



**C1Q VE KOMPLEMAN DÜZENLEYİCİ PROTEİN CD59'UN HİPERGLİSEMİ
KOŞULLARINDA SH-SY5Y HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ayşe Başak ENGİN

**DOKTORA TEZİ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

MAYIS 2015

Ayşe Başak ENGİN tarafından hazırlanan “C1q ve kompleman düzenleyici protein CD59'un hiperglisemi koşullarında SH-SY5Y hücre canlılığı üzerine etkisinin araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile Gazi Üniversitesi İmmünoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Resul KARAKUŞ

İmmünoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Başkan : Prof. Dr. Vedat BULUT

İmmünoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Üye : Prof. Dr. Hüseyin TUTKAK

İmmünoloji ve Allerji Hastalıkları Bilim Dalı, Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Üye : Prof. Dr. Dicle GÜÇ

Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Bilim Dalı, Temel Onkoloji Anabilim Dalı,
Hacettepe Üniversitesi, Kanser Enstitüsü

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Üye : Prof. Dr. Ayşegül ATAĞ YÜCEL

İmmünoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Tez Savunma Tarihi: 11 / 05 / 2015

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Doç. Dr. Ufuk KOCA ÇALIŞKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
 - Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
 - Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,
- bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Ayşe Başak ENGİN

11 Mayıs 2015

**C1Q VE KOMPLEMAN DÜZENLEYİCİ PROTEİN CD59'UN HİPERGLİSEMİ KOŞULLARINDA
SH-SY5Y HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi

Ayşe Başak ENGİN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mayıs 2015

ÖZET

Dopaminerjik nöronlarda yüksek glukoz maruziyet ve insülin direnci nedeni ile meydana gelen ilerleyici nöron hasarında N-metil-d-aspartat (NMDA) reseptör ve nöronal nitrik oksit sentaz aracılı oksidatif stresin azaltılmasının nöron ölümünü önleyip önlemediği bilinmemektedir. Bu çalışmanın amacı, Uluslararası Diyabet Federasyonu ölçütlerine göre yüksek glukoz maruz kalan dopaminerjik nöronlarda glukotoksisite ve insülin direnci ile ortaya çıkan oksidatif stresin sonuçlarını incelemektir. Bu bağlamda nöronal mitokondrial disfonksiyona ve bunun kompleman sistemine yansımaya, NMDA reseptör blokajı ve nöronal nitrik oksit sentaz inhibisyonunun etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada SH-SY5Y insan nöroblastoma dopaminerjik hücreleri 150, 200, 250mg/dL glukoz bulunan ortamda insülin, NMDA reseptör antagonisti; kinürenik asit ve nöronal nitrik oksit sentaz inhibitörü; Nω-nitro-L-arginin metilester (L-NAME)'e maruz bırakılmıştır. İki hücre siklusunda oksidatif stres, total mitokondrial metabolik aktivite/hücre canlılığı (MTT), nitrik oksit, glukoz transporter 3 (GLUT3), kompleman bileşeni 1q (C1q) ve kompleman düzenleyici protein 59 (CD59) ölçülmüştür. Yüksek glukoz maruz kalan nöronlarda glukoz transportunun iki kat arttığı, ikinci hücre siklusunda hücre canlılığında azalmanın, oksidatif stres ve mitokondrial fonksiyon kaybı ile birlikte olduğu, insülin direncinin mitokondrial disfonksiyon ve nöron ölümünü hızlandırdığı tespit edilmiştir. Yüksek glukozla NMDA reseptör-aracılı olarak meydana gelen reaktif nitrojen radikallerine dayalı oksidatif strese, SH-SY5Y hücreleri tarafından sentezlenen C1q'nun doğrudan katkısı olduğu, C1q ve CD59 konsantrasyonlarındaki değişikliğin nitrik oksit düzeyleri ile ilişkili olduğu anlaşılmıştır. Elde edilen sonuçlar endojen bir NMDA reseptör antagonisti olan kinürenik asitin oksidatif stresin ve mitokondrial disfonksiyonun azaltılması, insülin direncinin düzeltilmesinde L-NAME'e göre daha başarılı olduğu tespit edilmiştir.

Bilim Kodu : 1067

Anahtar Kelimeler : Diyabet, dopaminerjik nöron, insülin direnci, oksidatif stress, C1q, CD59, L-NAME, kinürenik asit

Sayfa Adedi : 181

Danışman : Doç. Dr. Resul KARAKUŞ

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF C1Q AND COMPLEMENT REGULATORY PROTEIN CD59
ON THE SH-SY5Y CELL VIABILITY IN HYPERGLYCEMIC CONDITIONS

PH. D. Thesis

Ayşe Başak ENGİN

GAZİ UNIVERSITY

INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

May 2015

ABSTRACT

It is still not known whether reducing N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor and neuronal nitric oxide synthase-mediated oxidative stress might prevent the neuronal death caused by progressive damage of the dopaminergic neurons via exposure to high glucose and insulin resistance. The aim of this study was to investigate the effect of NMDA receptor blockage and/or inhibition of neuronal nitric oxide synthase on mitochondrial function and complement system. Dopaminergic neurons were exposed to insulin and high glucose according to the International Diabetes Federation criteria, and associated oxidative stress came up due to glucotoxicity and insulin resistance. SH-SY5Y human neuroblastoma dopaminergic cells were exposed to insulin, endogenous NMDA receptor antagonist; kynurenic acid and neuronal nitric oxide synthase inhibitor; N ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) in cell culture media containing 150, 200, 250 mg/dL glucose. Oxidative stress, total mitochondrial metabolic activity/cell viability (MTT), nitric oxide, GLUT3, C1q and CD59 were measured at two cell cycles. In high glucose exposed neurons; glucose transport was increased by two fold, decrease in cell viability in the second cell cycle was associated with oxidative stress and loss of the mitochondrial function, insulin resistance exacerbated mitochondrial dysfunction and accelerated the neuronal cell death. C1q was found to directly contribute to the oxidative stress, originated from the reactive nitrogen radicals produced by glucose via NMDA receptors. Alteration in C1q and CD59 concentrations were related to the nitric oxide levels. These results indicated that kynurenic acid was more successful than L-NAME in suppressing the oxidative stress, decreasing mitochondrial dysfunction and ameliorating the insulin resistance.

Science Code : 1067

Key Words : Diabetes, dopaminergic neuron, insulin resistance, oxidative stress, C1q, CD59, L-NAME, kynurenic acid

Page Number : 181

Supervisor : Assoc. Prof. Resul KARAKUŞ, M.D., Ph.D.

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleşebilmesi için bana güvenen ve destek olan tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Resul KARAKUŞ'a en derin saygı ve teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Yeni bakış açısı ve donanım kazanmamı sağlayan bilgileri ve yardımlarıyla her zaman desteklerini hissettiğim Sayın Prof. Dr. Vedat BULUT'a ve Prof. Dr. Cemalettin AYBAY'a en derin saygı ve teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Tezimin yapılması aşamasında bütün bilgi ve enerjisini hiç bir zaman esirgemeyen her zaman en büyük destekçim olan babam ve hocam, Sayın Prof. Dr. Atilla ENGİN'e en kalpten sevgi ve saygılarımla teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca laboratuvar olanaklarını, tezimin her aşamasında, takıldığım her noktada sabırla bilgilerini ve enerjisini paylaşan ağabeyim, Sayın Yrd. Doç. Dr. Evren Doruk ENGİN'e sevgi ve saygılarımla teşekkür ederim.

Ayrıca, bütün çalışmalarım boyunca bana her şekilde destek olan, inanan ve hiç bir fedakarlıktan kaçınmayan ve sonsuz sabıra sahip olan anneme en kalpten sevgilerimle teşekkür ederim.

İmmünoloji eğitimim boyunca destek olan Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İmmünoloji Anabilim Dalı'ndaki bütün hocalarım ve arkadaşlarıma teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xii
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Kan glukozu ve protein glikasyonu.....	6
2.2. Yüksek glukoz ve nöron hasarı.....	9
2.3. Yüksek glukoz düzeyi ve nörodejeneratif hastalıklar.....	11
2.4. Yüksek glukoz ve glutamaterjik uyarı.....	12
2.5. Kinürenik asit.....	20
2.6. Nöron ve nitrik oksit.....	21
2.7. Mitokondrial oksidatif stres ve nöron hasarı.....	26
2.8. Kompleman bileşeni 1 q ve nöron hasarı.....	29
2.9. Kompleman düzenleyici protein 59 ve membran atak kompleksi oluşumu.	32
2.10. İnsülin ve nöron.....	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	37
3.1. Hücre Kültürü Şartları.....	37

	Sayfa
3.1.1. Deneylerde kullanılan cihazlar.....	37
3.1.2. Deneylerde kullanılan kimyasallar.....	37
3.2. Deney Planı.....	38
3.2.1. Glukoz.....	39
3.2.2. İnsülin.....	40
3.2.3. Kinürenik asit.....	40
3.2.4. Nw -nitro-L-arginin metil ester.....	40
3.2.5. Deneyler.....	41
3.3. Hücre Canlılığı Tayini.....	42
3.3.1. MTT deneyinde kullanılan alet ve gereçler.....	42
3.3.2. MTT deneyinde kullanılan çözeltiler.....	43
3.3.3. MTT deney protokolü.....	43
3.4. Tripan Mavisi ile Hücre Sayılması.....	44
3.5. Nitrit-Nitrat, Kompleman Bileşenleri ve Glukoz taşıyıcı 3 Tayinleri.....	44
3.5.1. Nitrit – nitrat tayini.....	44
3.5.2. Kompleman bileşeni 1q tayini.....	47
3.5.3. Kompleman düzenleyici protein 59 tayini.....	48
3.5.4. Glukoz taşıyıcı 3 tayini.....	49
3.6. İstatistiksel Analiz.....	51
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	53
4.1. Hücre Canlılığındaki Değişimlerin Değerlendirilmesi.....	53
4.1.1. Glukoz.....	53

	Sayfa
4.1.2. Glukoz ve insülin.....	54
4.1.3. Glukoz ve kinürenik asit.....	57
4.1.4. Glukoz ve N ω -nitro-L-arginin metil ester.....	60
4.2. Yüksek Konsantrasyonda Glukoza Maruziyet ve Nitrik Oksit.....	63
4.2.1. Yüksek glukoz uyarısına SH-SY5Y hücrelerin glukoz taşıyıcı 3 ve nitrik oksit cevabına insülin ve kinürenik asitin etkisi.....	69
4.2.2. Yüksek glukoz uyarısı ve N ω -nitro-L-arginin metil ester.....	75
4.2.3. Yüksek glukoz uyarısı ve kinürenik asit.....	83
4.2.4. Yüksek glukoz uyarısı ve kompleman bileşeni 1q.....	90
4.2.5. Yüksek glukoz uyarısı ve kompleman düzenleyici protein 59.....	99
5. TARTIŞMA.....	107
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	141
KAYNAKLAR.....	143
ÖZGEÇMİŞ.....	177

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.1. SH-SY5Y hücrelerinin bulunduğu ortama 150, 200 ve 250mg/dL yüksek konsantrasyonda glukoz ilavesi ile 40µU/ml insülin, 30nM KynA veya 25µM L-NAME ilave edildiğinde ilk ve ikinci 24 saatte MTT, Q, NO ve GLUT3/Cc düzeylerinin karşılaştırılması.....	63
Çizelge 4.2. SH-SY5Y hücre kültürü ortamında 150, 200, 250 mg/dl yüksek konsantrasyonda glukoz bulunduğunda insülin, KynA, L-NAME) ilavesi ile ölçülen Q, GLUT3/Cc, MTT ve NO düzeylerinin ortalama değerlerinin, ortalama Q (glukoz), GLUT3 (glukoz), MTT (glukoz) ve NO (glukoz) değerlerine göre değişimi.....	66
Çizelge 4.3. SH-SY5Y hücre kültürü ortamına 150, 200 ve 250 mg/dL yüksek konsantrasyonda glukoz ilavesi ile ilk ve ikinci hücre siklusunda ölçülen ortalama MTT, Q, GLUT3/Cc ve NO düzeylerinin, kontrol grubu değerlerine göre değişim oranları.....	69
Çizelge 4.4. SH-SY5Y hücre kültürü ortamında glukoz+insülin, glukoz+KynA ve glukoz+ L-NAME ilavesi ile ölçülen Q, GLUT3/Cc ve NO ortalama değerlerinin, ikinci 24 saatte ilk 24 saate göre değişim oranları.....	74
Çizelge 4.5. SH-SY5Y hücrelerinin bulunduğu ortama 25µM, 100µM, 1000µM L-NAME'e 150, 200 ve 250mg/dL yüksek konsantrasyonda glukoz ve 40µU/ml insülin ilave edildikten 24. ve 48. saatte MTT ve Q düzeyleri.....	76
Çizelge 4.6. SH-SY5Y hücrelerinin bulunduğu ortama 25µM, 100µM, 1000µM L-NAME'e 150, 200 ve 250mg/dL yüksek konsantrasyonda glukoz ve 40 µU/ml insülin ilave edildikten 24. ve 48. saatte ortalama MTT ile ortalama Q ve NO değişim oranları.....	77
Çizelge 4.7. SH-SY5Y hücrelerinin bulunduğu ortama 25µM, 100µM, 1000µM L-NAME'e 150, 200 ve 250mg/dL yüksek konsantrasyonda glukoz ve 40µU/ml insülin ilave edildikten sonra ortalama yüksek glukoz konsantrasyonuna göre ortalama MTT, ile ortalama Q ve NO değişim oranları.....	78
Çizelge 4.8. SH-SY5Y hücre kültürü ortamında 150, 200, 250mg/dL yüksek konsantrasyonda glukoz bulunduğunda insülin, KynA ve L-NAME ilavesi ile ölçülen Q, GLUT3/Cc, MTT ve NO düzeylerinin ortalama değerlerinin, ortalama Q (glukoz), GLUT3 (glukoz), MTT (glukoz) ve NO glukoz değerlerine göre değişimi.....	80

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.9. NMDA reseptör blokajı için KynA dozlarının karşılaştırılması.....	84
Çizelge 4.10. NMDA reseptör blokajı için 30 ve 300 nM KynA dozlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması.....	84
Çizelge 4.11. Kontrol grubu ve 150mg/dL, 200mg/dL ve 250mg/dL glukoz ilave edildikten sonra 40µU/ml insulin ve 30nM KynA ile 24 ve 48 saatte MTT, Q, NO, CD59 ve C1q cevabı.....	88
Çizelge 4.12. Kontrol grubu ve 150mg/dL, 200mg/dL ve 250mg/dL glukoz ilave edildikten sonra, 40µU/ml insülin ve 30nM Kyn ile 24 ve 48 saatte C1q, nitrik oksit ve total mitokondrial metabolik aktivite/hücre canlılığı cevabı.....	91
Çizelge 4.13. SH-SY5Y hücre kültürü ortamına 150, 200 ve 250mg/dL yüksek konsantrasyonda glukoz ilavesi ile ilk ve ikinci hücre siklusunda ölçülen ortalama Q, CD59/Cc, C1q/Med/Cc ve NO düzeylerinin kontrollara göre değişimi.....	92
Çizelge 4.14. SH-SY5Y hücre kültürü ortamında glukoz+insülin, glukoz+ KynA ve glukoz+ L-NAME ilavesi ile ölçülen Q, MTT, C1q ve NO ortalama değerlerinin, ikinci 24 saatte ilk 24 saata göre değişim oranları.....	95
Çizelge 4.15. SH-SY5Y hücre kültürü ortamında glukoz+insülin, glukoz+kinürenik asit KynA ve glukoz+ L-NAME ilavesi ile ölçülen Q ve C1q ortalama değerlerinin, ortamda yüksek konsantrasyonda glukoz bulunduğunda elde edilen ortalama Q (glukoz), ve C1q (glukoz) değerlerine göre değişimi.....	97
Çizelge 4.16. SH-SY5Y hücre kültürü ortamında glukoz+insülin, glukoz+ KynA ve glukoz+ L-NAME ilavesi ile ölçülen Q, CD59, C1q ve NO ortalama değerlerinin, ikinci 24 saatte ilk 24 saata göre değişim oranları.....	100
Çizelge 4.17. SH-SY5Y hücre kültürü ortamında glukoz+insülin, glukoz+ KynA ve glukoz+ L-NAME ilavesi ile ölçülen Q, CD59 ve C1q ortalama değerlerinin, ortamda yüksek konsantrasyonda glukoz bulunduğunda elde edilen ortalama Q (glukoz), CD59 (glukoz) ve C1q (glukoz) değerlerine göre değişimi.....	105

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil		Sayfa
Şekil 2.1.	SH-SY5Y dopaminerjik nöron hücresinde yüksek glukoz maruziyeti ile meydana gelen olası glutamaterjik uyarı ve mitokondrial oksidatif stres.....	14
Şekil 2.2.	SH-SY5Y dopaminerjik nöron hücresinde ekstrasinaptik NMDA reseptör-GluN2B aracılı olası glukoz uyarısı.....	21
Şekil 3.1.	MTT deneyinin esası.....	42
Şekil 4.1.	Farklı glukoz konsantrasyonlarına maruz bırakılan hücrelerin farklı inkübasyon süreleri sonunda canlılıklarındaki değişim.....	53
Şekil 4.2.	Farklı dozlarda insüline maruz bırakılan hücrelerin farklı inkübasyon süreleri sonunda canlılıklarındaki değişim.....	54
Şekil 4.3.	10 µU/ml insülin ve farklı glukoz konsantrasyonlarına maruz bırakılan hücrelerin farklı inkübasyon süreleri sonunda canlılıklarındaki değişim.....	55
Şekil 4.4.	40 µU/ml insülin ve farklı glukoz konsantrasyonlarına maruz bırakılan hücrelerin farklı inkübasyon süreleri sonunda canlılıklarındaki değişim.....	55
Şekil 4.5.	60 µU/ml insülin ve farklı glukoz konsantrasyonlarına maruz bırakılan hücrelerin farklı inkübasyon süreleri sonunda canlılıklarındaki değişim.....	56
Şekil 4.6.	Farklı konsantrasyonlarda kinürenik asit ve glukoz maruz bırakılan hücrelerin 24 saat inkübasyon süresi sonunda canlılıklarındaki değişim.....	58
Şekil 4.7.	Farklı konsantrasyonlarda kinürenik asit ve glukoz maruz bırakılan hücrelerin 48 saat inkübasyon süresi sonunda canlılıklarındaki değişim.....	58
Şekil 4.8.	Farklı konsantrasyonlarda kinürenik asit, glukoz ve 40 µU/ml insüline maruz bırakılan hücrelerin 24 saat inkübasyon süresi sonunda canlılıklarındaki değişim.....	59
Şekil 4.9.	Farklı konsantrasyonlarda kinürenik asit, glukoz ve 40 µU/ml insüline maruz bırakılan hücrelerin 48 saat inkübasyon süresi sonunda canlılıklarındaki değişim.....	59

