K**, DMEM/F12+10% FBS ile inkübe edilmiş hücreler. **KP**, DMEM/F12+10% FBS +5 μ M PPAR γ (pioglitazon) ile inkübe edilmiş hücreler. **F**, EBSS+10% FBS ile inkübe edilmiş hücreler. **FP**, EBSS+10% FBS + 5 μ M PPAR gama agonisti (pioglitazon) ile inkübe edilmiş hücreler. İnkübasyon süresi 16 saattir).

4.2 Nöron Hücrelerinde Açlık Modeli Optimizasyon Çalışması

12 kuyulu hücre kültürü plakasının tüm 4 cm² kuyularına, 6. pasaj 100.000 hücre ekildi. Yapılan hücre kültürü plakası planına göre; (N): DMEM/F12+10% FBS, (F): EBSS+10% FBS ve G (0): DMEM0+10% FBS kuyulara eklendi (Resim 2a, 2b, 2c, 2d). 4 saat/ 8 saat/12 saat /16 saat /20 saat inkübasyonlar yapıldı ve canlılık oranları hesaplandı. Deneyler üç defa aynı koşullar altında tekrar edildi (Şekil 14).

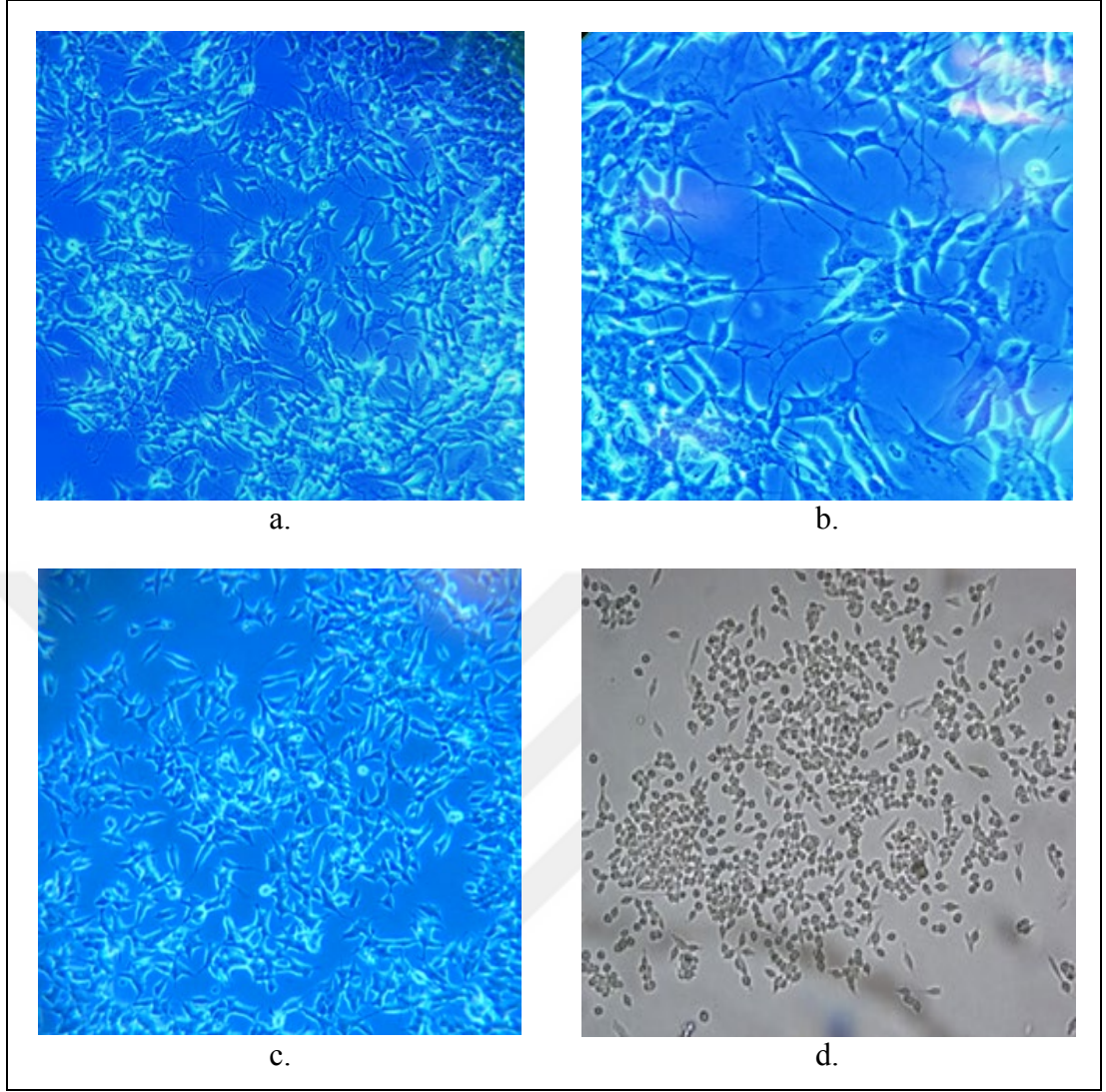


Şekil 14. Hücre canlılığı optimizasyon çalışmaları. Kontrol besiyeri ve glukozu azaltılmış besiyerleri ile inkübe edilmiş hücre modellerinde hücre canlılığı optimizasyon çalışmaları (n=3).

(**K**, DMEM/F12+10% FBS ile inkübe edilmiş hücreler (300 mg/dL glukoz). **F**, EBSS+10% FBS ile inkübe edilmiş hücreler (100 mg/dL glukoz). **G0** (DMEM0+ 10% FBS, 0 mg/dL glukoz) ile inkübe edilmiş hücreler (*p<0.01 ilk 4 saat inkübe edilmiş gruplarla karşılaştırıldıklarında)).

Optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen tüm sonuçlar karşılaştırıldığında en ideal inkübasyon süresinin 16 saat olduğuna, hücrelerin canlı kalma oranları ve 12 saatten fazla açlık modeli uygulama durumuna göre verildi.

16 saatlik inkübasyon sonrası Resim 2’de nöron hücrelerinin, açlık modeli optimizasyon çalışması resimleri görülmektedir. Kontrol hücre besiyerinde (DMEMF12+%10 FBS) büyütülmüş deney hücrelerinin hücre kültürlerindeki akson bağlantıları gösterilmektedir (SH-5Y5S insan nöroblastoma hücre hattı (Resim 2a, Resim 2b). F besiyerinde (EBSS+%10 FBS) (Resim 2c) ve G0 (DMEM0 + 10% FBS, 0 mg/dL glukoz) (Resim 2d) besiyerinde büyütülmüş deney hücrelerinin resimleri.



Resim 2. Açlık modeli optimizasyon çalışması resimleri. (Kontrol hücre besiyerinde (DMEMF12+%10 FBS) büyütülmüş deney hücreleri (SH-5Y5S insan nöroblastoma hücre hattı (Resim 2a, X10 büyütme; Resim 2b, X40 büyütme). F besiyerinde (EBSS+%10 FBS) (Resim 2c, X10 büyütme) ve G0 (DMEM0 + 10% FBS, 0 mg/dL glukoz) (Resim 2d, X10 büyütme) (Zeiss marka kameralı mikroskop ile çekilmiştir)).

F besiyerinde büyütülen nöron hücrelerinin sağlıklı ve aksonlarının kısalmış, G0 besiyerinde inkübe edilen nöron hücrelerinin ise çok daha sağlıklı iken aksonlarının ise fark edilmediği gözlemlenmektedir (Resim 2c, 2d).

4.3 Ana Deneyler Sırasında Enerji Metabolitleri

Deneylerimiz sırasında, 16 Saat inkübasyon süresince bütün hücreler glukoz kullanmıştı ama besiyerlerine keton ilave edilmiş hücreler, β OHB'ı da kullandılar. Besiyerlerine keton ilave edilmiş grubun, glukoz kullanımının azaldığı gözlemlendi. (Tablo 8). Ayrıca, besiyerlerine keton ilave edilmiş grupta laktat ve LDH değerleri de azalmıştır. Pioglitazonun, hücrelerin enerji temininde anaerobik glikoliz yerine mitokondrilerini kullanmaya teşvik ettiğini göstermektedir. Laktat dehidrogenaz enzim aktivite ölçümleri, hücre hasarının göstergelerinden biridir (81). Keton ve pioglitazon eklenmiş besiyeri ile inkübe edilen hücrelerin LDH seviyelerinin daha düşük olduğu kaydedildi (Tablo 8).

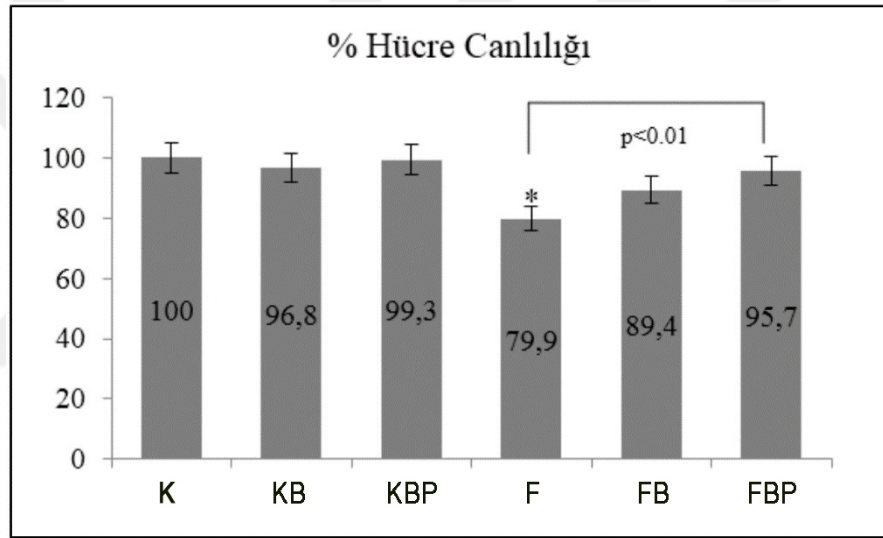
Tablo 8. Deney öncesi/sonrası besiyer gruplarının enerji metabolitleri.

	Glukoze _i	Glukoze _e	Laktat _i	Laktat _e	β OHB _i	β OHB _e	LDH _i	LDH _e
	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mmol/l	mmol/l	U/l	U/l
K	305±16	231±14†	14,3±0,9	21,6±1,6†	0	0	17±2,1	23±2,7†
KB	301±18	270±28*†	13,1±1,2	22,5±1,2†#	5,3±0,3	3,9±0,5†	16±3,6	24±2,1*†
KBP	298±12	282±11*†	12,9±1,5	19,5±1,1†	5,1±0,7	3,2±0,7†	17±4,1	20±2,6*†£
F	99±13	63±9*†	14,2±3,1	30,6±2,8*†	0	0	18±1,4	32±0,9*†
FB	102±9	77±6*†#	13,9±2,2	24,3±1,7*†#	4,8±0,8	3,1±0,9†	17±2,1	23±1,7*†#
FBP	99.1±11	79±7†#£	14,9±2,1	19,3±1,3*†#£	5,1±0,9	2,1±0,7†£	18±2,3	19±1,5*†£

(Deney öncesi değerler "i" deney sonrası değerler "e" ve veriler ortalama $\pm$ SD olarak ifade edildi (n=7). K, (Kontrol) Kontrol grup (DMEM F12 + 10% FBS-300mg/dL glukoz içeren besiyeri); KB, keton ilave edilmiş kontrol besiyeri (DMEM F12 + 10% FBS + 5 mM β OHB); KBP, PPAR γ agonisti ilave edilmiş KB besiyeri (DMEM F12 + 10% FBS + 5 mM β OHB+ 5 μ M PPAR γ agonisti). F, Glukozu azaltılmış besiyeri (EBSS + 10% FBS, 100 mg/dL glukoz içeren besiyeri); FB, keton ilave edilmiş glukozu azaltılmış besiyeri (EBSS + 10% FBS, + 5 mM β OHB); FBP (PPAR γ agonisti ilave edilmiş FB besiyeri (EBSS + 10% FBS, + 5 mM β OHB+ 5 μ M PPAR γ agonisti). * p <0.01 K ile kıyaslandığında ki değerler, # p<0.01 aynı grubun β OHB içermeyen grubu kıyaslandığında ki değerler. †p<0.01 deney öncesi başlangıç değerleri ile kıyaslandığında ki değerler (i), £ p<0.01 aynı grubun pioglitazon ile içermeyen grubu ile karşılaştığında ki değerler.)

4.4 Hücre Canlılığı (MTT) Çalışması

Hücre canlılığı MTT ile test edildi. Kontrol grubun hücre canlılığı % 100 olarak kabul edilerek diğer grupların hücre canlılığı (%) hesaplandı (Şekil 15). Kontrol besiyeri ile inkübe edilen nöronların canlılık oranlarında (KB, KBP) anlamlı bir değişiklik gözlemlenmedi. Bununla birlikte, keton ve PPAR γ agonisti ile muamele edilmiş açlık grubu hücrelerinin canlılık oranları daha yüksek kaydedildi ($p < 0,01$), (Şekil 15).



Şekil 15. Hücre canlılığı (MTT) sonuçları.

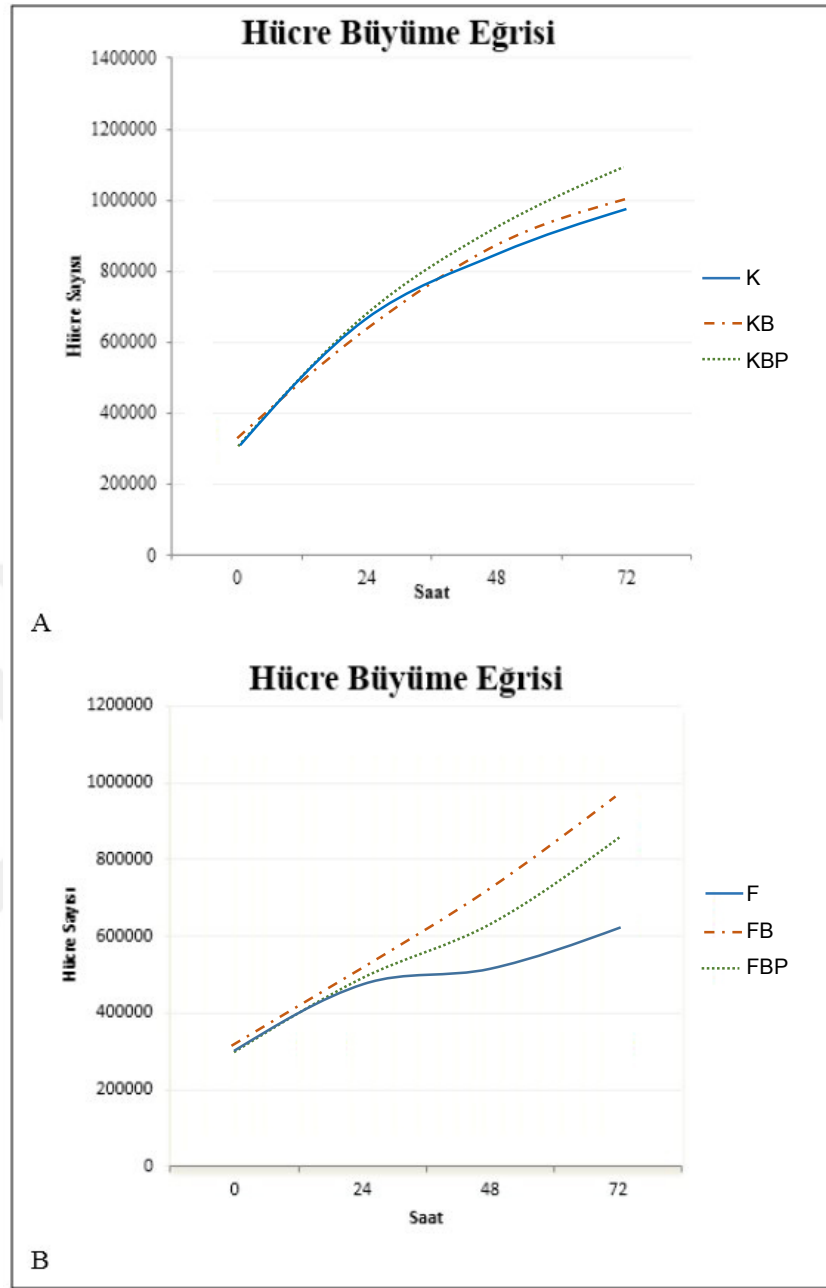
(Veriler ortalama $\pm$ SD olarak ifade edildi (n=7). K, (Kontrol) Kontrol grup (DMEM F12 + 10% FBS-300mg/dL glukoz içeren besiyeri); KB, keton ilave edilmiş kontrol besiyeri (DMEM F12 + 10% FBS + 5 mM β OHB); KBP, PPAR γ agonisti ilave edilmiş KB besiyeri (DMEM F12 + 10% FBS + 5 mM β OHB+ 5 μ M PPAR γ agonisti). F, Glukozu azaltılmış besiyeri (EBSS + 10% FBS, 100 mg/dL glukoz içeren besiyeri); FB, keton ilave edilmiş glukozu azaltılmış besiyeri (EBSS + 10% FBS, + 5 mM β OHB); FBP (PPAR γ agonisti ilave edilmiş FB besiyeri (EBSS + 10% FBS + 5 mM β OHB+ 5 μ M PPAR γ agonisti). * $p < 0,01$ K ile kıyaslandığında.)

Deneyler sırasında tüm nöron hücre grupları glukoz kullanmışlardı fakat glukoz kullanımı PPAR gamma agonisti eklenen grupta azalmıştı. Besiyerlerine PPAR gama agonisti eklenmiş hücrelerin canlılık oranları diğer EBSS besiyerlerinde inkübe edilmiş hücrelere nazaran daha fazlaydı. Ayrıca; yine besiyerlerine PPAR gama

agonisti eklenmiş hücrelerde laktat oluşumu, diğer besiyerleriyle inkübe edilmiş hücrelere göre azalmıştı. Tablo 8 incelendiğinde, özellikle PPAR gama agonisti ve keton eklenmiş hücrelerde hücre hasarı azalmış olarak tespit edildi.

4.5 Hücre Populasyonu İki Katına Çıkma Süreleri (Hücre Proliferasyonu)

Kalori kısıtlaması/uzamış açlık uygulanan hücre grubunda glukoz yoksunluğu sebebi ile uzayan iki katına çıkma sürelerinin KBP grubunda kısaldığı gözlemlendi (Şekil 16a, 16b). Bu sonuçlar, pioglitazonun ketonla birlikte hücre kaybını önlediği gibi hücrelerin daha kısa sürede çoğalmalarını desteklediğini düşündürmüştür.

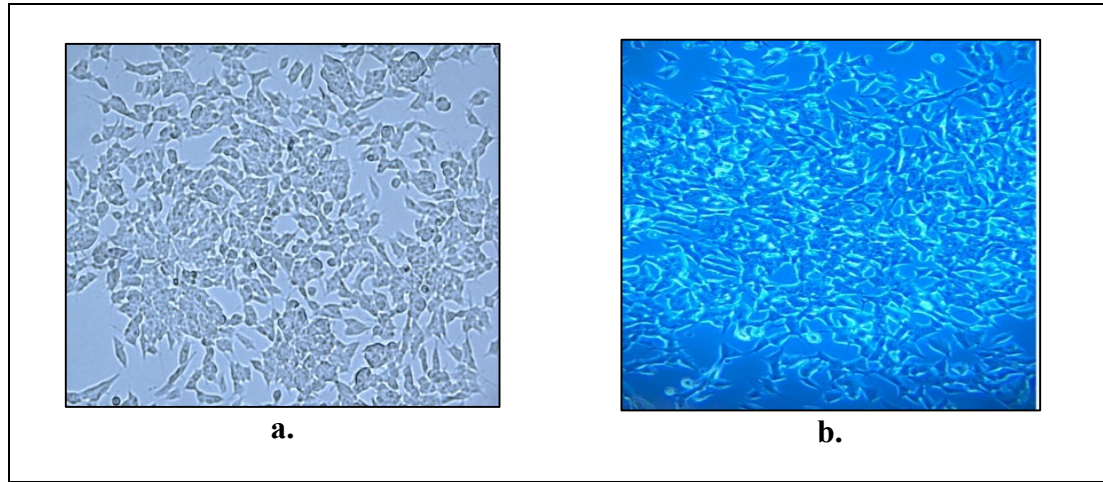


Şekil 16. Hücre büyüme eğrileri. Hücre popülasyonu iki katına çıkma süresi çalışması sonuçları.

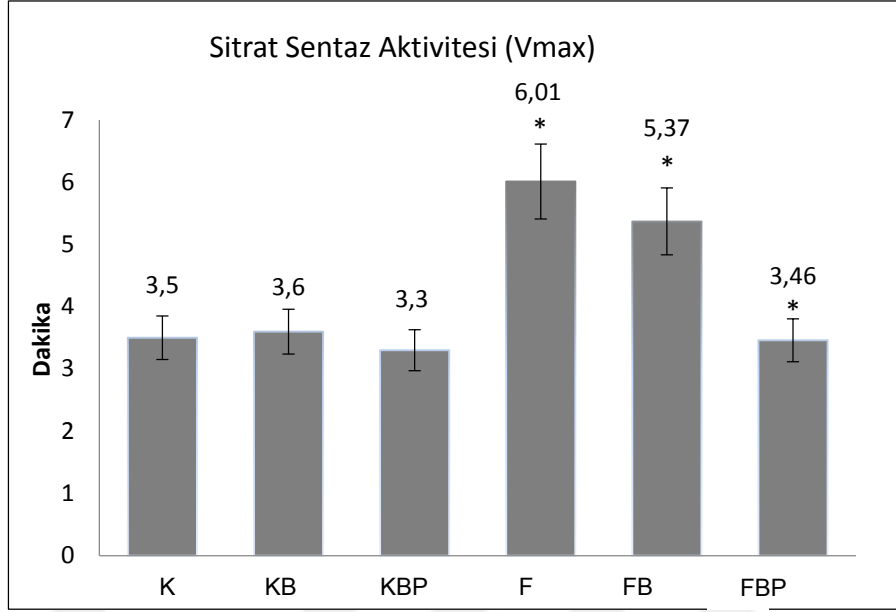
(Veriler ortalama $\pm$ SD olarak ifade edildi (n= 3). K, (Kontrol) Kontrol grup (DMEM F12 + 10% FBS- 300mg/dL glukoz içeren besiyeri); KB, keton ilave edilmiş kontrol besiyeri (DMEM F12 + 10% FBS + 5 mM β OHB); KBP, PPAR γ Agonisti ilave edilmiş KB besiyeri (DMEM F12 + 10% FBS + 5 mM β OHB+ 5 μ M PPAR γ Agonisti). F, Glukozu azaltılmış besiyeri (EBSS + 10% FBS, 100 mg/dL glukoz içeren besiyeri); FB, keton ilave edilmiş glukozu azaltılmış besiyeri (EBSS + 10% FBS, + 5 mM β OHB); FBP (PPAR γ Agonisti ilave edilmiş FB besiyeri (EBSS + 10% FBS, + 5 mM β OHB+ 5 μ M PPAR γ Agonisti). p <0.01 K ile kıyaslandığında ki değerler.)

4.6 Sitrat Sentaz Aktivite Sonuçları

Deneylerimizde 16 saatlik inkübasyon sonrası hücrelerde, bir mitokondri enzimi olan sitrat sentaz aktivitesi ölçümü gerçekleştirilmiştir. Aktivite grafiklerinden, enzimin en yüksek hıza (V_{max}) ulaştığındaki zaman dakika olarak hesaplanmış ve grafik halinde verilmiştir (Şekil 17). Kontrol besiyeri ile inkübe edilen hücreler V_{max} değerine en kısa sürede ulaşmıştır. Ortamda glukoz azaldıkça enzimin daha yavaş çalıştığı gözlemlenmiştir (Şekil 17). Kontrol besiyeri ile inkübe edilmiş nöron hücre grubunda sitrat sentaz aktivitesi önemli ölçüde değişmiyor gibi görünse, KBP besiyeri ile inkübe edilmiş nöron hücre grubunun ortalama hızı azda olsa artış göstermektedir. FB ve FBP besiyeri ile inkübe edilmiş nöron hücre grubunun sitrat sentaz aktivite hızının istatistiksel olarak arttığı kaydedilmiştir (Şekil 17). Ayrıca, FBP nöron hücre grubunun, aksonlarının FB nöron hücre grubunun göre daha uzun ve akson bağlantılarının ise daha sıkı olduğu gözlemlenmiştir. Bu da glukoz yoksunluğunda hücrelerin ketonu daha etkin bir şekilde kullandığını ve PPAR γ 'nın mitokondriyal enerji yollarını onarabileceğini öngörmekteyiz.



Resim 3. FB ve FBP besiyerinde büyütülmüş hücre resimleri. (FB (EBSS+%10 FBS+5mM β OHB) (Resim 3a, X10 büyütme) ve FBP (EBSS+%10 FBS+5mM β OHB +5 μ M PPAR gama agonisti) (Resim 3b, x10 büyütme) ile inkübe edilmiş hücreler (Zeiss marka kameralı mikroskop ile çekilmiştir)).



Şekil 17. Sitrat sentaz aktivitesi bulguları. Deneylerimizde 16 saatlik inkübasyon sonrası nöron hücrelerinde sitrat sentaz aktivitesi ölçülmüştür. Aktivite grafiklerinden, enzimin en yüksek hıza (Vmax) ulaştığındaki zaman dakika olarak hesaplanmış ve grafik halinde verilmiştir (* $P < 0,01$ K ile kıyaslandığında). Veriler ortalama $\pm$ SD olarak ifade edildi ($n=7$). K, (Kontrol) Kontrol grup (DMEM F12 + 10% FBS- 300mg/dL glukoz içeren besiyeri); KB, keton ilave edilmiş kontrol besiyeri (DMEM F12 + 10% FBS + 5 mM β OHB); KBP, PPAR γ agonisti ilave edilmiş KB besiyeri (DMEM F12 + 10% FBS + 5 mM β OHB+ 5 μ M PPAR γ agonisti). F, Glukozu azaltılmış besiyeri (EBSS + 10% FBS, 100 mg/dL glukoz içeren besiyeri); FB, keton ilave edilmiş glukozu azaltılmış besiyeri (EBSS + 10% FBS, + 5 mM β OHB); FBP (PPAR γ agonisti ilave edilmiş FB besiyeri (EBSS + 10% FBS, + 5 mM β OHB+ 5 μ M PPAR γ agonisti)).