Şekil	Sayfa
Şekil 4.10. Farklı konsantrasyonlarına L-NAME ve glukoz maruz bırakılan hücrelerin 24 saat inkübasyon süresi sonunda canlılıklarındaki değişim.....	61
Şekil 4.11. Farklı konsantrasyonlarına L-NAME ve glukoz maruz bırakılan hücrelerin 48 saat inkübasyon süresi sonunda canlılıklarındaki değişim.....	61
Şekil 4.12. Farklı konsantrasyonlarına L-NAME, glukoz ve 40 µU/ml insüline maruz bırakılan hücrelerin 24 saat inkübasyon süresi sonunda canlılıklarındaki değişim.....	62
Şekil 4.13. Farklı konsantrasyonlarına L-NAME ve glukoz ve 40 µU/ml insüline maruz bırakılan hücrelerin 48 saat inkübasyon süresi sonunda canlılıklarındaki değişim.....	62
Şekil 4.14. 150 mg/dl (a) – 200 mg/dl (b) – 250 mg/dl (c) glukoz ve/veya 40 µU/ml insülin ve/veya 30 nM KynA ve/veya 25 µM L-NAME ile MTT/Cc ve Q değişimleri.....	67
Şekil 4.15. 150 mg/dl (a) – 200 mg/dl (b) – 250 mg/dl (c) glukoz ve/veya 40 µU/ml insülin ve/veya 30 nM KynA ve/veya 25 µM L-NAME ile GLUT3/Cc ve NO değişimleri.....	71
Şekil 4.16. Yüksek glukoz maruz kalan SH-SY5Y hücrelerinde 40 µU/ml insüline direnç	86
Şekil 4.17. 150 mg/dl (a) – 200 mg/dl (b) – 250 mg/dl (c) glukoz ve/veya 40 µU/ml insülin ve/veya 30 nM KynA ve/veya 25 µM L-NAME ile C1q ve NO değişimleri.....	93
Şekil 4.18. 150 mg/dl (a) – 200 mg/dl (b) – 250 mg/dl (c) glukoz ve/veya 40 µU/ml insülin ve/veya 30 nM KynA ve/veya 25 µM L-NAME ile C1q ve CD59 değişimleri.....	101
Şekil 5.1. SH-SY5Y dopaminerjik nöron hücrelerinde yüksek glukoz maruziyet ile meydana gelen mitokondrial oksidatif stresin KynA ve L-NAME ile kontrolü.....	128

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. (a) 120 mg/dl Glukoz (kontrol – medium), (b) 250 mg/dl Glukoz, (c) 250 mg/dl Glukoz + 40 µU/ml Insulin içeren besi yerlerinde 48 saat inkübe edilen SH-SY5Y hücreleri	57

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Kısaltmalar	Açıklama
3-NPA	3-Nitropropiyonik asit
3-PGK	3-fosfo gliserat kinaz
8-OHdG	8-Hidroksi deoksiguanozin
ADA	Amerikan Diyabet Derneği
AGE	İleri glikasyon son ürünleri
Akt	Protein kinaz B
AMP	Adenozin monofosfat
AMPA	Alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropiyonik asit
AMPK	Adenozin monofosfat ile aktive protein kinaz
AOAA	Aminooksiasetik asit
ApoA-1	Apolipoprotein
AsetilCoA	Asetil koenzim A
ATP	Adenozin trifosfat
C1q	Kompleman bileşeni 1q
C1qbp	Kompleman bileşeni 1q bağlayıcı protein
C1r	Kompleman bileşeni 1r
C1s	Kompleman bileşeni 1s
C4bBP	C4b bağlayıcı protein
Cc	Hücre sayısı
CD59	Kompleman düzenleyici protein 59
cGK	Siklik guanozin monofosfat kinaz
cGMP	Siklik guanozin monofosfat
CREB	Siklik adenozin monofosfat cevap elemanı bağlayıcı proteini
DAG	Diaçil gliserol

Kısaltmalar	Açıklama
EDTA	Etilen diamintetraasetik asit
eNOS	Endotelial nitrik oksit sentaz
ERK	Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz
FBS	Fötal sığır serumu
Fc	Kristalize olabilen fragmant
FDA	Gıda ve ilaç idaresi “Food and Drug Administration”
G3P	Gliseraldehit-3-fosfat
GABA	Gamma aminobütrik asit
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz
GluN	N-metil-d-aspartat reseptör alt ünitesi
GLUT3	Glukoz taşıyıcısı 3
GPI	Glikan fosfatidilinozitol
GPR35	G-protein ile birleşik reseptör 35
GPx	Glutasyon peroksidaz
GSH	Glutasyon
GSNO	S-nitrozoglutasyon
GSSG	Okside glutasyon
Hb	Hemoglobin
HbA1c	Hemoglobin A1c
IDF	Uluslararası Diyabet Federasyonu
IFN-gamma	İnterferon-gamma
IRS	İnsülin reseptör substrat
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
JNK	c-Jun N-terminal kinaz
KynA	Kinürenik asit
L-NAME	N ω -nitro-L-arginin metil ester
MAC	Membran atak kompleksi
MAPK	Mitojenle aktive olan protein kinaz
MGO	Metil glioksal

Kısaltmalar	Açıklama
MPP	1-metil-4-fenilpiridin
MPT	Mitokondrial geçirgenlik değişimi
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin
mtDNA	Mitokondrial DNA
mTOR	Memeli rapamisin hedefi (“mamalian target of rapamycin”)
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolyum bromid
NAC	N-asetil sistein
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid, indirgenmiş
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NED	N-(1-naftil) etildiamin
NMDA	N-metil-d-aspartat
nNOS	Nöronal nitrik oksit sentaz
NO	Nitrik oksit
NO₂	Nitrit
NO₃	Nitrat
NOS	Nitrik oksit sentaz
NOS1AP	Nitrik oksit sentaz 1 adaptör proteini
NOX2	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz 2
Ort	Ortalama
PAG	Fosfatla aktive glutaminaz
PBS	Fosfat tamponu
PFKFB3	6-fosfofrukto-2-kinaz/fruktoz-2,6-bifosfataz-3
PI3K	Fosfatidil inozitol-3-kinaz
PKC	Protein kinaz C
PKG	Protein kinaz G
PPP	Pentoz fosfat yolağı
PSD-95	Post sinaptik yoğunluk proteini-95
rADI	Rekombinant arginine deiminaz

Kısaltmalar	Açıklama
RNS	Reaktif nitrojen radikalleri
ROS	Reaktif oksijen radikalleri
SDS	Sodyum dodesil sülfat
sGC	Çözünebilir guanilil siklaz
SH	Standart hata
TCA	Trikarboksilik asit
$\alpha 7nAChR$	Alfa7-nikotinik asetilkolin reseptörü

1. GİRİŞ

Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF) tarafından yapılan en son tahminlere göre dünyada 2010 yılında 285 milyon olan diyabet hastası sayısı, 2030'da 438 milyona yükselecektir (Shaw, Sicree, ve Zimmet, 2010). Diyabetli hastalarda tanıdan sonraki ilk on yıl içinde kontrolsüz yüksek kan glukozu ve insülin direncine bağlı diyabetik nöropati gelişme riski yaklaşık %50'dir (Callaghan, Little, Feldman ve Hughes, 2012). Epidemiyolojik çalışmalar hiperglisemi, glukoz intoleransı ve insülin direncinin Alzheimer hastalığı görülme olasılığını 2-4 kat artırdığını göstermektedir. (Kopf ve Frölich, 2009; Cardoso ve diğerleri, 2013). Nöronların yüksek glukozla maruz kalmaları reaktif oksijen radikalleri (ROS)'nin oluşumunu hızlandırır ve N-metil-d-aspartat (NMDA) reseptör aktivasyonuna sebep olur. Sonuçta ortaya çıkan nitrik oksit sentaz (NOS) uyarısı ile aşırı nitrik oksit (NO) sentezi meydana gelir. ROS ve reaktif nitrojen radikalleri (RNS)'ne bağlı olarak gelişen oksidatif stres mitokondrial disfonksiyon ve nöronal apoptoza sebep olur (Braidy, Grant, Adams, Brew ve Guillemin, 2009; Russell ve diğerleri, 2002). Aslında düşük fizyolojik konsantrasyonlarda nöron koruyucu olmasına karşın, yüksek patolojik seviyelerde proteinlerin nitrozilasyonuna ve toksik peroksinitritlerin üretilmesi neden olan NO sentezinin inhibe edilmesinin yüksek glukozla ortaya çıkan nöron hasarını nasıl etkileyeceği bilinmemektedir.

Amerikan Diyabet Derneği ("The American Diabetes Association", ADA) ve IDF kriterlerine göre yüksek glukoz düzeylerine maruz kalan dopaminerjik nöronlarda oksidatif stres ve nöronal apoptozun meydana gelme mekanizması bilinmemektedir. NMDA reseptörleri nöron fonksiyonları için gerekli olduğundan NMDA reseptör aktivitesinin inhibe edilmesinin normal fizyolojik fonksiyonları da oradan kaldırma olasılığının bulunduğu ileri sürülmektedir (Vandame ve diğerleri, 2013). Bu nedenle tek endojen NMDA reseptör antagonisti olan kinürenik asit (KynA)'in yüksek glukozla maruz kalan ve insülin direnci meydana gelen dopaminerjik nöronlarda glukoz toksisitesine bağlı oksidatif stres, mitokondrial disfonksiyon ve nöronal apoptozu önleyip önleyemediği bilinmemektedir.

Son yıllarda diyabetin komplikasyonları ile kompleman sistemi arasında ilişki olduğunu düşündüren bulgular gündeme gelmiştir (Ghosh ve diğerleri, 2013). Mitokondrilerden kaynaklanan hücre ölümünün başlamasında en önemli nedenlerden biri de, mitokondrial porlarda permeabilite artması, adenosin trifosfat (ATP) sentezinin azalması ve ROS'nin oluşmasıdır (Halestrap, 2009; Baines, 2009;). Klasik kompleman yolağının ilk komponenti olan C1q'nun hücre yüzeyinde bağlandığı C1q bağlayıcı protein (C1qbp)'in porlarda permeabilite artışını inhibe ederek hücreyi oksidatif strese karşı koruduğu ileri sürülmektedir (McGee ve Baines, 2011). Bu olayda modülatör olarak rol oynayan C1q'nun yüksek glukoz karşı redoks-stres kaynaklı mitokondrial hasarı önleyip önleyemediği bilinmemektedir.

Bir membran atak kompleks (MAC) inhibitörü olan kompleman düzenleyici protein, "complement regulatory protein" 59 (CD59)'un yüksek glukozla bağlı oksidatif stress ile inhibe edildiğinde MAC oluşumuna bağlı doku hasarı geliştiği ileri sürülmüştür (Ghosh ve diğerleri, 2013). MAC oluşumu için gerekli olan klasik kompleman kaskadının majör komponentlerinden biri de C1q'dur. MAC oluşumu uyarıldığında, ortamda CD59 eksikliği varsa, nöronların kompleman-aracılı sitotoksositeye duyarlılığının arttığı bulunmuştur (Shen ve diğerleri, 1998). Nöronlarda C5b-8 kompleksinin C9'u hücre membranına yerleştirmesini inhibe ederek komplemanın sitolitik etkisini engelleyen CD59'un (Meri ve diğerleri, 1990) yüksek glukoz ve insülin direncine bağlı şiddetli oksidatif stres karşısında glikasyona uğrayıp uğramadığı bilinmemektedir. İnsülin kan-beyin bariyerini geçerek santral sinir sistemine girer ve insülin reseptörüne bağlanarak tirozin kinazı aktive eder. Nöronlara glukoz transportu insülinin bağımsız olmakla birlikte insülin sinyali nöronal fonksiyonlar için önemlidir (Schuh, Rieder, Rizzi, Chaves ve Roriz-Cruz, 2011). İnsülinin, nöronlarda primer glukoz taşıyıcısı olarak eksprese edilen glukoz taşıyıcısı 3 (GLUT3)'ün nöron plazma membranına translokasyonunu sağlayarak nöronal glukoz alımını düzenlediği ileri sürülmektedir (Uemura ve Greenlee, 2006). Ancak yüksek glukoz konsantrasyonuna maruz kalan nöronlarda insülinin GLUT3 translokasyon ve füzyonuna etkisi konusunda yeterli bilgi bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın amacı, ADA ve IDF ölçütlerine göre yüksek glukozla maruz kalan dopaminerjik nöronlarda glukotoksosite ve insülin direnci ile ortaya çıkan oksidatif strese

bağlı nöronal mitokondrial disfonksiyona ve bunun kompleman sistemine yansımına, NMDA reseptör blokajı ve nöronal NOS inhibisyonunun etkisini araştırmaktır. Bu çalışmada, insan beyninden saf dopaminerjik nöron kültürü elde edilmesi son derece zor olduğundan, dopaminerjik nöron araştırmalarında kullanılan SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattı kullanılmıştır (Xie, Hu ve Li, 2010). İnsan nöroblastoma hücrelerinin serumda klasik kompleman yolağını spontan olarak aktive etme kapasitesine sahip oldukları ve bu hücrelerin, membran kofaktör protein kompleman inhibitörlerini ve CD59'u eksprese edebildiği gösterilmiştir (Gasque, Thomas, Fontaine, Morgan, 1996). SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleri, 150, 200, 250mg/dL glukoz bulunan ortamda insülin, NMDA reseptör antagonisti; KynA ve nöronal NOS inhibitörü; N ω -nitro-L-arginin metil ester (L-NAME)'e maruz bırakılarak iki hücre siklusunda oksidatif stres, total mitokondrial metabolik aktivite/hücre canlılığı (MTT), NO, GLUT3, C1q ve CD59 ölçülmüştür.

Bu çalışmanın amacı; yüksek glukozla maruz kalan nöronlarda glutamaterjik uyarı, mitokondrial oksidatif stres, MAC-kompleman düzenleyici protein dengesi ve insülin-sinyal iletiminde bozulma gibi çeşitli sebeplerle ortaya çıkan hasarda başlatıcı faktör olarak düşündüğümüz NMDA reseptör uyarısının, bu reseptörün kompetitif antagonisti olan KynA ile engellenip engellenemeyeceğini ortaya koymaktır. Elde edilecek verilerin, yüksek glukoz konsantrasyonları karşısında insülin direnci ile meydana gelecek nöronal hasarın kontrolunda bir triptofan metaboliti olan KynA'le yapılacak klinik çalışmaların planlanmasına ve yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesine katkıda bulunması beklenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

Onsekiz ile 79 yaş arasındaki insanların %7,2'sine diyabet tanısı konulmaktadır (Rathmann, Scheidt-Nave, Roden ve Herder, 2013). Diyabetin yaygınlığı, dünyada gittikçe büyüyen bir toplumsal sorundur. Yaşam beklentisinin azalmasına, komplikasyonların ise artmasına sebep olmaktadır (Colagiuri, Cull ve Holman, 2002). Uluslararası diyabet federasyonu tarafından yapılan en son tahminlere göre dünyada 2010 yılında 285 milyon olan diyabet hastası sayısı, 2030'da 438 milyona yükselecektir (Shaw, Sicree ve Zimmet, 2010). Diyabet 21.yüzyılda halk sağlığını tehdit eden en büyük sorunlardan biridir (Dixon, Zimmet, Alberti ve Rubino, 2011). Diyabetin ADA tarafından önerilen güncel tanı kriterleri; klasik hiperglisemi belirtileri gösteren veya hiperglisemik krizler gelişen ve randomize olarak plazma glukoz düzeyi 200 mg/dl (11,1 mM)'dan yüksek olan hastalarda, glikasyona uğramış hemoglobinin %6,5'dan fazla, açlık plazma glukoz düzeyinin 126 mg/dl (7,0 mM)'den yüksek ve oral glukoz tolerans testi esnasında ikinci saattaki plazma glukoz düzeyinin ise 200 mg/dl (11,1 mM)'dan yüksek olmasıdır (Alqahtani, Khan, Alhumaidi ve Ahmed, 2013). Diyabetik hastalarda kan glukoz düzeyinin sürekli izlenmesi ve hiperglisemi tedavi yöntemlerindeki gelişmelere rağmen, diyabet komplikasyonları hala önemli bir sorun olmaya devam etmektedir (Ceriello, Ihnat ve Thorpe, 2009). Hiperglisemi krizi ve hiperozmolar ketoasidoz, kontrolsüz "diabetes mellitus"un metabolik komplikasyonları olup, organizmada ciddi hasara veya mortaliteye sebep olabilmektedir. Hiperglisemi prevalansında yükselme ve sağlık harcamalarında sebep olduğu artış, halen bütün dünyada önemini ve güncelliğini korumaktadır (Van Ness-Otunnu ve Hack, 2013; Steenkamp, Alexanian ve McDonnell, 2013).

Çok sayıda epidemiyolojik çalışma, diyabetli hastada nörodejeneratif hastalıklar, özellikle de Alzheimer hastalığının gelişme riskinin yüksek olduğunu göstermektedir (Kopf ve Frolich, 2009; Maher ve Schubert, 2009). Rotterdam çalışması, diyabetin demans ve Alzheimer hastalığı riskini iki misline çıkardığını ortaya koymuştur. Ancak diyabetin Alzheimer hastalığının gelişme riskini artırma mekanizması iyi bilinmemektedir. (Ott ve diğerleri, 1999). Japonya'da yapılan bir dizi araştırma içinde yer alan Hisayama çalışması, hiperglisemi ve glukoz intoleransının Alzheimer hastalığı görülme olasılığını 2-4 kat

artırdığını göstermektedir. Buna ilaveten on dört ayrı çalışmanın gözden geçirildiği bir meta-analizde de diyabetin Alzheimer hastalığı riskini artırdığı kanıtlanmıştır (Kopf ve Frolich, 2009). Aslında tip 2 diyabetli hastalarda tanıdan sonraki ilk on yıl içinde hiperglisemiye bağlı diyabetik nöropati gelişme riski yaklaşık %50'dir (Callaghan ve diğerleri, 2012). Nöron hasarında etkili olan çok sayıda faktör ileri sürülmüş, ancak bu faktörlerin eş zamanlı olarak ortaya çıkması nedeni ile hangisine karşı alınacak önlemlerin nöron hasar kontrolunda öncelikli olduğu bilinmemektedir.