5 TARTIŞMA

Keton cisimleri ve DM tedavisinde kullanılan PPAR gama agonistlerinin nöronlar üzerindeki olumlu etkilerinden yola çıkılarak yapılan çalışmamızda, PPAR gama agonistinin nöron hücre metabolizması ve mitokondriyal fonksiyonları üzerine etkileri incelendi. Amacımız, bir PPAR gama agonisti olan pioglitazonun keton cisimleri varlığında nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için etkili bir alternatif olup/olmadığı yönünden araştırılmasıdır.

Keton cisimlerinin varlığı ve metabolizması beyin için oldukça önemlidir. Vücutta fizyolojik olarak keton cisimleri, uzun süreli açlık veya ketojenik diyetler sonucu ortaya çıkmaktadır. Ketoliz, uzun süreli açlık sırasında enerji kaynağının %70'ini oluşturur (çoğunluğu β OHB'dan) (10). Son zamanlarda, keton cisimlerinin açlık metabolizmasındaki rollerinin yanı sıra, doğrudan sinyal molekülü olarak fonksiyon gösterdiği de düşünülmektedir (1). Keton cisimlerinin, histon Deasetilazların (HDAC) aktivitesini modüle ederek hücrel sinyalizasyonu regüle ettiği düşünülmektedir (10, 14). Ayrıca, β OHB'nin sitokin fırtınasını azaltarak, anti-enflamatuvar etki gösterdiği dolayısı ile nöron kaybı ve doku hasarının azalmasına neden olduğu düşünülmektedir (10). Yukarıda bahsi geçen tüm bu bilgiler ve sonuçlarımız ışığında; PPAR γ agonisti pioglitazon ile ketonların, nöron korunmasında sinerjik olarak hareket edebileceği öngörülmüştür.

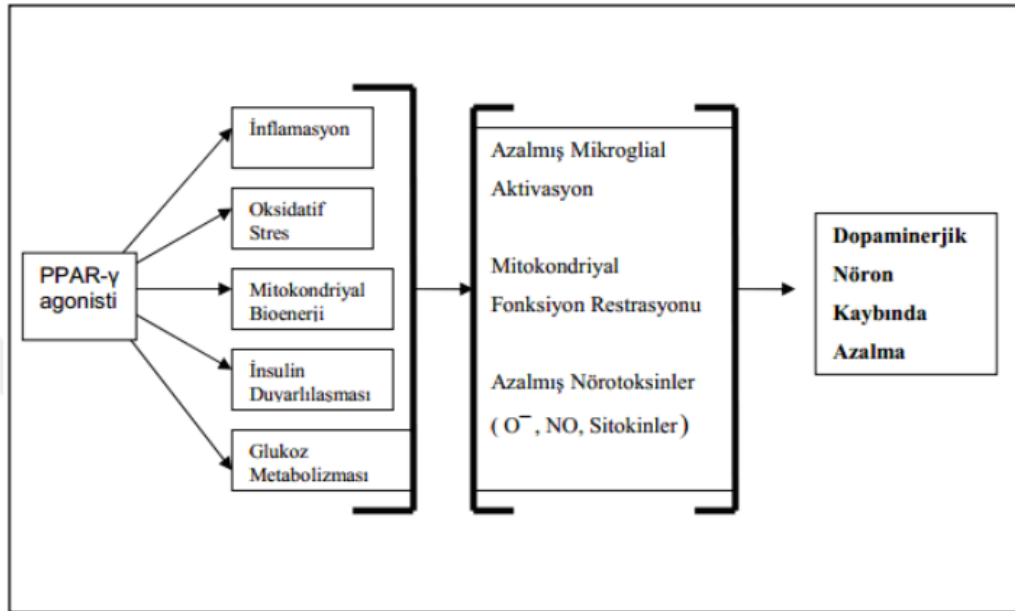
Çalışmamızda; glukozdan yoksun, keton eklenmiş nöron hücre kültürlerinde (uzamış açlık modeli), PPAR γ agonistinin (pioglitazon) etkilerini incelemek amacı ile enerji metabolitleri, nöron canlılık oranları ve mitokondriyal fonksiyonlar, nörodejeneratif hastalıklarda alternatif tedavi seçeneklerini değerlendirmek, amacıyla araştırılmıştır. SH-SY5Y (human nöroblastom-ATCC/CRL 2266) hücre kültürü çalışmaları yapıldı. SH-SY5Y, nöronal fonksiyon ve farklılaşmanın in vitro modellerinde kullanılan insan kaynaklı bir hücre hattıdır. %80 Oranında konfluent olmuş nöron hücre kültürlerine, ortamın glukoz yoğunlukları değiştirilerek kontrol ve

açlık beslenme modelleri uygulanmıştır (34). Deneyler; ortama ayrı ayrı ve birlikte keton ve pioglitazon ilave edilerek yapılmıştır. Pioglitazon liyofilize idi çözünme aşamasında çözünmedi, literatür taraması yapıldı. Daha sonra pioglitazon (Sigma Aldrich, E6910) temin edilerek 3.2.1.5'te bahsi geçen PPAR gamma agonisti içeren solüsyonun/besiyerinin hazırlanışı protokolü uygulandı. Kontrol grubunun sonuçları ile glukoz yoksunluğu uygulanan nöron grubu hücrelerin glukoz, keton, laktat, laktat dehidrogenaz değerleri karşılaştırma amacı ile kaydedildi. Ayrıca; canlılık oranları, hücre popülasyonu iki katına çıkma süreleri, sitrat sentaz enzimi aktiviteleri de kaydedilip karşılaştırıldı.

Daha önceki çalışmalarda, anti-epileptik ilaçlara dirençli epilepsi hastalarında ketojenik diyetin etkinliği kanıtlanmıştır (1, 17). Ketojenik diyet uygulandığında keton cisimleri sentezlenir. Ketogenez, alternatif enerji kaynağı olarak keton cisimlerinin üretildiği bir metabolik yolaktır ve hücre metabolizması üzerine pozitif katkıları vardır (15). Yapılan literatür araştırmasında, ketojenik diyet bileşenlerinden dekanolik asidin nöron hücrelerinde mitokondriyal sitrat sentaz enziminin ve kompleks I aktivitesinin artmasına neden olduğu görülmüştür (16). Ayrıca, ketonların nöron ve periferik hücrelerde lipid ve enerji metabolizmasını düzenleyen, tip II nükleer transkripsiyon faktörü PPAR'ın, aktivasyonuna neden olduğu da düşünülmektedir (17). Pioglitazon, lipofilik yapısından dolayı kolaylıkla hücre çekirdeğine nüfuz etmekte (62) ve burada PPAR γ ' ya bağlanıp, aktivasyonunu sağlayarak agonist özelliği göstermektedir (62). PPAR'lar; mitokondriyal biyogenez, enflamasyon, antioksidan savunması ve karbonhidrat-lipid metabolizmaları ile ilgili yolların regülasyonunda oldukça kritik öneme sahiptirler (18).

Pioglitazonun, oksidan- anti oksidan dengesini pozitif yönde etkileyerek oksidatif stresi ve enflamasyonu önlediği belirtilmiştir (22, 45, 82, 83) (Şekil 18). PPAR γ , adipogenez ve insülin hassasiyetinde önemli rol oynamaktadır. PPAR γ aktivasyonu, farklılaşmış adiposit ve azalmış plazma glukoz konsantrasyonu ile birlikte artmış lipid-karbonhidrat metabolizması ile de ilişkilidir (84). PPAR γ 'nın bloke edilmesinin embriyonik olarak ölümcül olduğu gösterilmiştir (54, 85). Pioglitazonun, PPAR gama

aktivasyonu artırarak ve beyin hücrelerinde miyelin gen ekspresyonunu regüle ederek de anti enflamatuvar etki gösterdiği kanıtlanmıştır (86). Pioglitazonun; p-Drp1(Ser616) ekspresyonunu baskıladığı, oksidatif stresi azalttığı, bunlarla birlikte apoptotik sürecin azaldığından bahsedilmektedir. Böylece hipokampal CA1 alt bölgesindeki TGI / reperfüzyon nöronal hasarın tersine döndüğüne işaret edilmektedir (87). Yüksek dozda alkol verilen sıçanlarla yapılan bir çalışmada, pioglitazonun nörodejenerasyonu azalttığına işaret edilmektedir. Proenflamatuvar sitokinlerin alkol tarafından baskılanmasının önüne geçtiği, hafızayı güçlendirdiği, öğrenme ve uzaysal öğrenme becerilerindeki kayıpları önlediği gösterilmiştir (88).



Şekil 18. PPAR-γ agonistinin nörodejenerasyonda ki etki mekanizmaları (22, 89). PPAR-γ'nın çeşitli yollara etki etmek sureti ile dopaminerjik nöron kaybında azalmalar sağlaması.

Beynin değişik kısımlarında, PPARγ'nın anlatımının yapıldığı bilinmektedir. Bazal gangliyonlardaki dopaminerjik hücreler dahil olmak üzere merkezi sinir sisteminin farklı alanlarında yüksek düzeyde PPARγ ekspresyonu gözlemlenmiştir (90, 91). Ayrıca, pioglitazon tedavisi ile kan-beyin bariyerinin gelişmesine destek olan

astrositlerin arttığından da bahsedilmektedir (92). Nörodejeneratif fare modelleri ile yapılan bir çalışmada; pioglitazon uygulaması ile mikrogliyozis, astrogliyozis ve nöronal kayıpta ciddi anlamda düşüşler olduğuna işaret edilmektedir (93). PPAR γ agonistlerinin enflamasyon sonucu meydana gelebilecek nörolojik dejenerasyonu önleyebileceğinden bahsedilmektedir (22, 94). PPAR γ ve pioglitazon'un nörodejeneratif enflamasyon üzerinde ki etkileri hakkındaki tüm bu bilgiler ve çalışmamızdaki bulgular, pioglitazonun nörodejeneratif hastalıkların üzerinde de etkili olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızla uyumlu olarak, pioglitazon ile regüle edilen PPAR- gama aktivitesi sonucunda, alzheimer hastalarının merkezi sinir sisteminde görülen amiloid β peptitlerde azalma olduğu tespit edilmiştir (95). Wang ve arkadaşları tarafından pioglitazon ve diyabetik fare modelleri ile bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada, kan beyin bariyerinde ve hipokampüste amiloid plak birikimi azaldığından hafızanın iyileştiğinden bahsedilmektedir (14, 23, 96). Alzheimer hastalığı modeli farelerle yapılan çalışmada; pioglitazonun kortikal nöroenflamasyona, nörometabolizmaya ve nörovasküler sisteme etki ettiği anlatılmaktadır. Bu etkiyi, NO yolları aracılığı yaparak nöronal aktiviteyi arttırdığı düşünülmektedir. Böylece, hastalığın birçok aşamasında patolojinin iyileştiği ve yaşa bağlı öğrenme kayıplarında öğrenmenin geri kazanıldığından bahsedilmektedir (97). Bir başka nörodejeneratif hastalık olan Parkinson ile yapılan çalışmalarda ise PPAR gama agonistlerinin parkinson hastalığının neden olduğu tipik hareketlerde ve davranışsal parametrelerde düzelmeler, ayrıca dopamin sentezinde artışa neden olduğu gösterilmiştir (98, 99).

Status Epileptikus (SE) modeli oluşturulan sıçanlarda rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi (mTOR) yolağının PPAR γ agonisti ile inhibe ederek anti enflamatuvar etki gösterdiğine işaret edilmektedir (100). Özellikle bu çalışma, uzun süreli açlık sırasında inhibe edildiği bilinen mTOR yolağının, PPAR γ agonisti ile de inhibe edildiğini göstermesi açısından önem kazanmaktadır.

Çalışmamızda, 16 Saat ilgili besiyerlerinde inkübe edilmiş hücre gruplarına canlılık oranlarını kıyaslamak amacı ile MTT testi uygulanmıştır. Pioglitazonla

birlikte keton uygulanan hücrelerin canlılık oranlarının daha yüksek olduğu ölçüldü (Şekil 15). Bu bulgular, bize açlık ile bozulan hücre canlılığını korumada pioglitazonun ketonla birlikte yardımcı olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca, hücre popülasyonun; 24. , 48. ve 72. saatlerde iki katına çıkma süreleri hesaplandığında da uzamış açlık uygulanan hücrelerin, iki katına çıkma sürelerinin pioglitazonla birlikte keton uygulaması ile kısaldığı gözlemlendi (Şekil 16a, 16b). Bu sonuçlar, pioglitazonun ketonla birlikte hücre kaybını önlediği gibi hücrelerin daha kısa sürede çoğalmalarını sağladığı şeklinde yorumlanmıştır. Bu bulgular, Zhu ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptıkları çalışmada, pioglitazonu, nöronların hayatta kalmasını ve apoptotik hücre ölümlerinden korunmasını önemli ölçüde indüklediği bilgisi ile uyumludur (101).

İlgili besiyerlerinde inkübe edilen hücre gruplarının, inkübasyon öncesi ve sonrası fotoğrafları çekildi (Resim 3a, 3b). Pioglitazon ve keton uygulanmış hücrelerle, kalori kısıtlaması/uzamış açlık uygulanan hücrelerin fotoğrafları karşılaştırıldı. Pioglitazon uygulanmış hücrelerin daha konfluent-sağlıklı olduğu, aksonlarının daha uzun olduğu ve akson bağlantılarının daha sıkı olduğu gözlemlendi. Bu görüntüler bize pioglitazonla birlikte keton uygulanan hücreler arası iletişimin daha iyi olabileceğini düşündürmüştür.