Nörodejeneratif hasarın ilerlemesinde önemli bir faktör olan tip 2 diyabet, aslında kronik hiperglisemi ve insülin etkisinin eksikliğine bağlı metabolik sorunlarla karakterize heterojen etiyolojili hastalıklar grubudur. Uzun süren kontrolsüz hiperglisemiden sonra diyabetin retinopati, nefropati ve nöropati gibi özel komplikasyonları ortaya çıkar ve ateroskleroz hızlanır. Diyabet, metabolik bozuklukların şiddetine göre asemptomatik olabildiği gibi ketoasidoz ve komaya kadar giden belirtilerle birlikte de görülebilir.

Diyabetin etiyolojik sınıflandırılması ve patofizyolojinin evrelendirilmesi insülin etkisinin eksikliği dikkate alınarak yapılır; Tip 1: Pankreatik hücrelerin otoimmün mekanizma veya bilinmeyen bir sebeple harabiyete uğraması ile karakterizedir. Tip 2: İnsülin salgısının ve insüline duyarlılığın azalması (insülin direnci) ile karakterizedir. Tip 3: İki ayrı alt-grubu içerir; alt-grup A, genetik yatkınlığa sebep olan özel mutasyonlar sonucu görülür, alt-grup B diğer hastalıklarla birlikte görülen diyabet grubudur.

Diyabette glukoz metabolizması; normal, sınır olgular ve diyabetik evre olmak üzere üç aşamada değerlendirilir. Diyabetik evreler; 1. Glisemik kontrol için insüline gerek göstermeyen, 2. Glisemik kontrol için insüline gerek gösteren ve 3. Yaşam için insülin-bağımlı olmak üzere üç aşamadır.

2.1. Kan glukozu ve protein glikasyonu

Kronik hipergliseminin kanıtlanması "diabetes mellitus" tanısı için bir ön şarttır. Kan glukoz düzeyi üç kategoride dikkate alınır. 1. Diyabetik tip: Açlık glukoz konsantrasyonunun 126 mg/dl veya daha yüksek ve/veya 75 g glukoz verilmesinden iki

saat sonra serum glukoz düzeyinin 200 mg/dl veya daha yüksek olmasıdır. 2. Herhangi bir zamanda elde edilen serum glukoz değerinin 200 mg/dl olması diyabetik tip glukoz konsantrasyonunu gösterir. 3. Normal glukoz konsantrasyonu; açlık plazma glukozunun 110mg/dl'nin altında olması veya 75 g glukoz verilmesinden iki saat sonra 140 mg/dl'nin altında olmasıdır (Kuzuya ve diğerleri, 2002). Farklı günlerde iki veya daha fazla diyabetik tip hiperglisemi tespit edilmesi "diabetes mellitus" olarak yorumlanır. Ayrıca, "diabetes mellitus"un tipik belirtilerinin olması, glikasyona uğramış hemoglobin (HbA1c)'nin %6,5 veya üzeri olması, diyabetik retinopatinin bulunması gibi koşullardan birinin bulunmasına ilaveten bir kez diyabetik tip plazma glukoz değerinin tespiti diyabet olarak değerlendirilir. Diyabetin yukarıda belirtilen tipik belirtilerinin veya evvelce HbA1c'nin %6,5 ve üzeri olması halinde plazma glukoz değeri "diyabetik tip" düzeyine erişmiş olmasa bile şüpheli diyabet veya diyabet olarak kabul edilmelidir (Kuzuya ve diğerleri, 2002).

Diyabetik hastanın takibinde ve diyabete bağlı kronik komplikasyonların azaltılması için glisemik kontrolün sağlanmasında "altın standart" HbA1c düzeylerinin izlenmesidir (Lapolla, Traldi ve Fedele, 2005). Erişkinde hemoglobin (Hb)'nin %97'si HbA'dan oluşur. HbA'nın HbA1a, HbA1b ve HbA1c olmak üzere üç alt grubu vardır (Allen, Schroeder ve Balog, 1958). Diyabetik hastada bunlardan özellikle HbA1c artar (Rahbar, 1968). HbA1c'nin eritrositlerin ortalama ömür sürelerinin üzerinde görülmesi ve HbA1c düzeyinin zaman-ilişkili ortalama glukoz konsantrasyonuna bağlı olması nedeni ile erken glikasyon ürünü olarak HbA1c ölçümleri, ölçüm yapılmadan önceki 4-6 hafta süresince yüksek glukoz maruziyetini yansıtır. HbA1c değerleri önceki 4-8 hafta içindeki glukoz düzeyleri ile linear korelasyon gösterir. HbA1c düzeyinin azalması diyabetik hastanın kan glukoz değerlerinde düzelmeyi yansıtır (Schwartz, 1995; Larsen, 1997).

Dünyada yaklaşık 24 milyon insan muhtelif demans tiplerinden etkilenmektedir. Gelecek beş yıl içinde, demans tanısı alan hasta sayısında ciddi bir artış olması beklenmektedir (Kern ve Behl, 2009). Nörodejeneratif hastalıklar hücresel yerleşimi farklı olmasına rağmen son derece dinamik ve çok faktörlü patolojik durumlar olduğu için sebepleri çok iyi anlaşılamamıştır. Kronik, ilerleyici ve biyokimyasal olarak ilişkili gözükmeyen moleküller arasında çoklu sinerjik etkileşim gösteren metabolik ve immünolojik yolları ilgilendirmektedir. Birçok çalışma, demans grubundaki hastalıklarda nöronal hücre

dejenerasyonu ve sonuçta hücre ölümüne sebep olan faktörler arasında oksidatif stress, inflamasyon ve sellüler proteinlerin glikasyonunda artma gibi muhtelif benzerliklerin olduğunu ortaya koymuştur (Williams, Weinberg ve Smith, 2011).

Hb glikasyonunda olduğu gibi diğer serum proteinlerinin glikasyonu da kronik yüksek glukoz konsantrasyonu ile orantılıdır (McDonald ve Davis, 1979). Glikasyon ürünlerinin serebrospinal sıvıda birikmesine bağlı olarak 111 glikasyon noktasında glikasyona uğrayan 48 protein nöroinflamasyon ve nörodejenerasyonda önemli rol oynar (Ramírez-Boo ve diğerleri, 2012). Proteinlerin non-enzimatik glikasyonu veya “Maillard” reaksiyonu olarak isimlendirilen süreç, kronik hiperglisemiye bağlı olarak diyabetin kronik komplikasyonlarının gelişmesine sebep olan pato-fizyolojik değişiklikleri yansıtır (Brownlee, Cerami ve Vlassara, 1988). “Maillard” reaksiyonu erken evre, ara evre ve geç evre olmak üzere üç aşamada meydana gelir. Erken evrede glukoz veya fruktoz, pentoz, galaktoz ve mannoz gibi diğer redüktif şekerler; proteinler, nükleik asitler ve lipidlerin serbest amino grupları ile reaksiyona girerek “Schiff base” denilen stabil olmayan bir aldimin bileşiği meydana getirirler. “Schiff base” daha sonra “Amadori” ürünü denilen stabil bir ketoamine dönüşür. Ara evrede oksidasyon ve dehidrasyon reaksiyonları ile “Amadori” ürünü, glioksal, metilglioksal (MGO), deoksiglukozon gibi çeşitli karbonil bileşiklere parçalanır. Bunlar şekerlerden daha reaktif bileşiklerdir ve proteinlerin amino grupları ile tekrar reaksiyona girerler (Lapolla ve diğerleri, 2005). Diyabetik hastanın metabolik kontrolünün değerlendirilmesinde erken evre glikasyon ürünü olan “Amadori” ürününün ölçülmesi rutin olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu konuda HbA1c ve glikolize serum proteinleri en sık kullanılan iki parametredir (Mayer ve Freedman, 1983). Anormal protein agregasyonu, MGO ve glioksal gibi aldehytlerin oluşumu nörodejeneratif hastalıkların kronik gelişimine katkısı olan ortak olaylardır. MGO son derece reaktif bir dikarbonildir. Aerobik glikolizis esnasında tirozin fosfatların spontan parçalanması ile meydana geldiği gibi pentoz, askorbat ve lipidlerin oksidasyonu ile de oluşur (Degenhardt, Thorpe ve Baynes, 1998). Plazma konsantrasyonunun ve reaktivitesinin yüksek olması nedeni ile MGO en önemli *in-vivo* karbonildir. Dolayısı ile glioksal ve MGO’nun ölçülmesi, yüksek glukoz konsantrasyonuna bağlı oksidatif stresin değerlendirilmesinde son derece önemlidir (Lapolla ve diğerleri, 2003). Geç evrede bu karbonillerin serbest amino grupları ile tekrar reaksiyona girmesi ile ileri glikasyon son ürünleri (“Advanced Glycation End-

Products” (AGE)) denilen suda erimeyen ve geri-dönüşsüz bileşikler meydana gelir (Bkz Şekil 2.1.). Bunlar proteinler üzerinde birikir, çapraz bağlar yaparlar ve hücresele reseptörlerle etkileşerek veya hücre içi glikasyona sebep olarak hasara yol açarlar (Sing, Barden, Mori ve Beilin, 2001). Hiperglisemi, protein glikasyonu ve AGE oluşumu arasında son derece kuvvetli korelasyon vardır. Glisemik kontrolla korelasyon gösteren AGE DNA, lipid ve proteinler üzerinde meydana gelerek hücresele ve moleküler düzeyde fonksiyon bozukluğuna yol açar. Hiperglisemik dönemde oluşan bu reaktif bileşikler daha sonra diyabete bağlı komplikasyonların gelişmesinde önemli rol oynar (Stitt, Jenkins ve Cooper, 2002). Toksik AGE, AGE reseptörleri aracılığı ile hücre içi sinyal iletimini, gen ekspresyonunu, proinflatuvar moleküllerin serbestleşmesini ve ROS’nin üretimini etkileyerek diyabetik komplikasyonların meydana gelmesine katkıda bulunur (Sato ve diğerleri, 2006). Toksik AGE’nin yapısında yer alan gliseraldehit, oksidatif stresle diyabetik vasküler komplikasyonlar ve nöron hasarına yol açar. “Gliser-AGE” epitopuna karşı gelişen antikorların diyabetik serumun nöronal hücreler üzerindeki nörotoksik etkisini önlediği tespit edilmiştir (Takeuchi ve Yamagishi, 2009).

Glisemik kontrolü yeterli olmayan diyabetli hastalarda plazma glukoz düzeyindeki sürekli yükseklik, plazma proteinlerinin geri-dönüşsüz non-enzimatik glikasyonuna sebep olur. Özellikle non-enzimatik glikolize apolipoprotein (apo)A-I düzeyi, diyabet ve kronik böbrek yetmezliğinde yükselir ve lesitin-kolesterol açıltransferazı inhibe ederek “high-density lipoprotein” (HDL)’lerin kardiyovasküler sistemi koruyucu bazı özelliklerinin ortadan kalkmasına yol açar (Rye, 2014).

2.2. Yüksek glukoz ve nöron hasarı

Farklı konsantrasyonlarda glukozla maruz kalan nöron hücre kültürlerinde enerji gereksinimini düzenleyen metabolik değişiklikler meydana gelir. Diyabette görülen hiperglisemi ile birlikte, hipertrigliseridemi, hiperkolesterolemi, hipoalfalipoproteineminin ortaya çıkması, AGE birikimi, glikolize-okside lipoprotein düzeyinde artma mitokondrial solunum disfonksiyonuna bağlı olarak ROS’nin artmasına ve nöron hasarına sebep olur (Shen, 2012; Chillelli, Burlina ve Lapolla, 2013).

Nöronal aktivite ve enerji tüketimi arasında dinamik bir ilişki vardır. Normoglisemik koşullarda plazma glukozu 5,5-7,8 mM iken beyin glukoz konsantrasyonu 0,82-2,4 mM arasında değişir (Silver ve Erecinska, 1994; Abi-Saab ve diğerleri, 2002). Beyinde ekstrasellüler glukoz konsantrasyonu hiperglisemik ve hipoglisemik koşullara göre 4,5 mM ile 0,16 mM arasında dramatik değişiklikler gösterir (Silver ve Erecinska, 1994). 25mM glukoz içeren nöroblastoma hücre kültürlerinde bazal düzeyde olan adenosin monofosfat (AMP) ile aktive protein kinaz (AMPK), glukozun fizyolojik düzeyin altına inmesi ile artmaya başlar. Diğer bir deyişle hücrelerin düşük glukozla canlılıklarını sürdürülebilmeleri için AMPK fosforilasyonu artar (Lee, Li, Xi, Suh ve Martin, 2005). Hiperglisemi ile glikolitik ATP'nin artması AMP/ATP oranını azaltır ve AMPK aktivitesini inhibe eder (Martin ve diğerleri, 2006). Akut hiperglisemi ile AMPK aktivitesinin inhibe olması, glukoz ve insülinle düzenlenen NO üretiminin azalmasına yol açar (Canabal, Potian, Duran, McArdle ve Routh, 2007). Hipoglisemi sonucu nöron içinde ATP düzeyinin düşmesi ile AMP artışına cevap olarak AMPK aktive edilir (Sanders, Grondin, Hegarty, Snowden ve Carling, 2007). AMPK aktive olunca, nöronda ATP desteğine gerek gösteren birçok metabolik olay baskılanır, yağ asidi oksidasyonu ve glikolizis gibi katabolik olaylar ise hızlanır (Hardie, 2007). Aslında düşük glukoz düzeyi, NO kullanılmasını belirgin biçimde azaltır. Düşük glukoz düzeyi aynı zamanda AMPK'ı hızla aktive eder. Ancak AMPK'ın fizyolojik aktivasyonu kullanılabilir NO miktarını uygun düzeye çıkaramaz (Wang ve diğerleri, 2012).

Primer nöronların 45mM düzeyinde yüksek glukozla maruz kalması ROS'nin oluşumunu hızlandırarak önce mitokondrial membran hiperpolarizasyonuna sonra mitokondrial membran depolarizasyonuna, mitokondrial disfonksiyona, kaspaz 3 ve 9 aktivasyonu ile nöronal apoptoza sebep olur. (Russell ve diğerleri, 2002). SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde AGE ile meydana gelen hücre içi oksidatif stres ve hücre ölümü AGE reseptörleri'nin blokajı ile önlenabilmektedir (Yin ve diğerleri, 2012). SH-SY5Y hücreleri, şeker metabolizmasının bir dikarbonil metaboliti ve AGE'nin majör prekürsörü olan MGO'a yüksek miktarda maruz bırakıldığında hücre içi ATP, mitokondrial redoks tamponlama, mitokondrial membran potansiyeli ve hücre canlılığı azalır, ROS oluşumu artar (Wang, Yu, Pu ve Du, 2014). Reaktif dikarboniller glukozla nazaran 20.000 kat daha reaktiftir. MGO gibi reaktif dikarboniller protein, lipid ve nükleik asitleri modifiye ederek glikasyon olayına büyük katkıda bulunurlar (Jack ve Wright, 2012). Nitekim SH-SY5Y

nöroblastoma hücrelerinin MGO'a maruziyeti 24 saat içinde plazma membranının erken depolarizasyonu, aşırı glutamat serbestleşmesi ve oksidatif strese artma ile sonuçlanır. Hücre canlılığı ve hücre içi ATP azalır. Bu değişikliklerin NOS inhibitörü L-NAME ve NMDA reseptör antagonisti ile önlenemediği gösterilmiştir (De Arriba ve diğerleri, 2006). Bu da NMDA reseptör aktivasyonunu takiben ortaya çıkan NOS uyarısı ile aşırı NO sentezi ve RNS'nin meydana geldiğini düşündürmektedir (Braidı ve diğerleri, 2009).

Yüksek glukoz konsantrasyonu ile meydana gelen hücrel stresin patogeneğinde aşırı mitokondrial serbest radikal oluşumu ve buna bağlı mitojenle aktive olan protein kinaz p38 (p38 MAPK) aktivasyonu önemli rol oynar (Bkz Şekil 2.1.). Yüksek glukozla uyarılmış mitokondrial oksidatif stresin antioksidanlarla ortadan kaldırılması, SH-SY5Y hücrelerini yüksek glukozla bağlı p38 MAPK yolağının aktive olmasına bağlı istenmeyen etkilerden korur (Cao, Jiang, Du ve Yan, 2012).

2.3. Yüksek glukoz düzeyi ve nörodejeneratif hastalıklar

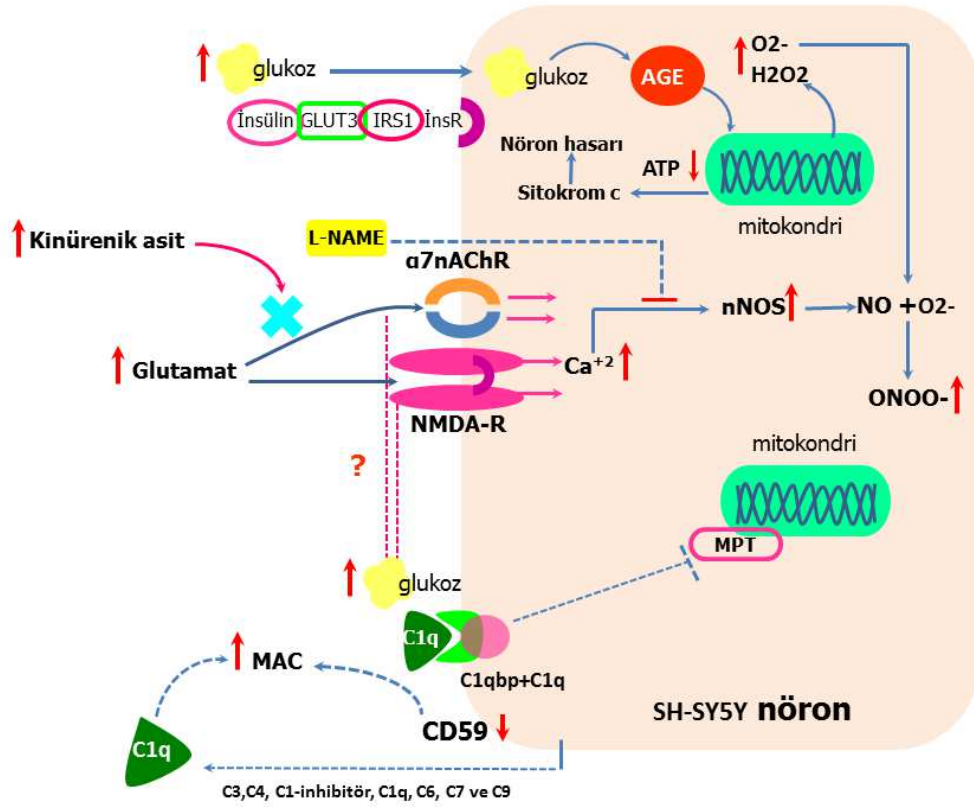
Çok sayıda epidemiyolojik çalışma diyabetli hastada nörodejeneratif hastalıkların özellikle de Alzheimer hastalığının gelişme riskinin yüksek olduğunu göstermektedir (Kopf ve Frolich, 2009; Maher ve Schubert, 2009). Dünya Alzheimer raporuna göre halen 36 milyon insan ilerleyici nörodejeneratif demanstan etkilenmekte ve gelecek yirmi yılda bu sayının iki katına çıkması beklenmektedir. İleri yaştaki nüfusun %80'inde demansın çeşitli formları ve Alzheimer Hastalığı'nın bulunduğu anlaşılmıştır (Van Himbergen ve diğerleri, 2012).

Glukoz beyin temel enerji kaynağı olup normal beyin fonksiyonlarının devamı için beyin glukoz düzeyinin dar sınırlar içinde muhafaza edilmesi gerekir. Kontrolsüz kan glukoz düzeyi ise beyin yapı ve fonksiyonunu etkileyerek algılama bozukluklarına yol açar (Cardoso ve diğerleri, 2013). Yapılan çalışmalarda tip 2 diyabetli hastaların %50'sinde tanıdan sonraki ilk on yıl içinde hiperglisemiye bağlı diyabetik nöropati gelişme riski olduğu gözlenmiştir. Düzenli kan glukoz kontrolü ise nöropati gelişme riskini önemli oranda azaltmaktadır (Callaghan, Little Feldman ve Hughes, 2012).

2.4. Yüksek glukoz ve glutamaterjik uyarı

Hiperglisemi diyabet gelişmesinde primer faktör olarak kabul edilmektedir. Pankreas beta hücreleri yüksek glukoz'a (10, 25, 50 mM) maruz kaldıklarında; hücre canlılığında azalmanın, glukozun dozuna bağlı olarak hücrelerin glutamat tutmasındaki artma ile orantılı olduğu ileri sürülmüştür. Diğer bir deyişle, yüksek glukozla uyarılan oksidatif stres ve glutamat hücre canlılığını azaltmaktadır. Yüksek glukozun bu etkisinin 1mM N-asetil-L-sistein (NAC) ile bloke edildiği gösterilmiştir (Han ve Park, 2011). Oksijen ve glukoz yokluğuna bağlı glial nekrotik hücre ölümünden ise hem iyonotropik glutamat reseptörlerinin hem de glutamat taşıyıcılarının sorumlu olduğu düşünülmektedir (Bonde, Noraberg, Noer ve Zimmer, 2005). Normal koşullarda memeli santral sinir sisteminde sabit hızda bir glukoz desteğine gerek vardır. Beyin enerji desteğinde yağ asitleri veya keton cisimciklerinin katkısı son derece sınırlıdır. Glukoz kan-beyin bariyerinden ve plazma membranından hızla geçer sonra fosforilasyona uğrar. [1-13C]D-glukozla yapılan çalışmalarda (Mason, Behar, Rothman ve Shulman, 1992), 6-8 mM normoglisemik plazma konsantrasyonunda, ortalama beyin dokusu glukoz içeriğinin 2-4 $\mu\text{mol/g}$ yaş doku olduğu gösterilmiştir. Beyin glukoz konsantrasyonu hipoglisemi ile düşer, hiperglisemi ile artar (Mason ve diğerleri, 1992). Normal kan glukoz konsantrasyonunda beyin glukoz tutulum oranı, glukoz kullanım hızına göre $2,4 \pm 0,4$ kat daha fazladır. Bu da normal koşullarda kan-beyin bariyerinden glukoz transportunun, glukoz kullanım hızını kontrol eden bir parametre olmadığını göstermektedir (Mason ve diğerleri, 1992). Glukozun kan-beyin bariyerini geçerek nöronlara ulaşmasında, burada bulunan GLUT1, nöron içine transportunda ise GLUT3 aracılık yapar (Bkz Şekil 2.1.). Nöron tarafından glukozun alınması sinaptik terminal membranlarında yüksek konsantrasyonda GLUT3 bulunmasına bağlıdır (Leino, Gerhart, van Bueren, McCall ve Drewes, 1997; Vannucci, Maher ve Simpson, 1997). Nöronlarda yaygın olarak eksprese edilen GLUT3, nörona özgü bir glukoz taşıyıcısıdır ve santral nöronlarda önemli rol oynar (Nagamatsu ve diğerleri, 1993). Serebral glukoz kullanımının artması GLUT3 ekspresyonunu eş zamanlı olarak artırır (Piert, Koeppe, Giordani, Berent ve Kuhl, 1996; Vannucci ve diğerleri, 1998). GLUT3'ün glukozafinitesi GLUT1'e nazaran daha yüksektir ve transport kapasitesi de en az 5 kat daha fazladır. GLUT3'ün bu özelliği nöronal transport bakımından önemlidir. Serum glukoz konsantrasyonu 5-6 mM iken nöron çevresindeki glukoz konsantrasyonu yaklaşık 1-2

mM'dir. Dolayısı ile nöronun glukoza erişim kapasitesi diğer nöronal hücrelerden daha yüksektir. (Leino ve diğerleri, 1997; Vannucci ve diğerleri, 1997). Yetmiş iki saatlık açlıktan sonraki hipoglisemi, GLUT3 mRNA ekspresyonunu iki kat artırır. Hipoglisemi GLUT3 mRNA ekspresyonunu doğrudan artırırken, hipergliseminin GLUT3 mRNA ekspresyonunun değıştirmediği ileri sürölmektedir (Nagamatsu, Sawa, Inoue, Nakamichi, Takeshima ve diğerleri Hoshino, 1994). Diğer taraftan, sinaptik aktivite ile GLUT3'ün ekspresyonundaki artış intrasellöler glukoz düzeyini artırır. Bu etkinin NMDA reseptör ve nöronal NOS (nNOS) inhibisyonu ile önlendiği tespit edilmiştir. Aslında sinapslarda NMDA reseptörlerinin uyarısı nNOS'ın fosforilasyonunu kontrol ederek NO sentezinde etkili olmaktadır. nNOS'ın fosforilasyonunun inhibisyonu, GLUT3 artışını engeller. NMDA reseptör aracılı NO artışı siklik guanozin monofosfat (cGMP)/ cGMP kinaz (cGK) sinyal iletim yolağını uyararak GLUT3'ün plazma membranına translokasyonunu kolaylaştırır. Membran GLUT3 miktarındaki bu artış glukoz transportunu hızlandırır. Sonuç olarak; nNOS fosforilasyonu üzerinden NMDA reseptörlerinin sinaptik uyarısı NO-aracılı bir yolakla GLUT3'ün membran ekspresyonunu uyarır ve glukozun hücre içine girişini hızlandırır. Bu olay, NMDA reseptör ve nNOS ihibisyonu ile bloke olur (Ferreira, Burnett ve Rameau, 2011). Ancak yüksek glukoz konsantrasyonuna maruziyette glutamaterjik nöronal uyarı ile başlayan sürecin NMDA reseptörü düzeyinde nasıl geliştiği ve hücre ölümünün asıl sebebi tam olarak bilinmemektedir.



Şekil 2.1. SH-SY5Y dopaminerjik nöron hücrelerinde yüksek glukoz maruziyeti ile meydana gelen olası glutamaterjik uyarı ve mitokondrial oksidatif stres (Kompleman 1q: C1q, C1q bağlayıcı protein: C1qbp, Kompleman düzenleyici protein “complement regulatory protein 59”: CD59, Membran atak kompleksi: MAC, “mitochondrial permeability transition”: MPT porları, N-metil-D-aspartat reseptörü: NMDA-R, NOO⁻: peroksi nitrit, NO: nitrik oksit, nNOS: nöronal nitrik oksit sentaz, Nω -nitro-L-arginin metil ester: L-NAME, Alfa7-nikotinik asetilkolin reseptörü: α7nAChR, Glukoz taşıyıcısı 3: GLUT3, İnsülin reseptör substrat 1: IRS1, İnsülin reseptörü: İnsR, İleri glikasyon ürünleri: AGE, Hidrojen peroksit: H₂O₂, Adenozin trifosfat: ATP)

Aşırı glutamat serbestleşmesi ve bunu takip eden glutamaterjik nöronal uyarının oksidatif strese ve nöronal hasara sebep olduğu bilinmektedir. Nöronlarda oksidatif stresi hem glutamaterjik hem de kolinerjik reseptör uyarısı başlatmaktadır (Savolainen, Loikkanen, Eerikäinen ve Naarala, 1998). Nöronal glutamatın en önemli ön maddesi glutamindir. Glutamat ayrıca, trikarboksilik asit (TCA) döngüsünde de sentezlenir (Bak, Schousboe ve Waagepetersen, 2006). NMDA reseptör antagonistleri hücre içi glutamin düzeyinin artmasına, glutamat düzeyinin ise azalmasına sebep olur (Moghaddam, Adams, Verma ve Daly, 1997; Iltis ve diğerleri, 2009). SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleri tarafından eksprese edilen fosfatla aktive glutaminaz (PAG) glutamini glutamat ve amonyağa dönüştürür (Roberg, Torgner ve Kvamme, 2010). Glikolitik enzimler olarak bilinen

gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) ve 3-fosfo gliserat kinaz (3-PGK), sinaptik veziküllerde fonksiyonel bir kompleks meydana getirerek presinaptik veziküllerde glutamat birikmesini sağlarlar (Ikemoto, Bole ve Ueda, 2003). Eğer nöronlar yüksek konsantrasyonda glutamata maruz kalırlarsa, NMDA reseptör kanalları Ca^{2+} iyonlarına geçirgen hale gelirler (Bkz Şekil 2.1.). Burada endojen ekstrasellüler glutamatın kaynağı önemlidir (Tapia, 1996). Yapılan çalışmalar nöronlarda glutamat reseptörlerinin aşırı eksitotoksik ("excitotoxic") aktivitesinden endojen glutamatın sorumlu olduğunu göstermiştir (Ayala ve Tapia 2008). 10 nM nörotensin 30 dakikada endojen glutamat seviyesini yükseltir. Nöronlardan açığa çıkan glutamata bağlı NMDA-aracılı sinyal iletimi nöron hasarına yol açar (Antonelli ve diğerleri, 2004). Nöronlarda glutamat reseptörlerinin aktive olması ile birlikte glikolizisi düzenleyen 6-fosfofrukto-2-kinaz/fruktoz-2,6-bifosfataz-3 (PFKFB3) stabilize olur ve glikolizis artar, buna karşılık pentoz fosfat yolağı ("pentose phosphate pathway") (PPP) aktivitesi azalır. Yeteri kadar glukozun PPP yolağına girememesi, nöronların antioksidan redükte glutatyon (GSH) rejenerasyonunu engelleyerek oksidatif stresi başlatır (Rodriguez-Rodriguez, Almeida ve Bolaños, 2013). Rodriguez-Rodriguez ve diğerleri (2012) nöronlardaki NMDA reseptör aktivasyonu ile PFKFB3 proteininin nukleusta eksprese olarak sitozole serbestleştiğini ve glikolizisi artırdığını, buna karşılık PPP aktivitesini azalttığını göstermişlerdir. PPP kaynaklı antioksidan GSH azalması oksidatif stres ve apoptotik nöron ölümü ile sonuçlanır (Rodriguez-Rodriguez, Fernandez, Almeida ve Bolaños, 2012). Normal koşullarda nöronlarda glikolizisi hızlandıran PFKFB3, isoform 3 aktivitesi son derece azdır ve nöronların glikolitik aktivitelerini artırmaları zordur. Bundan dolayı nöron içine giren glukoz büyük ölçüde PPP'e yönelir ve GSH üretilir (Bolaños, Almeida ve Moncada, 2010).

Glikolitik aktivitenin glikolizis yönünde uyarılması nöronlar için sitotoksiktir (Almeida, Almeida, Bolanos ve Moncada, 2001). Nöronlarda glukoz kullanımının PPP'den glikolizise sapması, kritik antioksidan nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH)-GSH sisteminin glukoz desteğini azaltarak oksidatif stresin devam etmesine sebep olur. NMDA reseptör uyarısı ile tetiklenen glikolizisle birlikte okside glutatyon (GSSG) redükte olamaz ve GSH düzeyi azalır, mitokondrial ROS artar ve apoptotik nöron ölümü gerçekleşir (Rodriguez-Rodriguez ve diğerleri, 2013). Nöronlar hem zayıf antioksidan sistemleri, hem de enerji homeostazını kompanse etme kapasitelerinin düşük olması nedeni ile ROS ve RNS'ne karşı

son derece duyarlıdır. RNS üretimi artmaya başlayınca, NADPH ve GSH üreten antioksidan PPP'i etkin biçimde uyarır, bu esnada biyoenerjetik glikolizis inhibe olur (Bolaños ve Almeida, 2010).

NMDA reseptörlerinin nöronların canlılığının devamında veya ölümündeki rolü konusundaki tartışmalar uzun süredir devam etmektedir (Kalia, Kalia ve Salter, 2008). Sinaptik NMDA reseptörleri nöron canlılığının sürdürülmesi için önemlidir. Ekstrasinaptik NMDA reseptör aktivasyonu ise nöron hasarına sebep olan genlerin ekspresyonunu indükler (Zhang ve diğerleri, 2007). NMDA reseptörlerinin aşırı uyarısı ile hücre içine kalsiyum iyonlarının $[Ca^{2+}]$ aşırı girişi hücre ölümüne veya muhtelif nörolojik fonksiyonların hasar görmesine sebep olur (Mody ve MacDonald, 1995; Arundine ve Tymianski, 2003). Glutamatın hücre hasarına yol açan toksik uyarısı için nöron içine Ca^{2+} girişi gereklidir. NMDA reseptörleri, toksik Ca^{2+} girişinde primer kaynaktır (Choi, 1987; Choi, Maulucci-Gedde ve Kriegstein, 1987; Choi, Koh ve Peters, 1988). Fizyolojik miktarlarda NMDA reseptör aktivitesi nöron yaşamı için faydalı iken aşırı NMDA reseptör aktivasyonu ve nöron içinde aşırı Ca^{2+} birikmesi hasara sebebiyet verir. NMDA reseptör aktivitesine nöronal cevap bir çan eğrisine benzer; çok fazlası ve çok azı nöron hasarına yol açar (Hardingham ve Bading, 2010). Tek başına veya sinaptik NMDA reseptör aktivasyonunun varlığında ekstrasinaptik NMDA reseptör aktivasyonu ile nöron içine Ca^{2+} girişi mitokondrial disfonksiyon ve hücre ölümünü ile sonuçlanır (Hardingham, Fukunaga ve Bading, 2002). Ekstrasinaptik sinyal iletiminin etkileri, sinaptik sinyale nazaran daima daha fazladır (Hardingham ve diğerleri, 2002; Ivanov ve diğerleri, 2006). NMDA reseptörünün kronik uyarısında sinaptik ve ekstrasinaptik aktiviteler arasındaki denge önemlidir (Okamoto ve diğerleri, 2009). Düşük konsantrasyonda NMDA daha çok sinaptik yolağı aktive eder ve nöron koruyucu etki gösterir, buna karşılık yüksek düzeyde NMDA sinaptik uyarıyı baskılar ve ekstrasinaptik yolak etkinlik kazanır (Soriano ve diğerleri, 2006). Sinaptik NMDA reseptörlerinden giren Ca^{2+} hücre içi kaynaklardan desteklenir ve Ca^{2+} uyarısı nöron çekirdeğine ulaşır (Hardingham, Arnold ve Bading, 2001). Nükleer Ca^{2+} nöronal gen ekspresyonu için en güçlü uyaranlardan biridir. Siklik AMP cevap elemanı bağlayıcı proteini ("cyclic-AMP response element binding protein", CREB), nükleer Ca^{2+} bağımlı hücre korunmasında en önemli araçtır (Hardingham ve diğerleri, 2010).

Her ne kadar NMDA reseptör antagonistleri ile reseptörün sürekli uyarısının bloke edilmesi nörolojik hastalıkların tedavisinde rasyonel bir yaklaşım gibi gözükse de, NMDA reseptörü normal beyin fonksiyonları için gerekli olduğundan NMDA reseptör aktivitesinin tamamen inhibe edilmesi normal fizyolojik fonksiyonları da oradan kaldırdığından istenen sonuca ulaşamaz (Vandame ve diğerleri, 2013). Muhtelif potent selektif NMDA reseptör antagonistleri geliştirilmiş, ancak bunların nörotoksisteleri nedeni ile klinik çalışmaları mümkün olamamıştır (Low ve Roland, 2004). Son zamanlarda NMDA reseptör antagonistlerinin geliştirilmesi için yapılan çalışmalar, NMDA reseptör uyarısı ile meydana gelen cevabın reseptörün konumuna bağlı olarak değiştiğini ortaya koymuştur. Sinaptik NMDA reseptörlerinin uyarısının primer olarak nükleer Ca^{2+} sinyal iletimi ile meydana geldiği ve nöroprotektif olduğu, buna karşılık ekstrasinaptik NMDA reseptörlerinin uyarısının ise hücre ölümüne yol açtığı gösterilmiştir (Hardingham ve Bading, 2010). NMDA reseptörleri sodyum, potasyum ve kalsiyuma geçirgen katyonik kanallardır. NMDA reseptörlerinden kalsiyum girişi NMDA reseptörleri ile ilişkili birçok fizyolojik ve patolojik koşulda kritik bir faktördür. NMDA reseptör aktivasyonu ve bunu takip eden postsinaptik kalsiyum konsantrasyonundaki artış sinaptik etkinliği ve nöral morfolojiyi modifiye eden olayları tetikler. Fonksiyonel NMDA reseptörleri; GluN1, GluN2A-D, GluN3A-B gibi farklı alt ünitelerden meydana gelmiş bir tetramerdir. Tipik olarak endojen NMDA reseptörleri iki GluN1 alt üniteye ilaveten GluN2 veya GluN3 alt ünitelerden meydana gelen di-heteromerlerdir. Özgün olarak GluN1/GluN2B/GluN3A veya GluN1/GluN2B/GluN2D kompleksleri çocukluk sürecinin erken aşamasında eksprese edilir. GluN1/GluN2A/GluN2B veya GluN1/GluN2A/GluN2C ise erişkin dönemde eksprese edilir (Al-Hallaq, Conrads, Veenstra ve Wenthold, 2007; Brothwell ve diğerleri, 2008).