İlgili besiyerlerinde inkübe edilen hücre gruplarının, 16 saat inkübasyon öncesi/sonrası glukoz, keton, laktat, laktat dehidrogenaz ölçümleri yapıldı (Tablo 8). Hücrelerin besiyerine keton ilavesi ile metabolik parametrelerinin ve canlılık oranlarının tümünde anlamlı olarak pozitif yönde değişiklik gözlemlendi (Tablo 8, Şekil 15). Açlık gruplarında keton içeren ortama pioglitazon (FBP) eklendiğinde; laktat, LDH seviyeleri (hücre hasarı göstergesi) F ve FB gruplarına göre anlamlı derecede düşüktü ve nöronlar PPAR γ agonisti varlığında ketonları daha verimli kullandığı tespit edilmiştir (Tablo 8). Bu bulgular; nöronların besiyerine pioglitazon eklendiğinde, mitokondrilerini daha verimli kullanmış olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, pioglitazonla birlikte keton uygulanan hücrelerin daha az

glukoz kullandıkları gözlemlendi. Bu bulgular, pioglitazonla birlikte keton uygulamasının nöron hasarının önlenmesinde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

K, KB, KBP, F, FB, FBP nöron hücre gruplarının, mitokondriyal fonksiyonlarını karşılaştırmak amacı ile mitokondri sayısının ve aktivitesinin dolaylı olarak göstergesi olan sitrat sentaz testi uygulandı. Sitrat sentaz, krebs döngüsünün sadece mitokondriyal matriksinde yer alan ilk enzimidir. Bir hücre homojenatındaki sitrat sentazın aktivite ölçümleri, hücresel topluluğun mitokondriyal kapasitesini gösterdiği kabul edilir (16). Bulgularımız, pioglitazon varlığında nöronların mitokondrilerini daha etkin bir şekilde kullandığını öngörmemizi sağlamıştır. (Şekil 17). Artan kanıtlar, birçok önemli nörodejeneratif ve nöroenflamatuvar bozukluğun patogeneğinde mitokondriyal disfonksiyonun rol oynadığını göstermektedir. Bahsi geçen işlev bozukluğu; mitofajidaki, mitokondriyal işlevlerdeki, elektron taşıma zinciri aktivitesindeki azalmalar ve artan mitokondriyal kaynaklı oksidatif stres gibi kusurlarla ilişkilidir (14). Bu nedenle; mitokondriyal işlevi, antioksidan savunmayı artırmak ya da reaktif oksijen türlerini (ROS) azaltmak için geliştirilecek farmakolojik yaklaşımlar bu hastalıkların tedavisi için oldukça önemlidir. Bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar, glukoz açısından kısıtlanan hücrelerin azalan mitokondriyal aktivitelerinin pioglitazonla birlikte keton uygulaması ile her iki açıdan da iyileştiği yönünde açıklanabilmektedir (Şekil 17). Sonuçlarımız, Ding ve arkadaşlarının 2015 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada, pioglitazonun mitokondriyal defektleri ve mitokondriyal ağı onardığını vurgulayan çalışma ile uyumludur (102).

PPAR γ agonistinin nöron canlılığı, enerji metabolizması, mitokondriyal fonksiyonlar üzerindeki olumlu etkileri ve bu etkilerin ortamdaki keton varlığıyla daha da arttığı gösterilmiştir. Çalışmamızla uyumlu olarak Miglio ve arkadaşları, PPAR γ agonistlerinin glukozdan yoksun nöronlarda mitokondri biyogeneğini arttırdığını göstermişlerdir (103).

Tez çalışmamız, nöronlar üzerinde pioglitazonun ketonlarla sinerjik olarak olumlu etkilerini gösteren ilk çalışmadır. Yukarıda belirtilen tüm bu bilgiler ve sonuçlarımız ışığında, PPAR γ agonistlerinin ve ketonların nöron korumasında sinerjik olarak hareket edebileceğini söyleyebiliriz. Nöronal hücrelerin uzun süreli açlık kısıtlaması uygulaması sonucu bozulan metabolik parametrelerinde, mitokondriyal fonksiyonlarında, hücre proliferasyonunda ve canlılık oranlarında pioglitazonla birlikte keton tatbiki sonucu iyileşmeler kaydedilmiştir.

Bulgularımız literatürle paralellik göstermiştir. Uzamış açlıkta, PPAR γ agonistlerinin terapötik ajanlar olarak umut vaat ettiğinden bahsedebiliriz. Bu bilgiler ışığında, pioglitazonun yeniden konumlandırılması ile nörodejeneratif hastalıkların tedavisine ketonla birlikte yeni bir umut olabileceği yönündedir.

6 SONUÇ

Yaptığımız çalışma; daha önce yapılan çalışmalarla örtüşmüş ve farklı noktalara açıklık kazandırmıştır. Uzun süreli açlık modeli uygulanan hücrelere PPAR gama agonisti eklendiğinde nöron hasarlarında iyileşmeler gözlenmiştir. PPAR gama uygulanan nöron hücrelerinde mitokondriyal sitrat sentaz aktivitesindeki değişiklikler, laktat miktarında azalma ve LDH düzeylerindeki değişim literatürde daha önce gösterilmemiştir. Bu yönüyle çalışmamız literatüre katkı sağlamaktadır.

Çalışmamız Sonucunda Gelecekte Yapılması Öngörülen Çalışmalar:

Pioglitazonun nörodejeneratif hastalıkların tedavisindeki rolü ve ketonlarla entegrasyonu; 1) fonksiyonel çalışmalar, 2) genetik haritalama ve harita analizleri, 3) DM ve epilepsi hayvan modeli deneyleri, 4) mTOR, enflamasyon, glukoneogenez ve keton yolları bloke edilerek yapılacak yeni deneyler, 5) Beta hidroksi butirat ve pioglitazonun birlikte yer aldığı farmakolojik yaklaşımlar ile yapılacak klinik çalışmalar ile sonuçlarımızın konfirme edilmesi değerli olacaktır.

7 KAYNAKLAR

1. McNally MA, Hartman AL. Ketone bodies in epilepsy. *J Neurochem*. April 2012; 121(1): 28–35. doi:10.1111/j.1471-4159.2012.07670.
2. Balasubramanian P, Howell PR, Anderson RM. Aging and caloric restriction research: A biological perspective with translational potential. *EBioMedicine*. 2017; 21 (2017) 37–44.
3. Kızıltan G. Günlük Tüketilmesi Gereken Besin Miktarları ve Beslenme Rehberleri. (Ed. Merdol Kutluay T.). *Temel Beslenme ve Diyetetik. Bölüm 4, Güneş Tıp Kitabevi*, 2015, Ankara, 87-107.
4. Rakıcıoğlu N. Yaşlılık Döneminde Sağlıklı Beslenme, s. 105-113. http://ekutuphane.teb.org.tr/pdf/tebakademi/geriatri_2009/20.pdf. Erişim Tarihi:08.12.2018.
5. Wegman MP, Guo MH, Bennion DM, Shankar MN, Chrzanowski SM, Goldberg LA, Xu J, Williams TA, Lu X, Hsu SI, Anton SD, Leeuwenburgh C, Brantly ML. Practicality of intermittent fasting in humans and its effect on oxidative stress and genes related to aging and metabolism. *Rejuvenation Research*. 2018; Volume 18, Number 2, 2015 Mary Ann Liebert, Inc. DOI: 10.1089/rej.2014.1624.
6. Brandhorst S, Choi IY, Cheng CW, Sedrakyan S, Navarrete G, et al. A periodic diet that mimics fasting promotes multi-system regeneration, enhanced cognitive performance, and healthspan. *Cell Metabolism*. June 18, 2015; University of Southern California.
7. Aksungar FB, Topkaya AE, Akyildiz M. Interleukin-6, C-Reactive Protein and Biochemical Parameters during Prolonged Intermittent Fasting. *Ann Nutr Metab*. 2007; 51:88–95. DOI: 10.1159/000100954.
8. Türk NE. Ketojenik diyet kullanan hastalarda tedavi etkinliğinin değerlendirilmesi. *Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi*, Ankara, 2018 (Danışman: Doç. Dr. Mehmet Gündüz).
9. Altın Z. Açlığın fizyolojisi. *Tepecik Eğit. ve Araşt. Hast. Dergisi*. 2017; 27(3):179-185 doi:10.5222/terh.2017.179.
10. Garabacka M, Pierzchalska M, Dean M, Reiss K. Regulation of ketone body metabolism and the role of PPAR α . *Int. J. Mol. Sci*. 2016; 17, 2093; doi:10.3390/ijms17122093.
11. Bough KJ, Rho JM. Anticonvulsant mechanisms of the ketogenic diet. *Epilepsia*. 2007 Jan; 48(1):43–58.
12. Maiorana A, Manganozzi L, Barbetti F, Bernabei S, Gallo G, Cusmai R, Caviglia S, Dionisi-Vici C. Ketogenic diet in a patient with congenital hyperinsulinism: a novel approach to prevent brain damage. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2015; 10:120.
13. Ilgaz F, Günbey C, Ardıçlı D, Yalınzoğlu D, Topçu M. Dirençli epilepside düşük glisemik indeksli diyet tedavisi: olgu sunumu. *Bes Diy Der (Internet)*. 23 Ağustos 2019 (a.yer 20 Nisan 2020);47(2):108-13.

14. Corona JC, Duchen MR. PPAR γ as a therapeutic target to rescue mitochondrial function in neurological disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 2016; 100 (2016) 153–163.
15. Sikder K, Shukla SK, Patel N, Singh H, Rafiq K. High fat diet upregulates fatty acid oxidation and ketogenesis via intervention of PPAR- γ . *Cell Physiol Biochem*. 2018; 48(3): 1317–1331. doi:10.1159/000492091.
16. Hughes SD, Kanabus M, Anderson G, Hargreaves IP, Rutherford T, et al. The ketogenic diet component deconic acid increases mitochondrial citrate synthase and complex I activity in neuronal cells. *International Society for Neurochemistry; J. Neurochem*. 2014; 129, 426-433, 2014.
17. Simeone TA, Stephanie A, Matthews MS, Kaeli K, Samson MS, Simeone KA. Regulation of brain PPAR gamma2 contributes to ketogenic diet anti-seizure efficacy. *Experimental Neurology*. 2016; doi: 10.1026/J.expneurol.2016.08.006.
18. Corona JC, Souza SC, Duchen MR. PPAR γ activation rescues mitochondrial function from inhibition of complex I and loss of PINK. *Experimental Neurology*. 2014; 253 (2014) 16–27.
19. Tashiro K, Kawabata K, Sakurai H, Kurachi S, Sakurai F, et al. Efficient adenovirus vector-mediated PPAR gamma gene transfer into mouse embryoid bodies promotes adipocyte differentiation. *J Gene Med*. 2008;10(5):498-507.
20. Ahmadian M, Suh JM, Hah N, Liddle C, Atkins AR, Downes M, Evans RM. PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nature Medicine*. 2013; volume 19, pages 557–566.
21. Wang W, Zhou X, Kwong JSW, Li L, Li Y, Sun X. Efficacy and safety of thiazolidinediones in diabetes patients with renal impairment: a systematic review and metaanalysis. *Scientific Reports*. 2017; | 7: 1717 | DOI:10.1038/s41598-017-01965-0.
22. Seyrek O. Tiazolidindion grubu pioglitazonun NB2A hücre kültürü üzerindeki etkilerinin araştırılması. Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Manisa, 2018 (Danışman: Doç. Dr. Kamil Vural).
23. Tyagi S, Gupta P, Saini AS, Kaushal C, Sharma S. The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *J Adv Pharm Technol Res*. 2011; 2(4):236-240. doi:10.4103/2231-4040.90879.
24. Zeissler ML, Eastwood J, McCorry K, Hanemann CO, Zajicek JP, Carroll CB. Delta-9-tetrahydrocannabinol protects against MPP+ toxicity in SH-SY5Y cells by restoring proteins involved in mitochondrial biogenesis. *Oncotarget*. 27 June 2016; vol. 7, no. 29.
25. Hartman AL. Neuroprotection in metabolism-based therapy. *Epilepsy Res*. 2012 July; 100(3): 286–294. doi:10.1016/j.epilepsyres.2011.04.016.
26. Emlik H. Yüksek yağlı ve yüksek karbonhidratlı diyet ile beslenen ratlarda aralıklı diyetin deneysel akut kolit modelinde inflamasyon markörlerinin seviyeleri üzerine etkileri. Y.Y.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Van, 2017 (Danışman: Prof. Dr. Fahri Bayıroğlu, Yrd Doç. Dr. Leyla Mis).