Bütün GluN iyonotropik glutamat reseptörlerinde alt ünitelerin M1, M2 ve M3 olmak üzere üç adet transmembran segmenti ve bir "re-entrant pore loop"u vardır. Uzun N-terminal uçları ekstrasellülerdir. C-terminal ise birçok sitozolik proteinle etkileşen hücre içi bölümdür. Glutamat, GluN2 alt ünitesine bağlanır. NMDA reseptör alt üniteleri yapısal benzerliklerine rağmen fonksiyonel bakımdan çok farklıdır. GluN2A ve GluN2B en yoğun araştırma konusu olan alt ünitelerdir. GluN2A içeren reseptörler, GluN2B içerenlere nazaran daha hızlı bir kinetiğe sahiptir. Buna karşılık GluN2A'ya nazaran GluN2B'ye glutamat afinitesi daha yüksektir; ancak, erişkin nöronlarda sinaptik glutamat

serbestleşmesi GluN2A içeren NMDA reseptörlerinde GluN2B içerenlere nazaran daha fazla aktivasyona sebep olur. GluN2A daha fazla sinaptik bölgede, GluN2B ise daha fazla ekstrasinaptik bölgede bulunur. Ancak bu subsellüler lokalizasyonlar mutlak değildir (Thomas, Miller ve Westbrook, 2006). Sinaptik NMDA reseptörlerinin aktivasyonu hücre canlılığını sürdüren intrasellüler olayları tetikler. Ekstarasinaptik NMDA reseptörlerinden kalsiyum girişi eksitotoksisite olarak bilinen mitokondrial disfonksiyonla nöronal ölüme yol açar (Hardingham and Bading 2010). Sinaptik NMDA reseptör aktivasyonu CREB transkripsiyon faktörünün ekspresyonunu uyarır, bu da nöronal canlılık bakımından önemlidir. CREB, muhtelif pre-apoptotik ve oksidatif genin transkripsiyonunu bloke eder. Ekstrasinaptik NMDA reseptör aktivasyonu ise CREB defosforilasyonu, hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazlar ("extracellular signal-regulated kinases", ERK)1/2 inaktivasyonu ve pro-apoptotik genlerin aktivasyonu gibi çeşitli yollar aracılığı ile nöronal ölümle sonuçlanır (Bengtson, Dick ve Bading, 2008; Ivanov ve diğerleri, 2006).

GluN2A ve GluN2B'nin sitoplazmik C-uzantıları bu alt ünitelerin hareketini kontrol eden özgün bir biçime sahiptir. GluN2B, GluN2A'ya nazaran daha hareketlidir. GluN2B içeren NMDA reseptörü 250 kat daha fazla yüzey hareketine sahiptir (Sanz-Clemente, Nicoll ve Roche, 2013). Normal fizyolojik NMDA reseptör aktivitesinin hem apoptotik hem de eksitotoksik etkilere karşı koruyucu olduğu, buna karşılık oksidatif stresin ise NMDA reseptörlerinin hem hipo, hem de hiper aktivitesine cevap olarak nöron ölümünü hızlandırıcı rol oynadığı ileri sürülmektedir (Hardingham, 2009). Glutamat gibi eksite edici amino asitlerle NMDA reseptörlerinin aşırı uyarılması birçok nörodejeneratif hastalıkta nöronal hasara yol açmaktadır. Bu patolojilerde, aşırı NMDA reseptör aktivitesinin, normal reseptör fonksiyonlarını bozmadan engellenmesi önerilmektedir (Chen ve Lipton, 2006). Eksitotoksisite; nörotransmitter glutamata aşırı maruziyet veya membran glutamat reseptörlerinin aşırı uyarılması ile nöronal hasarın veya ölümün meydana gelmesidir. Eksitotoksik nöronal ölüm, kısmen reseptör iyon kanallarından aşırı kalsiyum girmesi sonucunda NMDA reseptörlerinin aşırı aktivasyonu sureti ile meydana gelir (Lipton, 2005). Sinaptik NMDA reseptörlerinin fizyolojik uyarısı nöronal canlılığı aktive eder, buna karşılık ekstrasinaptik NMDA reseptörlerinin aşırı uyarısı, mitokondrial membran potansiyelinin kaybına, yaşam döngüsünün inhibisyonuna ve hücre ölümü yolağının aktivasyonuna sebep olur. Dolayısı ile yan etkisi az olan NMDA reseptör antagonistleri, nisbeten sinaptik

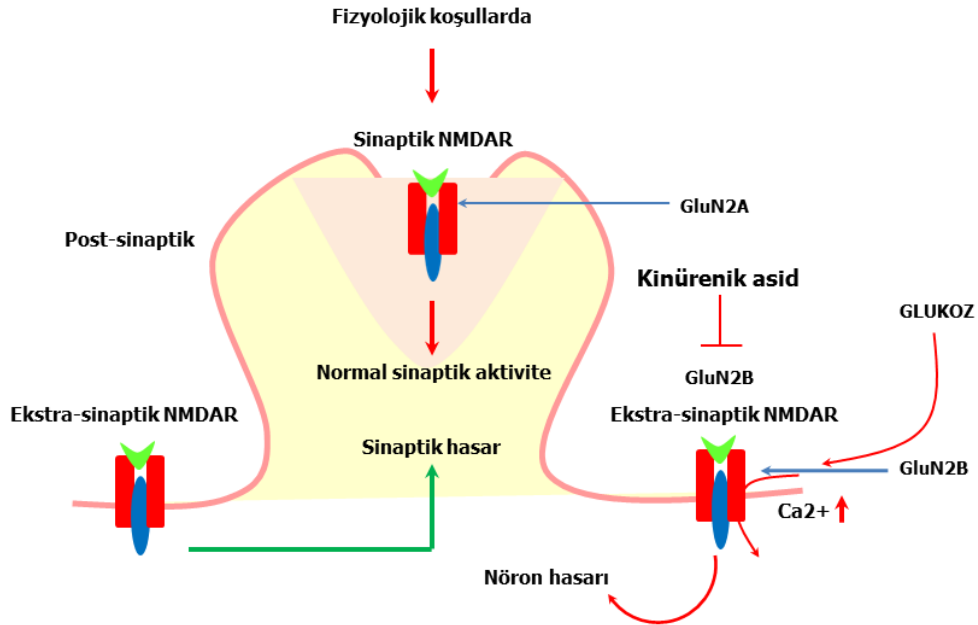
aktiviteyi korurken, aşırı ekstrasinaptik uyarıyı bloke eder. Bunlar arasında “Food and Drug Administration (FDA)” onaylı tek preparat “Memantine”in tedavi edici konsantrasyonlarda ekstrasinaptik NMDA reseptörlerini bloke ederek uyarı dengesini koruduğu ve patolojik depolarizasyon şartlarında bile sinaptik iletişimi bozmadığı iddia edilmektedir (Lipton, 2006; Lipton, 2007). NMDA reseptörlerinin normal sinaptik sinyal iletiminde kritik önemi nedeni ile sinaptik reseptörleri bloke eden NMDA reseptör antagonistlerinin zararlı yan etkileri ortaya çıkmaktadır. Bu antagonistlerin tedavi edici etkilerinden söz edebilmek için nöron koruyucu normal NMDA reseptör fonksiyonlarının sürdürülebildiği bir inhibisyon dengesinin olması gerekir (Olney, Labruyere ve Price, 1989; Ikonomidou ve diğerleri, 1999). Ancak bugün kullanılan “memantine” gibi başarılı olduğu ileri sürülen antagonistlerin ekstrasinaptik ve sinaptik reseptörlerde aynı etkiyi gösterdiği düşünülmektedir (Wroge, Hogins, Eisenman ve Mennerick, 2012). Ekstrasinaptik reseptörler NR2B alt üiteden zengin olmasına rağmen, özgün bir substrat olarak önerilen “memantine” alt ünite seçiciliği göstermemektedir (Blanpied, Boeckman, Aizenman ve Johnson, 1997). Wroge ve diğerlerinin (2012) çalışmasında sinaptik NMDA reseptör inhibisyonunun, glutamat toksisitesini önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (Wroge ve diğerleri, 2012). Bu durum sinaptik reseptörlerin NMDA reseptörlerinin büyük bölümünü meydana getirmesi veya eksojen olarak verilen agonistlerin daha çok ekstrasinaptik NMDA reseptörlerinde etkili olarak ikincil sinaptik glutamat serbestleşmesine sebep olması ile açıklanmaktadır (Sinor ve diğerleri, 2000; Hardingham ve diğerleri, 2002; Monyer ve diğerleri, 1992). Yani ekstrasinaptik reseptör dolaylı olarak sinaptik NMDA reseptör toksisitesine yol açmaktadır. Sinaptik NMDA reseptör aktivasyonunun eksojen glutamattan mı yoksa dolaylı sinaptik glutamattan mı olduğuna bakılmaksızın sinaptik reseptörlerin nörotoksik olabildiği kanıtlanmıştır (Wroge ve diğerleri, 2012). Ancak yüksek glukoz konsantrasyonuna maruziyette sinaptik aktivite, intrasellüler glukoz transportunun hızlanmasında önemli bir faktör olarak gözükmektedir. Temelde eksitotoksisite ve hücre ölümüne giden primer basamak aşırı ve uzun süreli NMDA reseptör aktivasyonu ve bunu takip eden hücre içi Ca^{2+} yüklenmesidir. Bu basamaklar; nöronların sürekli depolarizasyonu, enerji yetmezliğine yol açan mitokondrial disfonksiyon, ROS’nde artma, sitozolik Ca^{2+} iyon konsantrasyonunda ve mitokondrial Ca^{2+} tutulmasında artma ve otolitik enzimatik mekanizmaların aktive olması gibi olaylarla devam eder. Sinaptik ve ekstrasinaptik NMDA reseptörleri, birbirine zıt etki gösteren GluN2A ve GluN2B alt-

ünitelerinden meydana geldiğinden, NMDA reseptör aktivasyonuna yanıt olarak hücre canlılığı veya hücre hasarının mekanizması kısmen Ca^{2+} iyonu ve bu iyonun giriş yoluna, daha büyük oranda da NMDA reseptörlerinin alt-ünite kompozisyonu ve konumuna bağlıdır. Sinaptik NMDA reseptör GluN2B alt-ünitesini nöron koruyucu etki gösterirken, ekstrasinaptik NMDA reseptörlerinin GluN2B alt-ünitesinin stimülasyonu hücre hasarı yolağını harekete geçirerek nöron dejenerasyonunda kritik rol oynayabilir (Vizi, Kisfali ve Lőrincz, 2013).

2.5. Kinürenik asit

Besinlerle alınan triptofanın en önemli bölümü kinürenin yolağı ile metabolize edilir. Kinürenin iki farklı şekilde parçalanır. Birinci metabolik yolla KynA meydana gelir. İkinci yolda ise 3-hidroksikinürenin ve kinolonik asit sentezlenir. KynA bilinen az sayıda endojen reseptör bloke edici bileşiklerden biridir. Alfa7-nikotinik asetilkolin reseptörü ($\alpha 7nAChR$) ve glutamat için bir non-NMDA tip iyonotropik transmembran reseptör olan sinaptik alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropiyonik asit (AMPA) reseptörlere yüksek afinitesi vardır (Sas, Robotka, Toldi ve Vécsei, 2007). Kinolonik asit kinürenin yolağında sentezlenen endojen bir NMDA reseptör agonistidir. KynA ise bir NMDA reseptör antagonisti olarak kinolonik asitin nörotoksik etkisini engeller (Bkz Şekil 2.1.) (Heyes ve diğerleri, 1992). KynA, GluN2B alt-ünitesinin özgün bir antagonistidir (Bkz Şekil 2.2.) (Zádori ve diğerleri, 2014). Esansiyel bir amino asit olan triptofanın, kinürenin yolağında metabolize olması ile diğer nörotoksik metabolitlerin yanında meydana gelen KynA, iyonotropik glutamat reseptörlerini bloke eden tek endojen bileşiktir ve $\alpha 7nAChR$ 'nin non-kompetitif antagonisti, NMDA reseptörünün ise kompetitif antagonistidir (Stone, 2000). 30mM düzeyinde hiperglisemi, beyin korteksinde KynA sentezini etkilememesine rağmen 3-nitropropiyonik asit (3-NPA) ve aminooksiasetik asit (AOAA) gibi mitokondrial toksinlerin ve homosisteinin KynA sentezi üzerindeki inhibitör etkilerini artırır. Diğer bir deyişle, hiperglisemi esnasında mitokondrial hasar ve homosistein düzeyinin yükselmesi, KynA sentezinde güçlü bir inhibisyon yaparak diyabetin santral sinir sistemi komplikasyonlarında önemli bir rol oynamaktadır (Chmiel-Perzyńska ve diğerleri, 2007). Hem glutamat reseptör aracılı hücre toksisitesinin hem de serbest radikal oluşumunun, KynA sentezindeki azalma ile birlikte olduğu düşünülmektedir (Zwilling ve diğerleri, 2011).

Bununla beraber, yüksek glukoz maruziyeti esnasında nöronal hasarı başlatan sinyalin doğrudan NMDA reseptörleri üzerinden olup olmadığı ve bunda GluN2B alt-ünitesinin rolü iyi bilinmemektedir.



Şekil 2.2. SH-SY5Y dopaminerjik nöron hücrelerinde ekstrasinaptik NMDA reseptör-GluN2B aracılı olası glukoz uyarısı (NMDAR; N-metil-D-aspartat reseptörü, GluN2A ve GluN2B; NMDAR alt üniteleri)

2.6. Nöron ve nitrik oksit

Nöronal NOS beyinde yaygın biçimde eksprese edilir ve sinaptik NMDA reseptörleri üzerinden kalsiyum iyonu akımı ile aktive olur (Brenman ve diğerleri, 1996; Garthwaite, Charles ve Chess-Williams, 1988). nNOS nöronlarda postsinaptik yapılarda ve sitoplazma içinde bulunur. Sinapslarda nNOS ve diğer intrasellüler sinyal iletim molekülleri post sinaptik yoğunluk proteini (PSD)-95 protein kompleksleri ile NMDA reseptörlerine bağlanır (Sattler ve diğerleri, 1999). NMDA reseptörlerinin uyarılması üzerine Ca^{2+} reseptör iyon kanallarından sitoplazma içine girer ve nNOS aktive olarak endojen L-argininden NO üretir (Bredt ve diğerleri, 1991; Sattler ve diğerleri, 1999). Fizyolojik düzeyde NO, normal intrasellüler sinyal iletim yolları için gereklidir. Ancak NMDA reseptörlerinin aşırı uyarılmasından kaynaklanan toksik miktarda NO nöron ölümünden sorumlu tutulmaktadır (Lipton ve Rosenberg, 1994; Lipton ve diğerleri, 1993). SH-SY5Y de dahil olmak üzere bir

çok nöron hücre hattı endojen olarak nNOS eksprese edebilmektedir (Grant, Cuadra ve El-Fakahany, 2002). NO ve NO ürünleri farklı mekanizmalarla nöronal ölüme sebebiyet verebilirler. Yüksek miktarda NO, mitokondrial solunumu ve glikolizisi inhibe ederek ya da mitokondrial permeabilityyi artırarak veya poli-adenozin difosfat-riboz (poli-ADP-riboz) polimerazı aktive ederek enerji yokluğuna sebep olur ve nöron nekrozuna yol açar. Eğer nöron enerji düzeyi korunabilirse p53, p38 MAPK yolağının veya endoplazmik retikulumun oksidatif aktivasyonu ile apoptoza gider. NMDA reseptör aktivasyonuna bağlı nNOS ekspresyonunda artma, poli-ADP-riboz polimeraz ve/veya mitokondrial geçirgenlik değişiminin ("mitochondrial permeability transition", MPT) peroksinitritlerle aktivasyon yoluyla nöronal toksisiteye sebep olabilir (Brown, 2010.). İndüklenebilen NOS (iNOS) glial kaynaklı nöron ölümünden sorumludur (Bkz Şekil 2.1.). Glutamat aracılı nöronal ölüm NMDA reseptörü ile nNOS aktivasyonu ve mitokondrial hasar sonucudur (Brown ve Bal-Price, 2003). nNOS'ı aktive etmek için ortama NMDA ilave edilen SH-SY5Y hücre kültüründe ortama rekombinant arginine deiminaz (rADI) konulması, nNOS-aracılı NO üretimini inhibe eder ve nörotoksosite meydana gelir. SH-SY5Y hücreleri sitrülünü NO ön-maddesi olan endojen arginine dönüştüremediğinden NO üretimi inhibe olmaktadır (Lin, Wu, Wei ve Shen, 2014). SH-SY5Y hücrelerinde nNOS'un ikili fonksiyonu söz konusudur. Normal koşullarda nNOS ekspresyonu nöron koruyucudur (Brzozowski, Alcantara, Iravani, Rose ve Jenner, 2011). nNOS inhibe edilirse SH-SY5Y hücre apoptozu artar. Aşırı nNOS ekspresyonu, DNA hasarını ve protein oksidasyonunu, c-Jun N-terminal kinaz/c-Jun (JNK/c-Jun) apoptotik sinyal iletimini inhibe ederek hücre ölüm oranını önemli ölçüde azaltır (Aquilano ve diğerleri, 2007).

Fizyolojik koşullarda aktif NMDA reseptörleri sinaptik NMDA reseptörleridir. Patolojik koşullarda sinaptik NMDA reseptörlerinin aktivitesi azalır ve ekstrasinaptik reseptörler devreye girer. Ekstrasinaptik reseptör aktivitesi nöron koruyucu yolağı inhibe eder. Fizyolojik sinaptik NMDA reseptör aktivitesi ise nöron koruyucu transkripsiyonel ve antioksidan yolları stimüle eder (Hardingham ve Bading, 2010; Wroge ve diğerleri, 2012). NOS dağılımı ve fizyolojik fonksiyonları, farklı izoformları için farklıdır (Reid, 1998). Nöronal NOS izoformu santral sinir sisteminde nöronlarda ve astrositlerde bulunur (Yuan ve diğerleri, 2004). iNOS ve endotelial NOS (eNOS) ise glial hücrelerde, endotelial hücrelerde ve astrositlerde bulunur (Lin, Taktakishvili ve Talman, 2007; Suarez, Bodega,

Rubio, Felipe ve Fernandez, 2005). Nörodejeneratif hastalıklarda nNOS ve iNOS'un regülasyonu bozulur. Nöronlarda ve astrositlerde glutamatin NMDA reseptörlerine bağlanması ile nNOS ekspresyonu başlar (Knowles ve Moncada, 1994). Düşük fizyolojik konsantrasyonlarda NO nöron koruyucu olmasına karşın, yüksek patolojik seviyede NO proteinlerin aberant S-nitrozilasyonu ve toksik peroksinitritlerin üretilmesi nedeni ile nöron hasarı meydana getirir (Lipton ve diğerleri, 1993; Dawson, Dawson, London, Bredt ve Snyder, 1991; Choi ve diğerleri, 2000; Hess, Matsumoto, Kim, Marshall ve Stamler, 2005). Bu NO-aracılı reaksiyonlar, enerji açığı ve protein parçalanma ürünlerinin birikmesine bağlı mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ile sinaptik hasar ve nörodejeneratif hastalıklarla sonuçlanır (Nakamura ve diğerleri, 2013). Bir kompetitif NOS inhibitörü olan L-NAME aşırı miktarda NO ile meydana gelen nöronal apoptozu inhibe eder (Chen ve diğerleri, 2008). Nöron hücrelerinde GSH ile kontrol edilen sellüler redoks tamponlama sisteminde yetersizlik, nöronu endojen NO'ya duyarlı hale getirir (Aquilano, Baldelli, Cardaci, Rotilio ve Ciriolo, 2011). GSH majör sellüler non-enzimatik antioksidandır. Hücre içi redoks tamponlama yanında glutatyon peroksidazın (GPx) kofaktörü olarak lipid ve organik peroksitlerin detoksifikasyonunda da görev alır. GSH sentezinin inhibisyonu, SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri ve primer kortikal nöronlarda NO-aracılı DNA hasarı ve protein oksidasyonuna sebep olur (Liddell, Dringen, Crack ve Robinson, 2006).

Nöronal NOS nitroerjik sinyal iletiminin özgün hedefi veya kaynağıdır. Çözünebilir guanilil siklaz ("soluble guanylyl cyclase" (sGC)) majör NO reseptörü olduğundan protein kinaz G'nin cGMP-aracılı aktivasyonu ve bunu takiben kinase/fosfatase aktivitesindeki denge değişiklikleri hedef protein fosforilasyonunu değiştirir (Serulle ve diğerleri, 2007; Park, Mohapatra, Misonou ve Trimmer, 2006). Glutamaterjik sinyal iletimi nNOS aktivasyonuna sıkı sıkıya bağlıdır (Garthwaite, 2008; Steinert ve diğerleri, 2008). NMDA reseptörleri, glutamatin girdiği kalsiyum kanallarını içerdiğinden nöronal fonksiyonda son derece önemlidir. Nöronal NOS adaptör protein eksitotoksik sinyal iletiminde NMDA reseptör/nNOS kompleksi aracılık yapar. Reseptör fonksiyonunun bozulması birçok nörodejeneratif hastalıkta rol oynar (Courtney, Li ve Lai, 2014). Ancak NMDA reseptörü ile uyarılan nNOS aktivasyonunun ve NO sentez miktarının nörodejeneratif bozukluklarla ilişkisi belirsizdir. Her ne kadar eksitotoksisitede nNOS'un rolünü destekleyen bulgular varsa da bunun yanında çelişkili sonuçlar da söz konusudur. Eksojen verilen mikromolar

seviyede NO'nun hiçbir hasar verici etkisi olmamasına karşın, eksitotoksik strese endojen olarak 1000 kat daha düşük konsantrasyonda NO meydana geldiği gösterilmiştir (Keynes, Duport ve Garthwaite, 2004). Nöronlar ancak kendi sentezledikleri NO'ı nöronal uyarıda bir endojen modülatör olarak kullanabilirler (Artinian, Zhong, Yang ve Rehder, 2012). nNOS tarafından üretilen NO, aktif NMDA reseptör/nNOS kompleksi çevresinde yüksek konsantrasyonlara erişir. Ancak bu kompleksin biraz uzağında NO düzeyi hemen düşer (Keynes ve diğerleri, 2004; Philippides, Ott, Husbands, Lovick ve O'Shea, 2005). Nörodejeneratif olaylarda p38MAPK ve JNK gibi nNOS mediyatörleri rol oynar (Ji, Gereau, Malcangio ve Strichartz, 2009; Lai, Zhang ve Wang, 2014). Nöronlarda p38MAPK aktivasyonu, NMDA reseptör uyarısı ile üretilen NO ile olur (Cao ve diğerleri, 2005; Soriano ve diğerleri, 2008; Li ve diğerleri, 2013). JNK aktivasyonunun eksitotoksisitenin zorunlu bir komponenti olmadığı ileri sürülmüştür (Cao ve diğerleri, 2005). Ektopik olarak eksprese edilen nNOS JNK aktivitesine karşı inhibitör etki gösterir. JNK, nöronal hücre ölümü ve canlılığı ile ilgili sinyal iletim yollarının önemli bir modülatörüdür. nNOS eksprese eden nöronlar JNK aktivitesini önemli ölçüde azaltır (Park ve diğerleri, 2006). NO, JNK'ı S-nitrozilasyon yoluyla inhibe eder (Park ve diğerleri, 2000). NMDA reseptör aktivasyonu endojen NO üretimini artırır, bu da NMDA-aracılı eksitasyonda kullanılır (Pierrefiche ve Naassila, 2014).

Diğer taraftan nNOS inhibisyonu apoptozu artırır, nNOS ekspresyonunda artış ise DNA hasarını önleyerek nöron ölümünü azaltır (Aquilano ve diğerleri, 2007). NMDA reseptörü ile meydana getirilen nNOS aktivasyonu, özgün olarak NOS 1 adaptör proteini (NOS1AP) üzerinden p38MAPK cevabına bağlıdır (Cao ve diğerleri, 2005; Soriano ve diğerleri, 2008; Li ve diğerleri, 2013). Nöronal hücrede nitrik oksit sentaz 1 adaptör protein (NOS1AP), NMDA reseptör uyarısını nNOS'a yönlendirir. NOS1AP, aslında nNOS fonksiyonunun kompetitif inhibitörü olarak tanımlanmıştır (Jaffrey, Snowman, Eliasson, Cohen ve Snyder, 1998). Ancak fonksiyonel çalışmalar, NOS1AP'nin nöronal fonksiyonların düzenlenmesinde NMDA reseptör/nNOS kompleksinde nNOS sinyal iletiminin bir mediyatörü olduğunu göstermektedir (Fang ve diğerleri, 2000; Cheah ve diğerleri, 2006). NOS1AP ekspresyonunun azalması nöronlarda NMDA reseptör/nNOS uyarısını inhibe eder (Li ve diğerleri, 2013).

Eksitotoksisite aşırı sinaptik glutamat birikimi ile birlikte nöron içi kalsiyum iyonunun homeostazında bozulma ile meydana gelen bir olaydır (Choi, 2005). Eksitotoksitenin en önemli özelliği NMDA reseptör/ Ca^{2+} -bağımlı NO ve ROS üretiminde artmadır (Forder ve Tymianski, 2009; Szydlowska ve Tymianski, 2010). Mitokondrial fonksiyon, intranöronal kalsiyum homeostazının korunmasında kritiktir (Pizzo, Drago, Filadi ve Pozzan, 2012). Aşırı kalsiyum yüklenmesi, organellerde serbest radikal üretiminin artmasına ve eksitotoksisite kaskadının başlamasına yol açar (Reynolds ve Hastings, 1995; White ve Reynolds, 1995; Nicholls ve Budd, 2000; Nicholls, 2004; Nicholls, Johnson-Cadwell, Vesce, Jekabsons ve Yadava, 2007; Reynolds, Malaiyandi, Coash, ve Rintoul, 2004). Hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonu doz-bağımlı olarak glukozla artar. Bu durum glukozun hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunu artırarak nNOS'ı aktive ettiğini göstermektedir. Glukozla meydana gelen nöron ölümü 0,1mM L-NAME ile önlenir. Bu da glukoz toksisitesinde NO'nin etkili olduğunu düşündürmektedir (Koshimura, Tanaka, Murakami ve Kato; 2002).

Nöron hücre kültürlerinde NMDA ile uyarılan ROS üretiminde NADPH oksidaz, NO, cGMP ve protein kinaz-G (PKG) aracılık eder. NADPH oksidaz, postsinaptik nöronlarda NMDA reseptör aktivasyonu esnasında ROS üretir. NADPH oksidazın alt ünitesi NADPH oksidaz 2 (NOX2), NMDA reseptör aktivasyonu sırasında üretilen ROS'un majör kaynağıdır. NO ise NMDA reseptör aktivitesi ve NOX2-bağımlı ROS üretimi arasındaki ilişkide kritiktir (Girouard ve diğerleri, 2009).

Interferon-gamma (IFN-gamma) ve nNOS, SH-SY5Y hücrelerinde bir nörotoksin olan 1-metil-4-fenil piridin (MPP)(+) tarafından oksidatif stres ve hücre ölümü meydana getirilmesinde etkilidir (Titze-de-Almeida, Lustosa, Horst, Bel ve Titze-de-Almeida, 2014). Rekombinant ADI, bir taraftan NO sentezini azaltırken aynı zamanda nNOS aktive olmuş SH-SY5Y hücrelerinde hücrel toksisiteye sebep olur (Lin, Wu, Wei ve Shen, 2014).

Aşırı NO sitotoksik etki göstererek nörodejenerasyona sebep olur. Nöron içine kalsiyum girmesi ve kalmodülüne bağlanması fosforilasyonu tetikleyerek nNOS aktivitesini etkiler. Buna karşılık iNOS'un düzenlenmesi muhtelif sitokinlere cevap olarak yeniden enzim sentezi yoluyla olur. NOS inhibitörleri 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) ile uyarılan dopaminerjik nörotoksiteyi önler. nNOS gen defekti olan mutant fareler MPTP

nörotoksitesine dirençlidir (Ebadi ve Sharma, 2003). Fosforilasyon NO üretiminin azaltılması için nNOS aktivitesinin düzenlenmesinde temel mekanizmadır. Nöronal NOS aşırı ekspresyonu MPTP'nin nörotoksik etkisinde son derece önemli rol oynar. Nörodejenerasyonda nNOS inhibitörlerinin nöron koruyucu etkisi vardır (Yokoyama, Takagi, Watanabe, Kato ve Araki, 2008). Aslında nöronlar kendi nöronal eksitabilitelerinin kontrolunda kendileri tarafından sentez edilen NO'lerini sGC/PKG yolağında kullanırlar (Artinian, Zhong, Yang ve Rehder, 2012). Glutamat reseptörlerinin hiperstimülasyonu NO ürünleri olan nitrit ve nitrat düzeylerini artırır. Glutamatla ATP düzeyi %30-60 düşer. Ancak glutamat verilirken L-NAME ile nNOS inhibisyonu ATP düzeyini daha az düşürür (Sorokina, Reutov, Senilova, Khodorov ve Pinelis, 2007).

2.7. Mitokondrial oksidatif stres ve nöron hasarı

Diyabet ve diyabet komplikasyonları arasında kontrol edilmeyen hiperglisemiye bağlı bir sebep-sonuç ilişkisi vardır. Hiperglisemiye bağlı doku hasarında lipid yapısında ikinci-aracı diaçil gliserol (DAG) sentezine bağlı protein kinaz c (PKC) aktivasyonu, heksozamin yolağının hızlanması, AGE oluşumu ve poliol yolağının hızlanması gibi dört major moleküler mekanizma rol oynar. Diyabet tipik olarak, serbest radikal üretiminde artma veya antioksidan kapasitenin azalması ile birliktedir. Oksidatif stresle birlikte mitokondrial fonksiyonlarda bozulma meydana gelir (Rolo, 2006).

Kronik aşırı beslenme ile gelişen kronik hiperglisemiye insülin direnci izler. Tip 2 diyabet ortaya çıkmadan hemen önce hiperglisemi, dislipidemi ve oksidatif stresle karakterize insülin direnci görülür. Çok sayıda deneysel çalışma sonucunda elde edilen veriler, mitokondrial disfonksiyon, oksidatif stres ve insülin direnci arasında kuvvetli korelasyon olduğunu göstermiştir (Abu Bakar ve diğerleri, 2014). Aşırı ROS oluşumu, nöron hasarı gibi yüksek glukozla birlikte bulunan patolojilerin mekanizmasında önemli rol oynar. Yüksek glukozla maruziyette erken cevap, mitokondrial oksidatif stres (Herlein, Fink ve Sivitz, 2010.). Oksidatif stres, ROS'nin üretimi ile biyolojik sistemlerin meydana gelen ROS'ni detoksifiye etme kapasitesi arasındaki dengesizlik sonucu meydana gelir. Glukoz oksidasyonu bir ROS kaynağı olduğundan glisemik kontrolü yeterli olmayan diyabetik hastada oksidatif stres artar (Giugliano, Ceriello ve Paolisso, 1996). Oksidatif stresin

kaynağı, mitokondrial elektron transport zincirinden aşırı NADH girişi ile meydana gelen redüktif streştir. Mitokondrial kompleks-1’de NADH döngüsünün artması, daha fazla elektron açığa çıkmasına ve daha fazla serbest oksijen radikali üretimine sebep olarak alternatif glukoz yolları olan, poliol ve glikasyon yollarını başlatır. Bu alternatif yollar daha fazla serbest oksijen radikali üretir ve sellüler oksidatif stresi şiddetlendirir (Yan, 2014). Sonuçta geri dönüşsüz mitokondrial disfonksiyon meydana gelir (Graham ve Adler, 2014). Diğer taraftan AGE oluşumu intrasellüler ve ekstrasellüler hasar arasında bir köprüdür. Mitokondrial solunum zinciri proteinlerinin AGE-ilişkili intrasellüler glikasyonu, daha fazla reaktif oksijen radikali üreterek AGE oluşumunu artıran bir kısır döngü oluşturur (Chilelli, Burlina ve Lapolla, 2013). Tip 2 diyabette mitokondrial redoks-stres, mitokondrial membran geçirgenliğini artırır ve proteinleri modifiye eder (Karthia ve diğerleri, 2008). Yüksek glukoz maruz kalan aortik endotelial hücrelerde 24 saatte ROS üretiminin %250 arttığı ve bunun meydana getirdiği lipid peroksidasyonun ise 168 saatte %330 arttığı gösterilmiştir (Giardino, Edelstein ve Brownlee, 1996). Glukoz önce, transisyon metal-bağımlı reaksiyonla bir enediol radikal anyona okside olur. Bu ürün de reaktif ketoaldehitlere ve süperoksit anyon radikallere dönüşür. Süperoksit anyon radikaller dismutasyona giderek hidrojen peroksit meydana getirir. Hidrojen peroksit, katalaz veya GPx’la parçalanmazsa, Fenton reaksiyonu ile son derece reaktif hidroksil radikallere dönüşür (Hunt, Smith ve Wolff, 1990). İkinci olarak ise sitozolik bir enzim olan aldoz redüktaz, yüksek konsantrasyonda intrasellüler glukozu, pentoz fosfat yolağından gelen NADPH’ı kullanarak sorbitole çevirir. Hiperglisemi esnasında bu reaksiyonla NADPH’nin tüketilmesi GPx aktivitesi için gerekli olan redükte glutatyonun rejenerasyonunu inhibe eder (Williamson ve diğerleri, 1993). Üçüncü olarak hiperglisemi yeniden DAG sentezleyerek membranda PKC’yi aktive eder. Sonuçta, hiperglisemi PKC-bağımlı NADPH-oksidaz aktivasyonu ile ROS’nin üretimini uyarır (Inoguchi ve diğerleri, 2000). Dördüncü olarak hiperglisemide glukoz, proteinlerin amino gruplarına ve reaktif dikarbonillere bağlanarak nonenzimatik glikasyonu artırır. Bu reaksiyon AGE oluşumuna sebep olur. Glikasyon ve oksidatif stress son derece yakın ilişkilidir ve bu iki fenomen birlikte gliko-oksidasyon olarak isimlendirilir. Gliko-oksidasyonun tüm basamakları ROS üretir. AGE prekürsörleri ile modifiye olan plazma proteinleri, makrofajlar üzerindeki AGE reseptörlerini aktive eder ve NADPH-oksidaz aracılı intrasellüler oksidatif stresi destekler (Yan ve diğerleri, 1994). Süperoksit radikallerinin detoksifikasyonundan sorumlu Cu-Zn-

süperoksit dismutaz, glikasyon reaksiyonundan sonra fragmantasyona uğrar (Ookawara, Kawamura, Kitagawa ve Taniguchi, 1992). Hipergliseminin mitokondrial elektron transport zinciri aracılığı ile mitokondrial ROS ürettiği gösterilmiştir (Nishikawa ve diğerleri, 2000). Mitokondrial ROS üretiminin diyabetik komplikasyonların meydana gelmesinde son derece önemli olduğu ileri sürülmektedir (Brownlee, 2001). Hücre içi reaktif oksijen radikalleri DNA hasarına sebep olur ve hücre içi oksidatif stresin belirtici olan 8-hidroksideoksi guanozin (8-OHdG) düzeyi yükselir. Fizyolojik koşullarda mitokondrinin ROS'nin major kaynağı olması, mitokondrial DNA (mtDNA)'da histon bulunmaması ve mtDNA mutasyonlarının onarım aktivitesinin son derece sınırlı olması nedeni ile mtDNA oksidatif strese son derece duyarlıdır. İdrarla atılan 8-OHdG miktarı ile HbA1c arasında anlamlı pozitif korelasyon bulunması, tip 2 diyabetli hastada hipergliseminin mitokondrial ROS üretimini artırdığını göstermektedir (Araki ve Nishikawa, 2010).