27. Aksungar FB, Sarıkaya M, Coskun A, Serteser M, Unsal I. Comparison of intermittent fasting versus caloric restriction in obese subjects: A two year follow-up. *The Journal of Nutrition Health and Aging*. August 2016; 21(6) DOI: [10.1007/s12603-016-0786-y](https://doi.org/10.1007/s12603-016-0786-y).
28. Mehta, Minal B. Elucidating the role of hepatic ppp1r3b in glucose and lipid metabolism . Publicly Accessible Penn Dissertations. 2017; 2469. <https://repository.upenn.edu/edissertations/2469>.
29. Baynes, John W, Dominiczak MH. *Medical Biochemistry*. 4th ed. Elsevier Limited; 2014.
30. Devlin K. *Journal of social philosophy*. Volume28, Issue2 September 1997 Pages 87-100.
31. Wilder RM, Winter MD. The threshold of ketogenesis. Presented before the American society for clinical investigation at Washington, D. C. , May, 1922.
32. Wheless JW. History of the ketogenic diet. *Epilepsia*. Nov 2008; 49 Suppl 8: 3– 5.
33. Çetin B. Epilepsi hastası çocuklarda ketojenik diyetin epileptik nöbet sayısı üzerine etkisinin araştırılması. H.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2013 (Danışman: Prof. Dr. Gülden Köksal).
34. Wu RC, Smith CL, O'Malley BW. Transcriptional regulation by steroid receptor coactivator phosphorylation. *Endocr Rev*. 2005; 26: 393- 399.
35. Friedmann PS, Cooper HL, Healy E. Peroxisome proliferator-activated receptors and their relevance to dermatology. *Acta Derm Venereol*. 2005; 85: 194- 202.
36. Tural E. Dayanıklılık sporcularının performansına PPAR- α ve PPARGC1A gen polimorfizmlerinin etkisi. On Dokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Beden Eğitimi ve Spor Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Samsun, 2013 (Danışman: Prof. Dr. Seydi Ahmet Ağaoğlu, Doç. Dr. Nurten Kara).
37. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome Proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev*. 1999; 20 (5): 649- 688.
38. Van Raalte DH, Li M, Pritchard PH et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR- α): a pharmacological target with a promising future. *Pharm Res*. 2004; 21(9) : 1531- 8.
39. Sher T, Yi HF, McBride OW, Gonzalez FJ. cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human Peroxisomal Proliferator-Activated Receptor. *Biochemistry*. 1993; 32(21) : 5598- 604.
40. Steineger HH, Sorensen HN, Tugwood J, et al. Dexamethasone and insulin demonstrate marked and opposite regulation of steady-state mRNA level of the peroxisomal proliferator-activated receptor (PPAR) in hepatic cells. *Eur J Biochem*. 1994; 225: 967- 74.
41. Aydoğan HY, Kurt Ö, Kurnaz Ö, Teker BA, Küçük Hüseyin Ö. Koroner kalp hastalığında peroksizom proliferatör-aktif reseptör (PPAR) izoformları. *Türk Biyokimya Dergisi (Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem)*. 2013; 38 (4) ; 372– 384 doi: 10.5505/tjb.2013.08760.

42. Grygiel- Górniak B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications – a review. *Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications – a review. Nutrition Journal.* 2014; 13: 17 <http://www.nutritionj.com/content/13/1/17>.
43. Leibowitz MD, Fievet C, Hennuyer N, Peinado-Onsurbe J, Duez H, Bergera J, et al. Activation of PPAR delta alters lipid metabolism in db/db mice. *FEBS Lett.* 2000; 473(3): 333- 6.
44. Wang YX, Lee CH, Tiep S, Yu RT, Ham J, et al. Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor Delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell.* 2003; 113(2) : 159- 70.
45. Medina-Gomez G, Virtue S, Lelliot C, Bojani R, Campbell M, Christodoulides C, Perrin C, Jimenez-Linan M, Blount M, Dixon J, Zahn D, Thresher RR, Aparicio S, Carlton M, Colledge WH, Kettunen MI, Seppänen-Laakso T, Sethi JK, O' Rahilly S, Brindle K, Cinti S, Orešič M, Burcelin R, Vidal- Puig A. The link between nutritional status and insulin sensitivity is dependent on the adipocyte-specific peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 isoform. *Diabetes.* June 2005; 54(6): 1706– 1716.
46. Nagy ZS, Czimmerer Z, Szanto A, Nagy L. Pro-inflammatory cytokines negatively regulate PPAR mediated gene expression in both human and murine macrophages via multiple mechanisms. *Immunobiology.* 2013; 218 (2013) 1336– 1344.
47. Nicholson AC. Expression of CD36 in macrophages and atherosclerosis: the role of lipid regulation of PPARgamma signaling. *Trends Cardiovasc Med.* 2004; 14(1) : 8- 12.
48. Rosenson RS. Effects of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors on lipoprotein metabolism and glucose control in type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol.* 2007; 99(4A) : 96B-104B.
49. Rangwala SM, Lazar MA. Peroxisome proliferator- activated receptor γ in diabetes and metabolism. *Trends Pharmacol Sci.* 2004; 25: 331- 336.
50. Kim H, Ahn Y. Role of Peroxisome Proliferator- Activated Receptor- γ in the glucose-sensing apparatus of liver and β -cells. *Diabetes.* February 2004; 53(suppl 1): S60- S65. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.2007.S60>.
51. Mukherjee R, Jow L, Croston GE, Paterniti JR. Identification, characterization, and tissue distribution of human Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) isoforms PPAR γ 2 versus PPAR γ 1 and activation with retinoid X receptor agonists and antagonists. *The journal of biological chemistry.* 1997; Vol. 272, No. 12, Issue of March 21, pp. 8071– 8076, 1997 © 1997 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Printed in U. S. A.
52. Kiec WB, Dembinska KA, Olszanecka A, Bodzioch M, Kawecka J. The selected pathophysiological aspects of PPARs activation. *J Physiol Pharmacol.* 2005; 56: 46-162.
53. Komar CM. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) and ovarian function implications for regulating steroidogenesis, differentiation, and tissue remodeling. *Reprod Biol Endocrinol.* 2005; 3: 41.
54. Semple RK, Chatterjee VKK, O'Rahilly S. PPAR γ and human metabolic disease. *J Clin Invest.* 2006; 116(3): 581- 589. <https://doi.org/10.1172/JCI28003>.

55. Escher P, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. *Mutat Res.* 2000; 448: 121- 138.
56. Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm. Res.* 2000; 49 (2000) 497– 505.
57. Hamblin M, Chang L, Fan Y, Zhang J, Chen YE. PPARs and the cardiovascular system. *Antioxidants & Redox signaling.* 2009; Volume 11, Number 6, 2009 ^a Mary Ann Liebert, Inc. DOI: 10.1089= ars. 2008. 2280.
58. Tack CJ, Smits P. Thiazolidinedione derivatives in type 2 diabetes mellitus. *North J Med.* 2006; 64: 166- 174, 2006.
59. Onursal C. İnsan safen veninde yüksek glikoz ve pioglitazonun vasküler yanıtlar üzerine etkileri. Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İzmir, 2018 (Danışman: Prof. Dr. Buket Reel).
60. Wang Q, Imam MU, Yida Z, Wang F. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPAR γ) as a target for concurrent management of diabetes and obesity-related cancer. *Curr Pharm. Des.* 2017; 23(25): 3677- 3688. doi: 10.2174/ 1381612823666170704125104.
61. Kayaalp SO. Oral antidiyabetik ilaçlar, “ Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji” Hacettepe Taş Kitapçılık Ltd. Şti, 3: 1198-1206, Ankara, 2002.
62. Schoonjans K, Auwerx J. Thiazolidinediones: An update. *Lancet.* 2000; 355(9208) : 1008– 10.
63. Yumuk VD. Targeting components of the stress system as potential therapies for the metabolic syndrome: the peroxisome-proliferator-activated receptors. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1083: 306- 18.
64. Sakamoto J., Kimura H., Moriyama S., Odaka H., Momose Y., Sugiyama Y., Sawada H. Activation of human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) subtypes by pioglitazone. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2000; 278, 704–711 (2000). doi: 10. 1006/ bbrc.2000.3 868.
65. [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ Pioglitazone- hydrochloride](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pioglitazone-hydrochloride), Erişim Tarihi: 05 Temmuz 2019.
66. Scherthaner G, Matthews DR, Charbonnel B, Hanefeld M, Brunetti. Efficacy and safety of pioglitazone versus metformin in patients with type 2 diabetes mellitus: A double-blind, randomized trial. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2004; 89(12) : 6068– 6076, 2004.
67. Betteridge DJ, DeFronzo RA, Chilton RJ. Insulin Proactive: time for a critical appraisal. *European Heart Journal.* 2008; 29: 969– 983, 2008.
68. Funko JL, Shobac D. Greenspan’s Basic & Clinical Endocrinology. McGraw Hill. 2011; 285–327, 426, 575– 82.
69. Lebovitz HE, Banerji MA. Treatment of insulin resistance in diabetes mellitus. *Eur J Pharmacol.* 2004; 490 (1– 3) : 135– 46.
70. Palade G. The fine structure of mitochondria. *Anat Rec.* 1952; 114: 427- 451.

71. Sjostrand FS. Electron microscopy of mitochondria and cytoplasmic double membranes. *Nature*. 1953; 171: 30- 31.
72. Gümrukçüoğlu Tİ. Olanzapinin beyin dokusunda mitokondri kompleks 1, 2, 3 ve Atp-sentaz üzerine etkisi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Samsun, 2017 (Danışman: Doç. Dr. Birşen Bilgici).
73. Perkins G, Renken C, Martone ME, Young SJ, Ellisman M, Frey T. Electron tomography of neuronal mitochondria: three- dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts. *J Struct Biol*. 1997; 119: 260- 272.
74. Scheffler IE. Mitochondria. John Wiley and Sons Inc Publication. Chapter 1999; 5 :141- 238.
75. Ciccarone F, Di Leo L, Ciriolo MR. Aberrations of the TCA Cycle in Cancer. Reference Module in Biomedical Sciences. (2018); doi: 10. 1016/ b978- 0- 12- 801238- 3. 65066- 3.
76. Torrell H, Montana E, Abasolo N, Roig B, Gaviria AM, Vilella E, Martorell L. Mitochondrial DNA (mtDNA) in brain samples from patients with major psychiatric disorders: Gene expression profiles, mtDNA content and presence of the mtDNA common deletion. *Am J Med Genet*. 2013; Part B 162B: 213– 223.
77. Wu S, Zou MH. AMPK, Mitochondrial Function, and Cardiovascular Disease. *Int. J. Mol. Sci*. 2020; 21, 4987; doi: 10. 3390/ ijms21144987.
78. Rao KRK, Prasad ASR. A Factorial study on the formulation and evaluation of pioglitazone controlled release matrix tablets. *Int. J. Drug Dev. & Res*. July- September 2013; Vol. 5, Issue 3, ISSN 0975- 9344.
79. Pınarbaşı A, Pak M, Kolay M, Öz DA, Aksungar FB. Effects of peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR γ) agonist on fasting model applied neuron cultures. *Turk J Biochem*. 2021; aop. [https:// doi.org/ 10. 1515/ tjb- 2021- 0104](https://doi.org/10.1515/tjb-2021-0104) Received May 1, 2021; accepted August 11, 2021; published online October 8, 2021.
80. Vandermeer, J. How Populations Grow: The Exponential and Logistic Equations. *Nature Education Knowledge*. 2010; 3(10): 15.
81. Chan FK, Moriwaki K, De Rosa MJ. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase (LDH) activity. *Methods Mol Biol*. 2014; 979: 65– 70.
82. Yalvaç E. Tip 2 Diyabetes Mellitus hastalarında metformin+pioglitazon ile metformin+sitagliptin tedavilerinin total oksidatif ve antioksidatif durum ile paraoksonaz ve arilesteraz aktivitelerine etkilerinin araştırılması. Harran Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, Şanlıurfa, 2011 (Danışman: Prof. Dr. Tefik Sabuncu).
83. Cinkara ZU. PPAR α ve PPAR γ agonistlerinin Tip 2 Diabetes mellituslu hastalarda böbrek fonksiyonları, proteinüri, oksidatif stres, kan basıncı, kan şekeri ve HbA1c üzerine olan etkileri. Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Adana, 2014 (Danışman: Prof. Dr. Saime Paydaş).
84. Evans RM, Barish GD, Wang YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat. Med*. 2004; 10 (2004) 355– 361.

85. Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, et al. PPAR γ is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Molecular Cell*. October 1999; Vol. 4, 585–595.
86. Saluja I, Granneman JG, Skoff RP. PPAR delta agonists stimulate oligodendrocyte differentiation in tissue culture. *Glia*. 2001; 33 (2001) 191– 204.
87. Chuang YC, Lin TK, Yang DI, Yang JL, Liou CW, Chen SD. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma dependent pathway reduces the phosphorylation of dynamin-related protein and ameliorates hippocampal injury induced by global ischemia in rats. *Journal of Biomedical Science*. 2016; (2016) 23: 44 DOI 10. 1186/ s12929- 016- 0262- 3.
88. Cippitelli A, Domil E, Ubaldi M, Douglas JC, Li HW, Demopoulos G, Gaitanaris G, Roberto M, Drew PD, Kane CJM, Ciccocioppo R. Protection against alcohol-induced neuronal and cognitive damage by the PPAR γ receptor agonist pioglitazone. *Brain Behav Immun*. August 2017; 64: 320– 329. doi: 10. 1016 /j. bbi. 2017. 02. 001.
89. Hunter RL, Bing G. Agonism of Peroxisome Proliferator Receptor–Gamma may have Therapeutic Potential for Neuroinflammation and Parkinson’s Disease. *Current Neuropharmacology*. 2007; 5, 35- 46.
90. Cullingford TE, Bhakoo K, Peuchen S, Dolphin CT, Patel R, et al. Distribution of mRNAs encoding the peroxisome proliferator-activated receptor α , β , and γ and the retinoid X receptor α , β , and γ in rat central nervous system. *Journal of Neurochemistry*. April 1998; Volume 70, Issue 4, Pages 1366- 1375.
91. Moreno S, Farioli-Vecchioli S, Cerù MP. Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid x receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience*. 2004; Volume 123, Issue 1, 2004, Pages 131-145. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.08.064>.
92. Szychowski KA, Gmiński J. The VGVAPG peptide regulates the production of nitric oxide synthases and reactive oxygen species in mouse astrocyte cells in vitro. *Neurochemical Research*. 2019; 44: 1127– 1137 <https://doi.org/10.1007/s11064-019-02746-z>.
93. Utreras E, Hamada R, Prochazkova M, Terse A, Takahashi S, Ohshima T, Kulkarni AB. Suppression of neuroinflammation in forebrain-specific Cdk5 conditional knockout mice by PPAR γ agonist improves neuronal loss and early lethality. *Journal of Neuroinflammation*. 2014; 11: 28.
94. Backes JM, Howard PA. Association of HMG-CoA reductase inhibitors with neuropathy. *Ann Pharmacother*. 2003; 37(2): 274- 8.
95. Camacho IE, Serneels L, Spittaels K, Merchiers P, Dominguez D, Strooper BD. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor induces a clearance mechanism for the amyloid- peptide. *The Journal of Neuroscience*. December 2004; 24(48): 10908 – 10917. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3987-04.2004>.