Diyabetik nöropatide nöronal hasarın en önemli sebebi, yüksek glukoz konsantrasyonu ile ROS'nin üretiminin artması ve apoptozun uyarılmasıdır (Hsu, Tseng ve Lo, 2013; Li ve diğerleri, 2013). Spesifik olarak mitokondrileri hedef alan ve mitokondrial ROS'ni süpüren antioksidanların, yüksek glukozla bağlı mitokondrial oksidatif stres, mitokondrial membran hasarını ve apoptozu önlediği gösterilmiştir (Cao ve diğerleri, 2012). Mitokondrilerden kaynaklanan hücre ölümünün başlamasında en önemli nedenlerden biri MPT porlarında Ca^{2+} bağımlı permeabilite artmasıdır. MPT, ATP sentezinin durmasına, ROS'nin oluşmasına, mitokondri hasarına ve hücre ölümüne sebep olur (Halestrap, 2009; Baines, 2009). Hücre içi Ca^{2+} sinyal iletimi esnasında mitokondri sitozolden önemli miktarda Ca^{2+} alır. Mitokondrial Ca^{2+} birikimi enerji üretimini, hücre içi Ca^{2+} sinyalinin biçimini ve hücre ölümünü kontrol eder. Ca^{2+} alınması son derece seçici iyon kanallarından ve mitokondrial iç membran organellerinde bulunan mitokondrial Ca^{2+} taşıyıcıları aracılığı ile yapılır (Kirichok, Krapivinsky ve Clapham, 2004). Ca^{2+} giren porda, Ca^{2+} transportunu aktive eden iç mitokondrial membranın sitozolik tarafında Ca^{2+} bağlanma bölgesi yer alır (Litsky ve Pfeiffer, 1997; Sparagna, Gunter, Sheu ve Gunter, 1995). Mitokondrial Ca^{2+} taşıyıcısı iki alt üniteden meydana gelir. Bunlardan glikoprotein yapısında olan membranlar arası ünite Ca^{2+} ile aktive olur (Igbavboa ve Pfeiffer, 1991). Mitokondride patolojik Ca^{2+} birikiminin belirtisi iç membranda MPT porları olarak isimlendirilen geniş kanalların açılmasıdır (McGee ve Baines, 2011; Leung ve Halestrap,

2008). MPT porlarının açılması mitokondrial elektrokimyasal potansiyel kaybına, ATP sentezinin durmasına, ROS'nin artmasına, mitokondrial şişme ve membran parçalanmasına ve sonuçta hücre ölümüne sebep olur (Halestrap, 2009; Baines, 2009; Zorov ve diğerleri, 2009). Bu mekanizma ile hücre ölümü hem apoptotik hem de nekrotik olabilir (Schinzel ve diğerleri, 2005). MPT porların açılması nöron hasarında başlatıcı faktördür (Du ve diğerleri, 2008). Son zamanlarda hücre yüzeyinde C1q'nun bağlandığı C1qbp reseptör'nün MPT porların ana komponenti olduğu düşünülmektedir (Starkov, 2010; Ghebrehiwet, Lim, Kumar, Feng ve Peerschke, 2001). C1qbp'nin, MPT porlarının endojen inhibitörü olduğu ve C1qbp-C1q sisteminin hücreyi oksidatif strese karşı koruduğu ileri sürülmektedir (McGee ve Baines, 2011).

2.8. Kompleman bileşeni 1 q ve nöron hasarı

C1q 460 kDa ağırlığında bir kollajen-benzeri hekzamerik glikoproteindir. 6A, 6B ve 6C polipeptidlerinden meydana gelen 6ABC üçlü heliks biçimindedir (Brodsky-Doyle, Leonard ve Reid, 1976; Reid, 1989). C1, klasik kompleman aktivasyon yolağının ilk komponentidir. C1; C1q, C1r ve C1s olmak üzere üç ayrı proteinden meydana gelmiş kompleks bir yapıdır. Normal koşullarda C1q, IgG moleküllerine bağlanarak klasik kompleman yolağını aktive eder. Klasik kompleman yolağının aktive edilmesi C1q'nun immünoglobulinin kristalize olan fragment (Fc) bölgesine bağlanması ile başlatılır. Bu olay, C5'i C5b ve C5a'ya ayıran C5 konvertazın aktive edilmesi ile sonuçlanır. İzleyen basamaklarda C5b, C6, C7 ve C8'e bağlanarak C5b-8 kompleksini meydana getirir (Shen, Halperin ve Lee, 1995). C1q, globüler başlangıç bölgesinde IgG ve IgM bağlanma bölgeleri içerir. Bu bölgesinden immün komplekslere bağlanarak kompleman-aracılı öldürme ve fagositoz görevlerini yüklenir (Leist-Welsh ve Bjornson, 1982; Bobak, Gaither, Frank ve Tenner, 1987). Ölen hücreler, ekstrasellüler matriks proteinleri, pentraksinler, amiloid birikimleri ve DNA gibi endojen ligandlar hem kompleman aktivatörü olan C1q'ya, hem de bir kompleman inhibitörü olan C4b-bağlayıcı proteine (C4BP) bağlanırlar. C4b, C4BP'e bağlandığında klasik kompleman yolağını inhibe eder. C4BP yokluğu ise total kompleman aktivasyonu ile sonuçlanır (Sjöberg, Trouw ve Blom, 2009). Bu mekanizmada C4BP, C1q ile yarışmaya girerek lokal kompleman aktivasyonunu inhibe eder (Sjöberg, Trouw, McGrath, Hack ve Blom, 2006). Plazmadaki C1q düzeyi 70-160 µg/ml'dir (Hughes-Jones, 1977; Schuller ve

Helary, 1983; Dillon, D'Souza, Kurien ve Scofield, 2009). Ancak doğal bağışıklık sisteminin diğer komponentleri gibi, başta makrofajlar ve dendritik hücreler de olmak üzere inflamasyon bölgesinde daha yüksek konsantrasyonda üretilir (Bensa, Reboul ve Colomb, 1983; Schwaeble ve diğerleri, 1995; Kaul ve Loos, 2001; Vegh, Goyarts, Rozengarten, Mazumder ve Ghebrehiwet, 2003; Castellano ve diğerleri, 2004). Plazmada bulunan C1q'nun yaklaşık %80'i Ca^{2+} -bağımlı C1r2–C1s2 tetramerlerle birlikte klasik kompleman sisteminin ilk komponenti olan multimerik C1 kompleksini oluşturur (Muller-Eberhard ve Kunkel, 1961; Lepow, Naff, Todd, Pensky ve Hinz, 1963; Calcott ve Muller-Eberhard, 1972; Reid ve Porter, 1976; Reid, Gagnon ve Frampton, 1982; Sjöholm, Martensson ve Laurell, 1985; Weiss, Fauser ve Engel, 1986). C1q geleneksel olarak klasik kompleman yolacağını başlatan makromoleküler kompleks C1'in tanımlama ünitesi olarak bilinir. Aynı zamanda antikor-bağımlı adaptif ve antikor-bağımsız doğal bağışıklık sistemlerinde de önemli rolü vardır. İnsan monositleri C1 kompleks ve bunun düzenleyicisi olan C1 inhibitörünü sentezlerler (Bensa ve diğerleri, 1983; Randazzo, Dattwyler, Kaplan ve Ghebrehiwet, 1985; Tenner ve Volkin, 1986; Drouet ve Reboul, 1989; Gulati, Lemercier, Guc, Lappin ve Whaley, 1993; Lu, Le, Kon, Chan ve Lee, 1996; Moosig ve diğerleri, 2006). Son zamanlarda periferik kandan izole edilen monositlerin yüzeylerinde C1q taşıdıkları gösterilmiştir (Hosszu, Santiago-Schwarz, Peerschke ve Ghebrehiwet, 2010). Santral sinir sisteminde C1q mikroglialar yanında nöronlar tarafından da sentezlenir (Lynch ve diğerleri, 2004; Stevens ve diğerleri, 2007) C1qbp, MPT por kompleksinin temel komponentidir. C1qbp düzeyinde artışın, peroksitlerle indüklenen MPT por kompleksini inhibe ederek hücre ölümünü engellediği ileri sürülmektedir (McGee ve Baines, 2011). C1q'nun doğrudan kompleman sistemini ilgilendirmeyen işlevlerinde bir hücre yüzey reseptörü olan C1qbp, modülatör olarak rol oynar (Eggleton, Reid ve Tenner, 1998). C1qbp, primer olarak mitokondriyal matrikste yerleşim gösterir ve mitokondrial-bağımlı yolak aracılığı ile apoptozu uyardığı düşünülmektedir (Bkz Şekil 2.1.) (Wang ve diğerleri, 2014). MPT porlarının endojen inhibitörü olan C1qbp siklofilin D (CypD)'ye bağlanarak hücreyi oksidatif strese karşı korur (McGee ve Baines, 2011). CypD, siklofilinlerin mitokondrial izoformudur. MPT porlarının oluşumunda rol oynayarak hücre nekrozuna sebep olur. Oksidatif strese maruz kalan insan nöroblastoma SH-SY5Y hücrelerinde CypD'nin ortamdaki redoks dengesini hedef proteinlere ileten bir sensör olduğu gösterilmiştir (Linard ve diğerleri, 2009). Hücre kültüründe aşırı mitokondrial C1qbp ekspresyonunun MPT por aktivasyonunu

düşündürecek biçimde bir mitokondrial şişme ve kristalarda bozulma meydana getirdiği ileri sürülmektedir (Chowdhury, Ghosh ve Datta, 2008). Bu bulguların aksine C1qbp'nin aşırı ekspresyonunun MPT porlarını inhibe ederek hücreyi ROS'ne karşı koruduğu ve hücre nekrozunu azalttığı iddia edilmektedir. Aslında C1qbp ekspresyonunun azalması MPT porlarının açılmasına sebep olur (McGee ve Baines, 2011). Bugün, C1qbp'nin MPT por oluşumu ile ilgisi iyi bilinmekle birlikte MPT por açılmasında hangi seviyede etkili olduğu ve (Elrod ve Molkentin, 2013) C1q'nun hiperglisemiye bağlı redoks-stres kaynaklı mitokondrial hasarı önleyip önleyemediği bilinmemektedir.

Son yıllarda diyabetin komplikasyonları ile kompleman sistemi arasında ilişki olduğunu düşündüren bulgular gündeme gelmiştir. Bir MAC inhibitörü olan CD59'un, hiperglisemi ile indüklenen glikasyon sonucu inhibe edildiğinde MAC birikimine bağlı doku hasarı geliştiği ileri sürülmüştür. Ghosh ve diğerleri (2013) CD59'un diyabetli hastalarda yüksek olduğunu tespit etmiştir (Ghosh ve diğerleri, 2013). MAC oluşumu için gerekli olan klasik kompleman kaskadının ana bileşenleri C1q, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9 mRNA'larının ve C1q, C3, C9 proteinlerinin, nörotipik SH-SY5Y hücreleri tarafından sentezlendiği gösterilmiştir. SH-SY5Y hücreleri nöronal MAC ekspresyonu ile hücre ölümü arasındaki ilişkinin incelenmesinde uygun bir model olarak kabul edilmektedir. Bu hücrelerde nöronal kompleman kaskadı ile MAC oluşumu uyarıldığında, ortamda endojen kompleman düzenleyici protein, CD59 eksikliği varsa nöronların kompleman-aracılı sitotoksositeye duyarlılığının arttığı bulunmuştur (Shen ve diğerleri, 1998). İnsan nöronlarında kompleman biyosentezinin analizinde insan beyninden saf nöron kültürü elde edilmesi son derece zor olduğundan bunun yerine insan neuroblastoma hücre hattı kullanılmaktadır. İnsan neuroblastoma hücreleri serumda klasik kompleman yolağını spontan olarak aktive etme kapasitesine sahiptir. Bu hücreler, membran kofaktör protein ve CD59'u büyük miktarda eksprese edebilirler (Gasque, Thomas, Fontaine ve Morgan, 1996). Doğal bağışıklık sisteminin önemli bir parçası olan kompleman bileşenleri, hücre ölümünde doğrudan veya C1q ve C3 veya C4 fragmantları gibi opsoninleri üreterek aracılık ederler. SH-SY5Y hücrelerinin IFN-gamma uyarısı altında daha fazla olmak üzere uyarı yapılmadan da C3, C4, C1-inhibitör, C1q, C6, C7 ve C9 eksprese ettikleri gösterilmiştir (Thomas, Gasque, Vaudry, Gonzalez ve Fontaine, 2000). Ancak ortamda yüksek konsantrasyonda glukoz bulunduğunda C1q'nun NMDA reseptör-aracılı oksidatif stres

karşısında koruyucu olarak mı yoksa MAC oluşumu yönünde mi hareket ettiği bilinmemektedir.

2.9. Kompleman düzenleyici protein 59 ve membran atak kompleksi oluşumu

Diyabete bağlı komplikasyonların gelişmesinde kompleman düzenleyici protein CD59'un glikasyonla inaktivasyonunun önemli olduğu ileri sürülmektedir (Acosta ve diğerleri, 2000). Kompleman sistemi; biri diğeri ile ilişkili olan klasik, alternatif ve lektin yolları olarak isimlendirilen üç farklı enzimatik aktivasyon kaskadında yer alan 12'den fazla çözünebilir proteinden meydana gelir. Tüm aktivasyon yolları bir araya gelerek MAC'ini oluştururlar. MAC, C9 kompleman bileşeninin 12-18 monomerinden oluşan sirküler bir polimerdir. İç çapı 5-7 nm olan transmembran porlar oluşturur (Mayer, 1984). MAC porları hücre canlılığını etkilemeden membran geçirgenliğinde geçici ve geri dönüşlü değişiklikler meydana getirebilir (Halperin, Taratuska, Rynkiewicz ve Nicholson-Weller, 1993). Kompleman düzenleyici protein CD59'un da içinde bulunduğu inhibitör proteinler kompleman aktivasyonunu farklı aşamalarda sınırlayarak hücre hasarını önlerler (Bkz Şekil 2.1.). CD59 yaygın olarak eksprese edilen bir glikan fosfatidilinozitol (GPI) ilişkili membran proteini olup MAC oluşumunu engelleyen en önemli inhibitördür. MAC ve hiperglisemi ile uyarılan yolların birbirine yakın olması, MAC-aracılı sinyal iletiminin artmasının CD59'un glikasyonla inaktivasyonunun bir sonucu olduğunu göstermektedir (Qin ve diğerleri, 2004). MAC oluşumunu inhibe eden CD59'un hiperglisemi sonucu gelişen glikasyonla inhibe edilmesi ile MAC birikimi artar. CD59 fosfolipazlar aracılığı ile hücre membranından ayrılarak kanda ve idrarda çözünür halde görülür. Glikasyona uğramış CD59 diyabet komplikasyonlarının patogeneğinde rol oynar ve kan düzeyinin ölçülmesi ise diyabetin tanı ve tedavisinde önemlidir (Ghosh ve diğerleri, 2013). CD59'un inaktivasyonu hedef organlarda kompleman-aracılı doku hasarını artırarak diyabetik komplikasyonlara sebep olur. Glikasyona uğramış CD59 düzeyinin azalması, iki hafta içindeki ortalama haftalık glukoz düzeyindeki azalmayı yansıtır. Glikasyona uğramış CD59 düzeyi HbA1c ile kuvvetli korelasyon gösterir (Ghosh ve diğerleri, 2014). Glikasyon, eritrositlerin MAC-aracılı hemolize duyarlılığını artırır. (Acosta ve diğerleri, 2000).

MAC'nin endotelial hücre membranları içine yerleşmesi büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin serbestleşmesine; hedef organlarda inflamasyon, tromboz ve hücre proliferasyonu görülmesine sebep olur. Bu olay diyabette majör vasküler komplikasyonlarla karakterizedir. CD59'un glikasyonu, MAC'ni inaktive edici fonksiyonunun kaybına sebep olur (Acosta ve diğerleri, 2000). Normal düzeyde CD59 eksprese eden hücrelerde MAC oluşumu ve hasar görülmez, ancak ortamda CD59'u nötralize eden antikolar bulunduğunda veya CD59 glikasyona uğradığında hücre yüzeyinde MAC oluşumu ve morfolojik hasar meydana gelir (Yang, Li, Meri, Rogers ve Shen, 2000).

Kompleman sisteminin hücre yüzeyinde aktivasyonu sonucu MAC ve C5b-8 kompleksi meydana gelir. Hücre kendisini kompleman saldırısından korumak için MAC içine C5b-8'e ilaveten C9'un girmesini engelleyen CD59'u eksprese eder. CD59 sadece büyük MAC oluşumunu inhibe etmekle kalmaz, aynı zamanda hücrelerde yeni MAC oluşumunu, C5b-8 ve C5b-9 komplekslerinin fonksiyonel kanal oluşturmalarını da engeller. Bu koşullarda hücre hasarı meydana getirme kapasitesinde olmayan MAC çeşidi bu kez de hücreyi aktive eder (Farkas ve diğerleri, 2002). Bu modifiye MAC, anti-apoptotik Bcl-2 sentezini artırarak kaspaz-3 aktivasyonunu ve apoptozu inhibe eder (Soane, Rus, Niculescu ve Shin, 1999). CD59, hem C8 hem de C9'la etkileşmektedir (Harada, Okada, Fujita ve Okada, 1990). Membranlarda patolojik porlar; klasik veya alternatif kompleman aktivasyon yolları aracılığı ile C5 konvertazların oluşumu ve bunu takiben MAC komponentlerinin polimerizasyonu sonucu meydana gelir (Sonnen ve Henneke, 2014). C5 konvertaz C5'i C5b ve C5a'ya ayırır. Daha sonra C5b, C6, C7, C8'e bağlanarak C5b-8 kompleksini meydana getirir. C9'un C5b-8'e bağlanması ile C5b-9 ve sonra da MAC meydana gelir. Kompleksin içerdiği C9 sayısı arttıkça, meydana gelen porun genişliği de artar (Shen, Halperin, Benzaquen ve Lee, 1997). CD59, C5b-8 kompleksine sıkıca bağlanarak kompleksin içine çok sayıda C9 moleküllerinin girmesini engeller (Morgan, 1999) ve bu durumda geniş litik porların meydana gelmesi mümkün olmaz. Ortamda CD59 bulunduğu hallerde, tek bir C9 molekülü C5b-8 kompleksine bağlanabilir. Ancak CD59, C5b-8 kompleksinin C9'u hücre membranına yerleştirmesini inhibe ederek komplemanın sitolitik etkisini de engeller (Meri ve diğerleri, 1990). CD59 doğrudan, hem C5b-8 in por oluşturmaya hem de C5b-9 içeren modifiye MAC oluşumuna engel olur (Farkas ve diğerleri, 2002).