96. Wang H, Chen F, Zhong KL, Tang SS, Hu M, Long Y, Miao MX, Liao JM, Sun HB , Hong H. PPAR γ agonists regulate bidirectional transport of amyloid- β across the blood–brain barrier and hippocampus plasticity in db/db mice. *British Journal of Pharmacology*. 2016; 173 372– 385. DOI: 10. 1111/ bph. 13378.
97. Papadopoulos P, Neto PR, Rochford J, Hamel E. Pioglitazone improves reversal learning and exerts mixed cerebrovascular effects in a mouse model of alzheimer’s disease with combined amyloid- β and cerebrovascular pathology. *Plos One*. 18 July 2013; 8(7) : e68612. doi: 10. 1371/ journal. pone. 0068612.
98. Ulusoy KG. Sıçanlarda rotenon ile oluşturulan parkinson hastalığı modeli ve pioglitazon ve retinoik asidin etkileri. GATA, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, Ankara, 2009 (Danışman: Doç. Dr. Turgay Çelik).
99. Dehmer T., Heneka MT., Sastre M., Dichgans J., Schulz JB., Protection by pioglitazone in the MPTP model of Parkinson’s disease 76 correlates with I kappa B alpha induction and block of NF kappa B and iNOS activation. *J Neurochem*. 2004; 88, 494– 501, 2004.
100. San YZ, Liu Y, Zhang Y, Shi PP, Zhu YL. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ agonist inhibits the mammalian target of rapamycin signaling pathway and has a protective effect in a rat model of status epilepticus. *Molecular Medicine Reports*. 2015; 12: 1877- 1883, 2015. DOI: 10.3892/ mmr. 2015. 3641.
101. Zhu J, Zhang J, Ji M, Gu H, Xu Y, Chen C, Hu N. The role of peroxisome proliferator-activated receptor and effects of its agonist, pioglitazone, on a rat model of optic nerve crush: PPAR α in retinal neuroprotection. *PLoS ONE*. July 2013; 8(7): e68935DOI: 10. 1371/ journal. pone. 0068935July 2013, Volume 8, Issue 7, e68935.
102. Ding Y, Fang H, Shang W, Xiao Y, Sun T, Hou N, et al. Mitoflash altered by metabolic stress in insulin-resistant skeletal muscle. *J Mol Med*. 2015; 93(10): 1119– 30.
103. Miglio G, Rosa A C, Rattazzi L, Collino M, Lombardi G, et al. PPAR γ stimulation promotes mitochondrial biogenesis and prevents glucose deprivation-induced neuronal cell loss. *Neurochem Int*. 2009; Dec; 55 (7): 496- 504. doi: 10.1016 /j. neuint. 2009. 05. 001.

Research Article

Arzu Pınarbaşı, Meltem Pak, Murat Kolay, Devrim Öz Arslan and Fehime Benli Aksungar*



Effects of peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR γ) agonist on fasting model applied neuron cultures

Peroksizom Proliferatörle Aktive Edilmiş Reseptör Gama (PPAR γ) Agonistinin Açlık Modeli Uygulanan Nöron Kültürleri Üzerindeki Etkileri

<https://doi.org/10.1515/tjb-2021-0104>
Received May 1, 2021; accepted August 11, 2021;
published online October 8, 2021

Abstract

Objectives: Peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR γ) agonists used for the treatment of Diabetes Mellitus (DM), has important roles on the regulation of metabolism including ketogenesis in fasting and low glucose states. Recently PPAR γ was proven to have anti-oxidant and anti-inflammatory effects on neuronal cells.

Methods: In the present study, effects of pioglitazone (PPAR γ agonist) on cell survival, energy metabolism and mitochondrial functions were investigated in glucose deprived fasting model applied SH-SY5Y (ATCC/CRL 2266) cell lines. Before and after pioglitazone treatment; energy metabolites (glucose, lactate, ketone (β OHB), lactate

dehydrogenase activity), mitochondrial citrate synthase activity and cell viability were investigated.

Results and Conclusions: PPAR γ agonist addition to glucose deprived, ketone added neurons provided positive improvements in energy metabolites ($p < 0.01$), mitochondrial functions ($p < 0.001$) and survival rates ($p < 0.01$). Changes in mitochondrial citrate synthase activity, lactate and LDH levels of neuronal cells treated with PPAR γ agonist have not been previously shown. Our results suggest, pioglitazone as an effective alternative for the treatment of neurodegenerative diseases especially with the presence of ketone bodies. By clarifying the mechanisms of PPAR γ agonists, a great contribution will be made to the treatment of neurodegenerative diseases.

Keywords: fasting; ketone bodies; neuron cultures; pioglitazone; PPAR γ .

Özet

Genel Bilgiler: Diabetes Mellitus (DM) tedavisinde kullanılan Peroxisome Proliferatör ile aktive edilen Reseptör Gama (PPAR γ) agonistleri, açlık ve düşük glukoz durumlarında ketogenez dahil metabolizmanın düzenlenmesinde önemli rollere sahiptirler. Son zamanlarda PPAR γ 'nın nöron hücreleri üzerinde antioksidan, anti enflamatuvar etkilere sahip olduğu gösterilmiştir.

Amaç: Bu çalışmada; pioglitazonun (PPAR γ agonisti) hücre canlılığı, enerji metabolizması ve mitokondriyal fonksiyonlar üzerindeki etkileri, SH-SY5Y (ATCC/CRL 2266) hücre hatlarına uygulanan glikozdan yoksun açlık modelinde araştırılmıştır.

*Corresponding author: Fehime Benli Aksungar, Department of Medical Biochemistry, Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar University, School of Medicine, Kayışdağı caddesi, No 32, Ataşehir, İstanbul, Turkey; and Department of Clinical Biochemistry, Acıbadem Labmed Clinical Laboratories, İstanbul, Turkey, Phone: +90 532 1727854, E-mail: fehim.aksungar@acibadem.edu.tr. <https://orcid.org/0000-0002-7954-7177>

Arzu Pınarbaşı and Meltem Pak, Department of Medical Biochemistry, Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar University, School of Medicine, İstanbul, Turkey

Murat Kolay, Department of Clinical Biochemistry, Acıbadem Labmed Clinical Laboratories, İstanbul, Turkey

Devrim Öz Arslan, Department of Biophysics, Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar University School of Medicine, İstanbul Turkey

© Open Access. © 2021 Arzu Pınarbaşı et al., published by De Gruyter. This work is licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 International License.

Materyal ve Metot: Pioglitazone uygulanmasından önce ve sonra; enerji metabolitleri (glukoz, laktat, keton (β OHB), laktat dehidrogenaz aktivitesi), mitokondriyal sitrat sentaz aktivitesi ve canlılık oranları araştırıldı.

Bulgular ve Tartışma: Glukozu azaltılmış, keton ilave edilmiş (Açlık modeli) nöron kültürlerine PPAR γ agonisti eklenmesi; metabolik parametrelerde ($p < 0.01$), mitokondriyal fonksiyonlarda ($p < 0.001$) ve canlılık oranlarında ($p < 0.01$) pozitif yönde iyileşmelere neden oldu. PPAR γ agonisti uygulanan nöronlarda mitokondriyal sitrat sentaz aktivitesi, laktat ve LDH seviyelerindeki değişiklikler daha önce gösterilmemiştir. Sonuçlarımız, pioglitazonun özellikle keton cisimciklerinin varlığında nörodegeneratif hastalıkların tedavisinde etkili bir alternatif olduğunu düşündürmektedir. PPAR γ agonistlerinin etki mekanizmalarının açıklığa kavuşturulması, nörodegeneratif hastalıkların tedavisine büyük katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Açlık; Keton Cisimcikleri; Nöron Kültürleri; Pioglitazone; PPAR γ .

Introduction

In recent years, effects of calorie restriction (CR) and prolonged fasting on brain functions have been studied in experimental and clinical studies. In both cases, since there is a glucose restriction, brain uses ketone bodies as an alternative energy source. It is known that ketogenic diet is strongly effective in epileptic patients who are resistant to anti-epileptic drugs [1]. Ketogenic diet primarily consists of high-fats, moderate-proteins, and low-carbohydrates which leads the body to synthesize ketones as a result of low glucose in blood. Our group is working on the effects of the prolonged fasting model, an alternative to ketogenic diet, and ketone bodies in humans and neuronal cells.

The present study is inspired by the newly discovered positive effects of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma agonists (PPAR γ), used for the treatment of Diabetes Mellitus (DM), on neuron and mitochondrial damage [2, 3]. Ketogenic diet is shown to activate PPAR γ by many mechanisms [2, 4]. In prolonged fasting ketone bodies, secreted in high concentrations, can also activate PPAR γ pathways.

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are proteins belong to superfamily of nuclear hormone factors, that are nuclear receptors and ligand dependent transcription factors. Structurally, PPARs are similar to steroid or thyroid hormone receptors and are stimulated in response to small lipophilic ligands. It is shown that they have critical

role on the regulation of mitochondrial biogenesis, inflammation, anti-oxidant defense and pathways related to carbohydrate and lipid metabolisms [5]. PPARs have three isotypes (PPAR α , PPAR δ and PPAR γ) and play an essential role in the energy metabolism; however, they differ in the spectrum of their activity and tissue distribution; PPAR γ regulates energy storage, whereas PPAR α is expressed predominantly in the liver, muscle, heart and bone and PPAR δ is ubiquitously expressed in whole body regulating the energy expenditure [3].

Thiazolidinediones (TZDs) are widely studied PPAR γ ligands. Acting as sensors of hormones, vitamins, endogenous metabolites, and xenobiotic compounds, PPAR γ s are nuclear receptors which control the expression of a very large number of genes. PPAR γ has been known to regulate adipocyte differentiation, fatty acid storage and glucose metabolism, which makes it a target of antidiabetic drugs [6–8]. PPAR γ agonist improves insulin resistance by opposing the effect of TNF- α in adipocytes [9]. Moreover, PPAR γ agonists are shown to have effects in Parkinson, Alzheimer disease and brain injury. They are thought to act on microglial cells inhibiting their activation. Recently, PPARs have been shown to modulate inflammation by inhibiting the production of proinflammatory molecules by glial cells. *In vivo* oral administration of the PPAR γ agonist pioglitazone reduced glial activation and the accumulation of A β -positive plaques in the hippocampus and cortex [2, 3].

All these information about the effects of PPAR γ on neurodegenerative damage made us think that, PPAR γ agonist pioglitazone may also be effective on neuronal mitochondrial functions together with ketone bodies. Our aim was to investigate if pioglitazone can be an alternative in the treatment of neuron damage together with ketone bodies. In our study, SH-SY5Y (human neuroblastoma-ATCC/CRL 2266) cell cultures were performed and glucose deprived fasting model was applied to these neurons. In physiological conditions, fasting is accompanied by ketone bodies so neurons were treated by beta-hydroxybutyrate and further by pioglitazone to investigate the effects on the energy metabolites, mitochondrial functions and viability of the cells.

Materials and methods

Cell cultures

During our study, SH-SY5Y (human neuroblastoma-ATCC/CRL 2266) cell line was purchased from ATCC. Frozen cells were thawed as indicated in the ATCC booklet. Cells were seeded at 2×10^5 cells/cm ^{2}

density into in 25 cm² flasks and grown in media containing Dulbecco's modified Eagle's Medium/Ham's F-12 Nutrient mixture (DMEM/F-12) (1:1) containing L-glutamine and 10% fetal bovine serum (FBS) at 37 °C and 5% CO₂ + 95% O₂ air atmosphere. When cells were 80–90% confluent, they were detached with trypsin and taken into new flasks/plates in order to perform the experiments. Cells were passaged to 75 cm² flasks when expected confluency was reached and the total media volume was made up to 10 mL before incubating at aforementioned conditions. Growth medium was replaced in every two days and doubling time studies showed up to be approximately 29 h. Experiments were performed in 75 cm² flasks and early passages of cells (P4-8 after purchase) were used.

Experimental groups and cell treatment conditions

Six groups were planned in the study (Table 1): control group (N), cells were incubated with normal medium which contained 300 g/dL glucose (DMEM/F12 + 10% FBS) (DMEM/F12, Gibco-11330057; FBS, Gibco-26140079). Glucose deprived fasting model group (F): Earl's balanced salt solution (EBSS, Sigma-E2888) + 10% FBS medium was used in this group (containing 100 g/dL glucose). Two sub-groups were formed by adding 5 mM ketone (Beta-hydroxy butyrate- β OHB, Sigma Aldrich-H9408) to the aforementioned two groups in order to simulate the physiological fasting conditions (FK) and ketone control group (NK). And finally for pioglitazone (Sigma Aldrich, E6910), (PPAR γ agonist) added media, the abbreviation P is added to be NKP and FKP (Table 1). These latter groups were designed specifically to observe the behaviors of cells when only ketone presence and both ketone and pioglitazone presence in the media.

Betahydroxy Butyrate (β OHB, Sigma Aldrich-H9408) medium: β OHB was used in the experiments since it is the most potent ketone body. Calculations were made from β OHB (126.09 g/mol) to have a total of 5 mM in a 10 mL medium. Briefly, 0.630 mg β OHB weighed and dissolved in 50 mL sterile PBS, filtered with a 0.22 μ m syringe to prepare the sterile stock solution. All the ketone-added media were prepared to have a final concentration of 5 mM β OHB.

Preparation of PPAR γ Agonist medium: For a final concentration of 5 μ M pioglitazone (Sigma Aldrich, E6910), 5 μ L pioglitazone stock solution was added to 5 mL of the experiment media [10, 11].

Table 1: Experimental groups and media content.

	Medium	FBS	β OHB	PPAR γ agonist	Glucose content, mg/dL
N	DMEM/F12	10%	0	0	300
NK	DMEM/F12	10%	5 mM	0	300
NKP	DMEM/F12	10%	5 mM	5 μ M	300
F	EBSS	10%	0	0	100
FK	EBSS	10%	5 mM	0	100
FKP	EBSS	10%	5 mM	5 μ M	100

Normal (N) and fasting (F) media were used as control groups, they consist neither ketone (β OHB) nor pioglitazone (PPAR γ agonist). NK and FK groups were used as control groups of pioglitazone added groups (NKP and FKP). DMEM/F-12, Dulbecco's modified Eagle's Medium/Ham's F-12 Nutrient mixture; EBSS, Earl's balanced salt solution; FBS, fetal bovine serum.

Experiments

When cells were 80% confluent, normal media were withdrawn, flasks were washed with 2 mL of sterile phosphate buffered saline (PBS) and experiment media were added. 1 mL of the unused media were allotted for the measurements of energy metabolites (glucose, lactate, β OHB and Lactate dehydrogenase – LDH) before the experiments (initial values, *i*). Experiments were started the day before, and ended after 16-h incubation next morning. Experiment media were removed, 1 mL of them were allotted for the metabolic measurements again (end values, *e*). Cells were removed with Trypsin/EDTA and the viability rates were controlled with trypan blue. Then cells were homogenized for citrate synthase activity. In addition, microscopic pictures were taken (initial and after the experiment) for morphological examinations. Experiments were repeated 7 times under the same conditions.

Cell viability

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide (MTT) assay is a cytotoxicity experiment that is used to demonstrate the viability of cells numerically under certain conditions. MTT dye is metabolized by living cells and gives color at 595 nm wavelength, white color formation is not observed in dead cells. Color formation intensity is directly proportional to the cell viability. MTT Kit (Cat. Number 11465007001-Roche-Germany) was used in the experiments.

Analysis of metabolic parameters

Abbot precision-Xtra POCT device (California, USA) was used to measure ketone (β OHB) concentrations of the media before and after the experiments. 10 μ L of each medium was introduced to ketone probe and measurements were performed. Glucose, lactate and LDH levels in the culture media were measured in ADVIA 1800 (Siemens-Germany) biochemistry auto-analyzer. Analytic range of the glucose measurement method was 1–700 mg/dL. For lactate measurements, the analytic range of the method was 2–50 mg/L. Lactate dehydrogenase activity was assessed by measuring the decrease in the optical density resulting from the oxidation of NADH at 340 nm using pyruvate as a substrate. Analytic range of the LDH activity measurement was 5–750 U/L.

Citrate synthase activity measurements

Citrate synthase is the first enzyme of the tricyclic acid cycle in the mitochondria matrix. The activity of citrate synthase is frequently used as a biochemical marker for the mitochondrial content and functions of a cellular homogenate. Citrate synthase activity measurement kit (Abcam-USA) was used for the enzyme activities in accordance with the experimental plan. Briefly, according to the protein concentrations, homogenates were diluted with the buffer solution to the expected protein concentration. Samples were added to a 96-well plate in a volume of 100 μ L and incubated for 3 h at room temperature. Absorbances were measured in the ELISA reader and color changes were recorded at 412 nm for 30 min. Activity graphs were drawn and the time for Vmax of the enzymes was calculated as minutes for each group.

Data analysis

Our data are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD) from seven independent experiments. Our results were evaluated statistically by one-way ANOVA, followed by Tukey's multiple-comparison test. Differences with a probability (p) less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

Optimization studies

Metabolic parameters and cell viability with the vehicle

Final concentration of 5 μ M pioglitazone was added to the neurons that were incubated with normal (N) and fasting (F) medium in order to see the effects of pioglitazone on metabolic parameters and viability of the cells and no statistically significant effect was detected on the cells

(Table 2). According to these data, experiments were carried out without NP and FP groups.

Fasting model optimization studies

To determine the incubation period for glucose deprivation model, 10^5 cells were planted in 12-well flasks, each with an area of 4 cm^2 , in the 6th passage and when the density was 80% normal growth media were removed and experiment media were added in three different groups: normal (N), fasting (F) and no glucose (G0). These media were added in a total volume of 2 mL according to the flask plan and cells were incubated in the aforementioned media for 4, 8, 12, 16, and 20 h. Media were collected from the wells at the beginning and at the end of each incubation, and the amount of glucose, lactate, LDH were analyzed (data not shown) together with cell viability (Figure 1). This experiment was repeated three times and 16 h of incubation period was decided by comparing all the results obtained. This decision was based on the LDH levels of the media, viability of the cells and the simulation of fasting for more than 12 h.

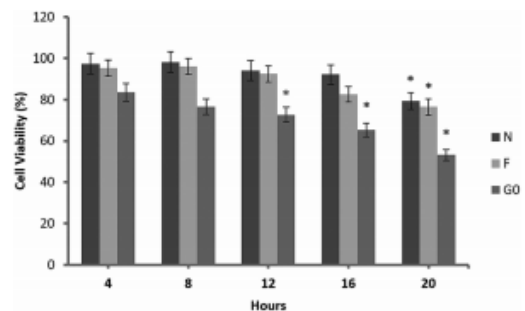


Figure 1: Cell viabilities in the normal and glucose deprived model optimization studies (n=3). N, cells were incubated with DMEM/F12 + 10% FBS. F, cells were incubated with EBSS + 10% FBS. G0 (DMEM + 10% FBS, glucose-free medium), *p<0.01 when compared to the first 4 h of the same group.

Table 2: Comparison of metabolic parameters in optimization studies.

n=3	Lactate _i , mg/dL	Lactate _e , mg/dL	Glucose _i , mg/dL	Glucose _e , mg/dL	LDH _i , U/L	LDH _e , U/L	Viability _e , %
N	14.6 $\pm$ 1.3	22.1 $\pm$ 0.92	294 $\pm$ 13	249 $\pm$ 11	18.9 $\pm$ 1.7	27.9 $\pm$ 2.6	95
NP	13.9 $\pm$ 0.94	20.7 $\pm$ 0.83	299 $\pm$ 17	256 $\pm$ 16	17.4 $\pm$ 2.8	29.4 $\pm$ 1.7	98
F	14.7 $\pm$ 1.1	36.1 $\pm$ 1.8	98 $\pm$ 13	72 $\pm$ 12	16.3 $\pm$ 0.73	32.5 $\pm$ 2.9	82
FP	14.2 $\pm$ 0.83	37.6 $\pm$ 1.3	96 $\pm$ 9	78 $\pm$ 13	18.2 $\pm$ 1.7	27.9 $\pm$ 1.6	80

Values are shown with "i" before the experiment and with "e" after the experiment. N, cells were incubated with DMEM/F12 + 10% FBS. NP, cells were incubated with DMEM/F12 + 10% FBS + 5 μ M PPAR γ agonist (pioglitazone). F, cells were incubated with EBSS + 10% FBS. FP, cells were incubated with EBSS + 10% FBS + 5 μ M PPAR γ agonist (pioglitazone). Incubation period was 16 h.

Experimental energy metabolites

All cells consumed glucose during the 16 h experimental conditions, but cells incubated with ketone added media also used β OHB simultaneously, and their glucose utilization decreased compared to other cells (Table 3). In addition, lactate formation was reduced in ketone-added cells compared to other media together with LDH levels. Moreover, pioglitazone seemed to help the cells use their mitochondria to get energy rather than the anaerobic glycolysis. Lactate dehydrogenase enzyme activity measurements are one of the indicators of cell damage [12] and LDH levels of cells that were incubated with ketone and pioglitazone added media were lower.

Cell viability

Cellular viability was assessed by the MTT assay. Cell survival was expressed as percentage neuroprotection compared with normal group at 100% (Figure 2). Viability rates were not different in neurons incubated in the normal media with or without ketone and PPAR γ agonist. However, viabilities of ketone and PPAR γ agonist treated fasting group cells were higher ($p < 0.01$, Figure 2).

Citrate synthase activity

In our experiments, citrate synthase activity was measured in cells after 16 h of incubation with the experiment media. From the activity graphs, the time when the enzyme reaches the highest speed (V_{max}) was calculated in minutes and is given in Figure 3. Cells incubated with normal

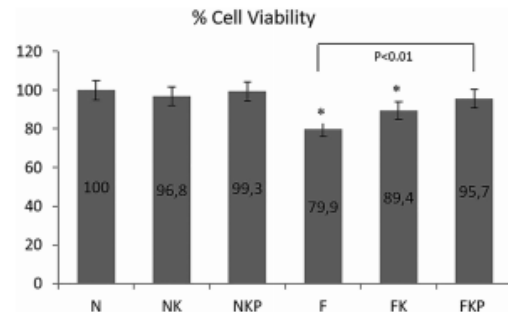


Figure 2: Cell viability is assessed with MTT assay. Data are expressed as mean $\pm$ SD ($n=7$). N, (normal) control group (DMEM F12 + 10% FBS-300 mg/dL glucose containing medium), NK, ketone added to normal medium (DMEM F12 + 10% FBS + 5 mM β OHB), NKP, PPAR γ agonist added to NK medium (DMEM F12 + 10% FBS + 5 mM β OHB + 5 μ M PPAR γ agonist) F, glucose deprived media (EBSS + 10% FBS, 100 mg/dL glucose containing medium), FK, ketone added glucose deprived media (EBSS + 10% FBS, +5 mM β OHB), FKP (PPAR γ agonist added to FK medium (EBSS + 10% FBS, +5 mM β OHB + 5 μ M PPAR γ agonist). * $p < 0.01$, when compared to normal (N).

medium reached the V_{max} value fastest. It was observed that enzyme was working slowly as medium glucose content was decreased (Figure 3). In cells with the normal media, enzyme activity did not change significantly although mean velocity was slightly increased in cells containing both ketone and PPAR γ agonist together (Figure 3). Enzyme velocity was found to be statistically increased in media containing ketone and further PPAR γ agonist (Figure 3) in the fasting group. Additionally, enzyme activity observed to be faster in FK and FKP group than the F group which suggests in the deprivation of glucose, cells use ketone efficiently and may restore mitochondrial energy pathways in the presence of PPAR γ .

Table 3: Energy metabolites before and after the experiments in the cell media.

	Glucose _i , mg/dL	Glucose _e , mg/dL	Lactate _i , mg/dL	Lactate _e , mg/dL	β OHB _i , mmol/L	β OHB _e , mmol/L	LDH _i , U/L	LDH _e , U/L
N	305 $\pm$ 16	231 $\pm$ 14 [†]	14.3 $\pm$ 0.9	21.6 $\pm$ 1.6 [†]	0	0	17 $\pm$ 2.1	23 $\pm$ 2.7 [†]
NK	301 $\pm$ 18	270 $\pm$ 28 ^{*†}	13.1 $\pm$ 1.2	22.5 $\pm$ 1.2 ^{†#}	5.3 $\pm$ 0.3	3.9 $\pm$ 0.5 [†]	16 $\pm$ 3.6	24 $\pm$ 2.1 ^{*†}
NKP	298 $\pm$ 12	282 $\pm$ 11 ^{*†}	12.9 $\pm$ 1.5	19.5 $\pm$ 1.1 [†]	5.1 $\pm$ 0.7	3.2 $\pm$ 0.7 [†]	17 $\pm$ 4.1	20 $\pm$ 2.6 ^{*†#}
F	99 $\pm$ 13	63 $\pm$ 9 ^{*†}	14.2 $\pm$ 3.1	30.6 $\pm$ 2.8 ^{*†}	0	0	18 $\pm$ 1.4	32 $\pm$ 0.9 ^{*†}
FK	102 $\pm$ 9	77 $\pm$ 6 ^{*†#}	13.9 $\pm$ 2.2	24.3 $\pm$ 1.7 ^{*†#}	4.8 $\pm$ 0.8	3.1 $\pm$ 0.9 [†]	17 $\pm$ 2.1	23 $\pm$ 1.7 ^{*†#}
FKP	99.1 $\pm$ 11	79 $\pm$ 7 ^{†#}	14.9 $\pm$ 2.1	19.3 $\pm$ 1.3 ^{*†#}	5.1 $\pm$ 0.9	2.1 $\pm$ 0.7 ^{†#}	18 $\pm$ 2.3	19 $\pm$ 1.5 ^{*†#}

Values are shown with "i" before the experiment and with "e" after the experiment. Data are expressed as mean $\pm$ SD ($n=7$). N, (Normal) control group. NK, ketone added to normal medium. NKP, PPAR γ agonist added to NK medium. F, glucose deprived media. FK, ketone added to glucose deprived media. FKP, PPAR γ agonist added to FK medium. * $p < 0.01$ when compared to N, [#] $p < 0.01$ when compared to the same group without β OHB. [†] $p < 0.01$ when compared to the values before the experiment at initial (i), [‡] $p < 0.01$ when compared to the same group without pioglitazone.

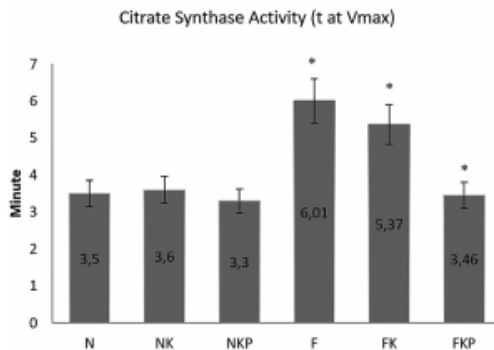


Figure 3: Citrate synthase activity was assessed after 16 h incubation with the experimental media. The time, when the enzyme reaches at the highest speed (V_{max}) is calculated in minutes and given in the graphic (* $p < 0.01$, when compared to normal). Data are expressed as mean $\pm$ SD ($n = 7$). N, (normal) control group (DMEM F12 + 10% FBS-300 mg/dL glucose containing medium), NK, ketone added to normal medium (DMEM F12 + 10% FBS + 5 mM β OHB), NKP, PPAR γ agonist added to NK medium (DMEM F12 + 10% FBS + 5 mM β OHB + 5 μ M PPAR γ agonist) F, glucose deprived media (EBSS + 10% FBS, 100 mg/dL glucose containing medium), FK, ketone added glucose deprived media (EBSS + 10% FBS, +5 mM β OHB), FKP (PPAR γ agonist added to FK medium (EBSS + 10% FBS, +5 mM β OHB + 5 μ M PPAR γ agonist).

Discussion

In the present study, effects of peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR γ) agonist (pioglitazone) on glucose deprived, ketone added (fasting model) neuron cultures in terms of neuron viability, energy metabolism and mitochondrial functions were investigated in order to evaluate alternative treatment options in neurodegenerative diseases.

SH-SY5Y (human neuroblastoma-ATCC/CRL 2266) cell line was used in the study. SH-SY5Y is a human derived cell line used *in vitro* models of neuronal function and differentiation. The original cell line was isolated from a bone marrow biopsy taken from a four-year-old female with neuroblastoma. Normal nutrition and fasting models were applied to the 80% confluent cultured neurons by changing the glucose concentrations of the media [13]. Experiments were carried out by adding ketone and pioglitazone separately or together to the media.

When pioglitazone is added to the normal (N) and fasting (F) media alone it does not cause any statistically significant difference in metabolic parameters and cell viability in neurons (Table 2). However, when we simulate physiologic fasting conditions with ketone addition to the media (F and FK vs. FKP), metabolic parameters and

cell survival rates were all changed in a positive manner (Table 3 and Figure 2). In the fasting group when pioglitazone was added to ketone containing medium (FKP), lactate and LDH levels were significantly lower than the F and FK group. Additionally neurons used ketones more efficiently in the presence of PPAR γ agonist (Table 3). These findings made us think that, when pioglitazone added to the media, neurons might have used their mitochondria more efficiently (Figure 3). So we have conducted an other study with citrate synthase activity of the cells. Since citrate synthase is the first enzyme of Krebs cycle which takes place only in the mitochondrial matrix, activity measurements of citrate synthase in a cell homogenate, is accepted to show the mitochondrial capacity of a cellular community [14]. Growing evidence suggests the involvement of mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of many major neurodegenerative and neuroinflammatory disorders. This dysfunction is associated with defects in mitophagy, bioenergetics, mitochondrial functions such as electron transport chain activity reductions and increased mitochondrial-generated oxidative stress [2]. Therefore, pharmacological approaches to enhance mitochondrial function, reduce reactive oxygen species (ROS) or enhance antioxidant defence are essential for the new therapeutic approaches to neurodegenerative and neuroinflammatory diseases.

It is shown that, knockout of PPAR γ is embryonically lethal [15, 16]. Moreover, PPAR γ activation is associated with increased lipid and carbohydrate metabolism together with adipocyte differentiation and reduction of plasma glucose concentration [17]. PPAR γ agonists are currently in clinical use for the management of type 2 diabetes and pioglitazone, one of the most frequently used PPAR γ agonists, was also been proven to have anti-inflammatory effects by PPAR γ activation and regulating myelin gene expression in brain cells [18]. It is known that, PPAR γ is expressed in different parts of brain. High levels of expression of PPAR γ have been found in discrete areas of the central nervous system (CNS), including the dopaminergic cells in the basal ganglia [19, 20]. PPAR γ is also thought to regulate inflammatory response by suppressing the expression of more than one proinflammatory genes [21]. Moreover it is shown that inhibiting mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway with PPAR γ agonists had an anti-inflammatory effect on status epilepticus models in rats [22]. mTOR pathway inhibition is one of the major mechanisms of fasting in humans leading to ketogenesis [23].

In the present study, we have showed positive effects of PPAR γ agonist on neuron survival, energy metabolism and mitochondrial functions which were enhanced with ketone body (β OHB) presence in the media. Changes in

mitochondrial functions and survival rates had been studied with PPAR γ agonists, pioglitazone and rosiglitazone on differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cells before [24]. Miglio et al. [24] showed PPAR γ agonists promoted biogenesis of mitochondria in glucose deprived neurons while did not significantly change mitochondrial membrane potential. However, to our knowledge this is the first study showing positive effects of pioglitazone on neurons can be synergistically increased by ketones.

Ketone body supply and metabolism is essential in the brain. Ketolysis accounts for 70% of the energy supply during prolonged fasting (the majority is from β OHB), and the rest, comes from glucose derived from different sources: glycerol, amino acids, lactate and pyruvate catabolism [23]. Apart from their roles in the fasting metabolism, more recently, ketone bodies have been shown to have direct signaling capabilities [1]. There are multiple mechanisms through which ketone bodies have been thought to affect cellular signaling by modulating the activity of histone deacetylases (HDACs) [2, 23]. Ketone bodies, particularly β OHB, also shown to have anti-inflammatory effects by reducing inflammatory cytokine production, which may further limit neuronal cell loss and facilitate tissue regeneration following injury. With these aforementioned findings and in the light of our results we can suggest that PPAR γ agonists and ketones may act synergistically in neuron protection. It has been shown that PPAR γ agonist (pioglitazone) treated rats had increased β -oxidation [25] which can enhance ketogenesis explaining the synergistic effects of these two on neuron protection.

There are certain limitations of this study. The present study is performed in secondary cell cultures with neuroblastoma cells which can have some differences in the regulation of metabolic pathways hence our results must be confirmed by primary neuron culture studies. Second limitation is, we have used β OHB as key ketone body in the treatments and did not test acetoacetate which is another ketone body synthesized by the liver. Another limitation is although it is shown that pioglitazone as the main molecule affects the metabolism, its metabolite hydroxypioglitazone is shown to be effective *in vivo* [25]. We have not tested its effects in the experiments. Finally mitochondrial functions were measured with metabolic parameters and citrate synthase activity in the present study that need to be confirmed with other investigations such as flowcytometric membrane potential analysis.

However, PPAR γ agonist addition to glucose deprived and ketone added (fasting model applied) neurons caused positive improvements with metabolic parameters, mitochondrial functions, and survival rates. Changes in mitochondrial citrate synthase activity, lactate and LDH

levels of neuronal cells treated with PPAR γ and β OHB have not been previously pointed out in the literature. Based on all these findings; we can conclude that improvements in neuron damage were recorded after pioglitazone (PPAR γ agonist) treatment especially in the presence of ketones. We suggest that the PPAR γ agonists in fasting states show significant promise as therapeutic agents in neurological diseases and repositioning of pioglitazone may be a new approach for the treatment of neurodegenerative diseases. However, the role of pioglitazone in the treatment of neurodegenerative diseases and the integration with ketones should be further investigated by functional genetic pathway analysis and clinical studies.

Competing interests: The authors have no conflict of interest.

References

- McNally MA, Hartman AL. Ketone bodies in epilepsy. *J Neurochem* 2012;121:28–35.
- Corona JC, Duchon MR. PPAR γ as a therapeutic target to rescue mitochondrial function in neurological disease. *Free Radic Biol Med* 2016;100:153–63.
- Tyagi S, Gupta P, Saini AS, Kaushal C, Sharma S. The peroxisome proliferator-activated receptor: a family of nuclear receptors role in various diseases. *J Adv Pharm Technol Res* 2011;2:236–40.
- Sikder K, Shukla SK, Patel N, Singh H, Rafiq K. High fat diet upregulates fatty acid oxidation and ketogenesis via intervention of PPAR- γ . *Cell Physiol Biochem* 2018;48:1317–31.
- Corona JC, Souza SC, Duchon MR. PPAR γ activation rescues mitochondrial function from inhibition of complex I and loss of PINK. *Exp Neurol* 2014;253:16–27.
- Tashiro K, Kawabata K, Sakurai H, Kurachi S, Sakurai F, Yamanishi K, et al. Efficient adenovirus vector-mediated PPAR gamma gene transfer into mouse embryoid bodies promotes adipocyte differentiation. *J Gene Med* 2008;10:498–507.
- Nicholson AC. Expression of CD36 in macrophages and atherosclerosis: the role of lipid regulation of PPARgamma signaling. *Trends Cardiovasc Med* 2004;14:8–12.
- Rosenson RS. Effects of peroxisome proliferator-activated receptors on lipoprotein metabolism and glucose control in type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2007;99:96B–104B.
- Cawthorn WP, Sethi JK. TNF- α and adipocyte biology. *FEBS Lett* 2008;582:117–31.
- Zeissler ML, Eastwood J, McCorry K, Hanemann CO, Zajicek JP, Carroll CB. Delta-9-tetrahydrocannabinol protects against MPP+ toxicity in SH-SY5Y cells by restoring proteins involved in mitochondrial biogenesis. *Oncotarget* 2016;7:27.
- Rao KRK, Prasad ASR. A factorial study on the formulation and evaluation of pioglitazone controlled release matrix tablets. *Int J Drug Dev Res* 2013;5:432–8.
- Chan FK, Moriwaki K, De Rosa MJ. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase (LDH) activity. *Methods Mol Biol* 2014; 979:65–70.

13. Wu M, Lao Y, Xu N, Wang X, Tan H, Fu W, et al. Guttaferone K induces autophagy and sensitizes cancer cells to nutrient stress-induced cell death. *Phytomedicine* 2015;22:902–10.
14. Hughes SD, Kanabus M, Anderson G, Hargreaves IP, Rutherford T, Donnell MO, et al. The ketogenic diet component deconic acid increases mitochondrial citrate synthase and complex I activity in neuronal cells. *J Neurochem* 2014;129:426–33.
15. Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, et al. PPAR γ is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 1999;4:585–95.
16. Semple RK, Chatterjee VKK, O'Rahilly S. PPAR γ and human metabolic disease. *J Clin Invest* 2006;116:581–9.
17. Evans RM, Barish GD, Wang YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med* 2004;10:355–61.
18. Saluja I, Granneman JG, Skoff RP. PPAR delta agonists stimulate oligodendrocyte differentiation in tissue culture. *Glia* 2001;33:191–204.
19. Cullingford TE, Bhakoo K, Peuchen S, Dolphin CT, Patel R, Clark JB. Distribution of mRNAs encoding the peroxisome proliferator-activated receptor α , β , and γ and the retinoid X receptor α , β , and γ in rat central nervous system. *J Neurochem* 1998;70:1366–75.
20. Moreno S, Farioli-Vecchioli S, Cerù MP. Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid x receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience* 2004;123:131–45.
21. Nagy ZS, Czimmerer Z, Szanto A, Nagy L. Pro-inflammatory cytokines negatively regulate PPAR mediated gene expression in both human and murine macrophages via multiple mechanisms. *Immunobiology* 2013;218:1336–44.
22. San YZ, Liu Y, Zhang Y, Shi PP, Zhu YL. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist inhibits the mammalian target of rapamycin signaling pathway and has a protective effect in a rat model of status epilepticus. *Mol Med Rep* 2015;12:1877–83.
23. Garabacka M, Pierzchalska M, Dean M, Reiss K. Regulation of ketone body metabolism and the role of PPAR α . *Int J Mol Sci* 2016;17:2093.
24. Miglio G, Rosa AC, Rattazzi L, Collino M, Lombardi G, Fantozzi R. PPAR γ stimulation promotes mitochondrial biogenesis and prevents glucose deprivation-induced neuronal cell loss. *Neurochem Int* 2009;55:496–504.
25. Jönsson TJ, Schafer H-L, Herling AW, Brönstrup M. A metabolome-wide characterization of the diabetic phenotype in ZDF rats and its reversal by pioglitazone. *PLoS ONE* 2018;13:e0207210.

9 ÖZGEÇMİŞ