2.10. İnsülin ve nöron

İnsülin periferik dokularda insülin reseptörleri aracılığı ile glukoz alımını, kullanımını, glikojen sentezini enzimlerin fosforilasyon ve defosforilasyonunu düzenler. Santral sinir sisteminde insulin reseptörlerinin yüksek konsantrasyonda bulunduğu gösterilmiş, ancak fonksiyonel olarak diğer dokulardan farklı olduğu ileri sürülmüştür. İnsülin reseptörlerinin büyük bölümü nöronlarda bulunur. Sinaptik iletim veya nörotransmitter ve peptid hormonların serbestleşmesinde aracılık ettiği düşünülmektedir (Gammeltoft, Staun-Olsen, Ottesen ve Fahrenkrug, 1984; Unger ve diğerleri, 1989). ROS nörodejeneratif ve metabolik hastalıklarda önemli rol oynar (Butterfield ve Pocernich, 2003; Maritim, Sanders ve Watkins, 2003). ROS, insulin reseptörünün tirozin fosforilasyonuna sebep olarak insulin sinyal iletimini bloke eder ve fosfatidil inozitol-3-kinaz (PI3K) aktivasyonunu ve insulin reseptör substrat (IRS) fosforilasyonunu etkiler (Tirosh, Potashnik, Bashan ve Rudich, 1999). İnsülin kan-beyin bariyerini geçerek santral sinir sistemine girer ve insülin reseptörüne bağlanır, tirozin kinazı aktive eder. Bu olay, daha sonraki sinyal iletim yollarını başlatır. Glutamatla uyarılmış SH-SY5Y hücrelerinde ROS oluşumu iki kat artar. Ancak bu hücrelerde insülinin glutamatla meydana gelen sitotoksisteyi antagonize ederek, 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolyum bromid (MTT) ile saptanan hücre canlılığını artırdığı tespit edilmiştir (Nampoothiri ve diğerleri, 2014). Benzer biçimde Ramalingam ve diğerleri (2014) ortama insulin ilave edildiğinde 200 µM hidrojen peroksitle SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde meydana gelen oksidatif strese karşı koruyucu etki elde edildiğini göstermişlerdir (Ramalingam ve Kim, 2014).

İnsülinin santral sinir sistemi içindeki bilinen fonksiyonlarının çoğunda PI3K/Protein kinaz B (Akt) ve Ras/ MAPK yolları aracılık eder (Banks, Owen ve Erickson, 2012). Hücrenin aktive olması için glukozun metabolize olması gerektiği ileri sürülmektedir. Nitekim hücre içine alınan fakat metabolize edilemeyen 3-o-metil glukoz veya fosforile edilmesine rağmen hücre içine alınamayan veya metabolize edilemeyen 2-deoksi glukoz normal konsantrasyonların üzerinde olsa bile hücreyi aktive edememektedir (Guha, Bai, Nadler ve Natarajan, 2000). Bu sebeple glukoz etkisinin görülebilmesi için öncelikle glukozun hücre içine alınması gerekmektedir. İnsülin, primer glukoz taşıyıcısı olarak eksprese edilen GLUT3'ün nöron plazma membranına translokasyonunu sağlayarak nöronal glukoz alımını

düzenler (Uemura ve Greenlee, 2006). Beyin uzun süre insülin-bağımsız bir organ olarak kabul edilmiş, ancak sonradan insülin reseptörlerinin nöron hücreleri tarafından eksprese edildiği gösterilmiştir (Schuh, Rieder, Rizzi ve Chaves, 2011). İnsülin sinyalinin olmaması, nöronal fonksiyonların bozulmasına ve nöron hasarına neden olur (Stefanelli ve diğerleri, 2014). İnsülin, plazmadan beyne spesifik insülin reseptörleri aracılığı ile taşınır ve bu transport mekanizması yüksek glukoz konsantrasyonu ile doygunluğa ulaşır (Schwartz, Figlewicz, Baskin, Woods ve Porte, 1992). Son zamanlarda ise hipergliseminin insülin sinyal iletiminde, insülin reseptörü ile IRS1 arasındaki etkileşimi inhibe ettiği ileri sürülmektedir. Hipergliseminin bu etkisini IRS1'in serin moleküllerini fosforile ederek yaptığı gösterilmiştir (Ola, 2014). İnsülin, primer glukoz taşıyıcısı olarak eksprese edilen GLUT3'ün nöron plazma membranına translokasyonunu sağlayarak nöronal glukoz alımını düzenler (Uemura ve Greenlee, 2006). Ancak hücre dışı yüksek glukoz maruziyetinde nöron içi eş zamanlı dikarbonil metabolit üretim hızının, sadece glukoz konsantrasyonuna mı, insülin-insülin reseptörü-IRS ve GLUT 3 aktivitesine mi yoksa hepsine birden mi bağlı olduğu iyi bilinmemektedir.

Bu çalışmanın amacı, ADA ve IDF ölçütlerine göre yüksek glukoz maruz kalan dopaminerjik nöronlarda glukotoksisite ve insülin direnci ile ortaya çıkan oksidatif strese bağlı nöronal mitokondrial disfonksiyona ve bunun kompleman sistemine yansımaya, NMDA reseptör blokajı ve nöronal NOS inhibisyonunun etkisini araştırmaktır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü Şartları

3.1.1. Deneylerde kullanılan cihazlar

Santrifüj	Nüve, Türkiye
Derin dondurucu (-80°C)	Thermo, A.B.D.
Derin dondurucu (-20°C)	Arçelik, Türkiye
Sıvı azot tankı	Finemech, A.B.D.
Karbondioksitli inkübatör	Sanyo, Japonya
Steril laminar kabin	Metis, Türkiye
Su banyosu	Nüve, Türkiye
Mikroskop	Leica, Almanya
Vortex	Nüve, Türkiye
Hassas terazi	Denver, A.B.D.
Mikropipetler (1000 µl)	Axygen, İngiltere; Socorex, İsveç
Eppendorf tüp (1,5 ml)	Eppendorf, Almanya
Hücre kültürü plakları (48, 96 kuyucuklu)	Corning, Meksika
Hücre kültürü şişeleri	Corning, Meksika
Falcon tüpler (15 ml, 50 ml)	Corning, Meksika
Stepper pipet	Thermo, A.B.D.
Spektrofotometre	Molecular devices, A.B.D.
ELISA plak yıkayıcısı	Techne, İngiltere

3.1.2. Deneylerde kullanılan kimyasallar

Fötal sıgır serumu (FBS)	Biochrom, Almanya
Tripsin:EDTA (03-053-1B)	Biological Industries, İsrail
EMEM medium (FG 0325)	Biochrom, Almanya
Ham F-12 medium (01-095-1A9)	Biological Industries, İsrail

Non-essential amino asit çözeltisi (01-340-1B)	Biological Industries, İsrail
Antibiyotik:antifungal, steril (03-031-1B)	Biological Industries, İsrail
Dimetil sülfoksit (41640)	Sigma-Aldrich, Almanya
Fosfat tamponu (PBS) (79382)	Sigma-Aldrich, Almanya
Glukoz (0188)	Amresco, A.B.D.
Kinürenik asit (K3375)	Sigma-Aldrich, Almanya
L-NAME (N5751)	Sigma-Aldrich, Almanya
İnsülin	Humalog, Lilly, A.B.D.

Bu çalışmada, SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266™) dopaminerjik insan nöroblastoma hücre hattı kullanıldı. SH-SY5Y hücre hattı çalışmalarımızda kullanılmak üzere Dr. Nathalie Herlin-Boime (CEA-CNRS, Saclay, France) ve Dr. Marie Carriere (CEA, Grenoble, France) tarafından armağan edilmiştir. Hücre kültürü için %15 FBS (Fetal bovine serum), %10 esansiyel olmayan amino asit çözeltisi (Sigma), %0,5 antibiyotik içeren Ham F12 : EMEM (1:1) besi yeri kullanıldı. Hücreler %5 CO₂'li ortamda 37°C'da inkübe edildi.

Hücreler hücre kültürü şişelerinde %70 yoğunluğa ulaştıktan sonra deneyler gerçekleştirildi. SH-SY5Y hücre hattı yapışan hücrelerdir. Bu nedenle pasaj yapılması için hücreler 1:1 fosfat tamponu (PBS) : tripsin-etilen diamintetraasetik asit (EDTA) çözeltisi ile kaldırıldı. Hücreler 1500 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek pellet oluşturuldu ve PBS ile yıkandı. Elde edilen pellet bir miktar besi yeri içerisinde dağıtıldı ve istenilen konsantrasyona %15 FBS içeren besi yeri ile tamamlanarak deneylere devam edildi.

3.2. Deney Planı

Tez kapsamında öncelikle ön denemeler yapıldı ve yapılan deneylere göre ileri aşamada kullanılacak glukoz, insülin, KynA ve L-NAME konsantrasyonlarına karar verildi. Ön denemeler 6 – 24 – 48 – 72 saat inkübasyon sürelerinde gerçekleştirildi. Daha sonraki deneylere ise 24 ve 48 saat inkübasyon sürelerinde devam edildi. Bütün deneyler üçer örnek halinde, üç tekrar olarak gerçekleştirildi.

- 1) Glukoz (120 – 1200 mg/dl)
- 2) İnsülin (10 – 40 – 60 μ U/ml)
- 3) KynA (30 – 300 000 nM)
- 4) Glukoz (120 – 1200 mg/dl) + İnsülin (10 – 40 – 60 μ U/ml)
- 5) Glukoz (120 – 250 mg/dl) + KynA (30 – 300 000 nM)
- 6) Glukoz (120 – 250 mg/dl) + İnsülin (40 μ U/ml) + KynA (30 – 300 000 nM)
- 7) L-NAME (25 – 1000 μ M)
- 8) L-NAME (25 – 1000 μ M) + Glukoz (120 – 250 mg/dl)
- 9) L-NAME (25 μ M) + Glukoz (120 – 250 mg/dl) + İnsülin (40 μ U/ml)

3.2.1. Glukoz

Hücreleri rutin olarak büyütmek için kullanılan besi yerinin içeriğinde 120 mg/dl glukoz bulunmaktadır. Diyabetin ADA tarafından önerilen güncel tanı kriterleri; klasik hiperglisemi belirtileri gösteren veya hiperglisemik krizler gelişen ve randomize olarak plazma glukoz düzeyi 200 mg/dl (11,1 mmol/l)'den yüksek olan hastalarda, glikasyona uğramış hemoglobinin %6,5'dan fazla, açlık plazma glukoz düzeyinin 126 mg/dl (7,0 mmol/l) den yüksek ve oral glukoz tolerans testi esnasında ikinci saattaki plazma glukoz düzeyinin ise 200 mg/dl (11,1 mmol/l)'dan yüksek olmasıdır (Alqahtani ve diğerleri, 2013). Buna bağlı olarak bazal besi yeri glukoz konsantrasyonundan başlanılarak artan 11 konsantrasyonda ortama glukoz ilave edilmiştir. Elde edilen verilere göre, hücrelerin 200 mg/dl'nin üzerinde glukozla 48 saat maruz kalmaları ile hücre canlılığı azalarak artan konsantrasyonlarda da bir plato çizmektedir.

Glukoz çözeltisi hazırlanışı: Besi yeri 120 mg/dl glukoz içerdiği için hazırlanacak konsantrasyonlar bu düzey göz önünde bulundurularak yapıldı. 150 – 1200 mg/dl glukoz çözeltileri hazırlamak için 30 – 1080 mg/dl çözeltiler hazırlanarak ilave edildi. Hazırlanan çözeltiler 0,2 μ m steril filtreden geçirilerek sterilize edildi.

3.2.2. İnsülin

SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde insülin direncinin oluşturulabilmesi için insülin konsantrasyonu Cersosimo ve ark. (Cersosimo, Solis-Herrera, Trautmann, Malloy ve Triplitt, 2014) ve Huh ve ark. (Huh ve diğerleri, 2014) tarafından yapılan çalışmalar da göz önünde bulundurularak ortama 10 – 40 – 60 μ U/ml insülin ilave edilerek deneyler gerçekleştirilmiştir.

İnsülin çözeltisi hazırlanışı: 100 U/ml insülin çözeltisinden besi yeri içinde 1/1000 dilüsyon ile ara stok çözeltisi hazırlandı (100 mU/ml). Besi yeri ile dilüsyon yapılarak 10 μ U/ml, 40 μ U/ml ve 60 μ U/ml konsantrasyonlarda çalışma çözeltileri hazırlandı.

3.2.3. Kinürenik asit

KynA triptofan metabolizması sonucunda açığa çıkan endojen metabolitlerdendir (Stone, 2000). Özgün ve en etkin NMDA reseptör blokajı yapacak dozu belirlemek amacıyla SH-SY5Y hücreleri 30 – 300.000 nM arasındaki 11 farklı konsantrasyonda KynA'e maruz bırakılarak total mitokondrial metabolik aktivite/hücre canlılıkları test edildi.

Kinürenik asit çözeltisi hazırlanışı: 30 – 300.000 nM arasındaki 11 farklı konsantrasyonda KynA çözeltisi besi yeri içerisinde çözülerek hazırlandı. Hazırlanan çözeltiler 0,2 μ m steril filtreden geçirilerek sterilize edildi.

3.2.4. Nw -nitro-L-arginin metil ester

Spesifik olmayan NOS inhibitörüdür. SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri nöronal NOS eksprese ederler ve L-NAME ile inhibe edilerek NO sentezi azalması sağlanır. Yapılan çalışmalarda 25 – 1000 μ M konsantrasyonlarda L-NAME kullanılarak NOS inhibisyonu gözlenmiştir. Bu çalışmada SH-SY5Y hücreleri için uygun olan konsantrasyonların seçilmesi için ön çalışma yapıldı.

L-NAME çözeltisi hazırlanışı: 25 – 1000 μ M arasındaki konsantrasyonda besi yeri içerisinde çözülerek hazırlandı. Hazırlanan çözelti 0,2 μ m steril filtreden geçirilerek sterilize edildi.

3.2.5. Deneyler

Glukoz, insülin ve/veya KynA ve/veya L-NAME çözelti birlikt e ilave edildikleri durumda glukoz çözeltisi ilave edildikten 30 dakika sonra insülin çözelti, eğer ilave edilecekse 30 dakika sonra KynA çözeltisi hücre kültürü ortamına eklendi. L-NAME ile inkübasyonda ise diğer çözelti eklenmesinden 30 dakika önce L-NAME ilavesi ile yapıldı. Diğer çözelti ilave edilme sıralaması anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Deneylerde ve bulgularda kontrol olarak ifade edilen grup sadece medium ile inkübe edildi.

Deney planına göre hücreler 6 – 24 – 48 ve 72 saat ve 11 ayrı konsantrasyonda glukoz a maruz bırakılarak hücre canlılığındaki değişim MTT testi ile tayin edildi.

Sadece glukoz ile inkübasyonu takiben hücreler 6 – 24 – 48 ve 72 saat süre ile 11 ayrı konsantrasyondaki glukoz ile birlikte 10 – 40 veya 60 μ U/ml insüline maruz bırakılarak hücre canlılıklarındaki değişim MTT testi ile tayin edildi.

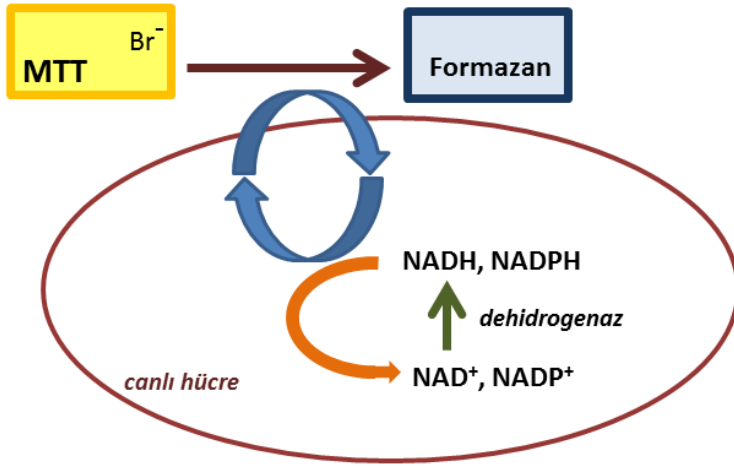
MTT testleri sonucunda ileri deneylerde kullanılacak;

1. İnkübasyon sürelerinin 24 ve 48 saat,
2. Glukoz konsantrasyonlarının 150 – 200 ve 250 mg/dl,
3. İnsülin dozunun 40 μ U/ml,
4. Çalışılacak KynA konsantrasyonunun 30 nM,
5. L-NAME konsantrasyonunun 25 μ M olmasına karar verildi.

Ön deneylerde ve kullanılmasına karar verilmiş doz ve inkübasyon sürelerinde gerçekleştirilen deneylerde canlı hücre sayısının tespit edilebilmesi için hücreler tripan mavisi ile boyanarak sayıldı. Hücrelerin metabolik aktivitesi, % hücre canlılığının hücre sayısına bölünmesi ile elde edildi (%Hücre canlılığı/hücre sayısı).

3.3. Hücre Canlılığı Tayini

Deney planında belirtilen her konsantrasyonda hücre canlılığı MTT testi ile tayin edildi. MTT testi için her kuyucuğa 10.000 hücre ekildi. Deneyler protokolde anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Deneyin esası canlı hücrelerin sarı renkli MTT bileşiğini canlı hücrelerin mor renkli formazana indirgemelerine, daha sonra çözünür hale getirilen bu formazan kristallerinin absorbandsının spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanmaktadır (Mosmann, 1983). Hücre canlılığı deneylerinin sonunda ileri aşamalarda kullanılacak inkübasyon sürelerine ve madde konsantrasyonlarına karar verildi.



Şekil 3.1. MTT deneyinin esası (MTT: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolyum bromid)

3.3.1. MTT deneyinde kullanılan alet ve gereçler

Vorteks	Nüve, Türkiye
Spektrofotometre	Molecular Devices, A.B.D.
Mikropipet (0.1-1000 µl)	Axygen, İngiltere; Socorex, İsveç
Çok kanallı mikropipet (30-300 µl)	Thermo, A.B.D.
96 kuyucuklu hücre kültürü plağı	Corning, Meksika

3.3.2. MTT deneyinde kullanılan çözeltiler

3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) (20395)	Serva, Almanya
Hidroklorik asit, %37 (100317)	Merck, A.B.D.
Sodyum dodesil sülfat (SDS) (71725)	Sigma-Aldrich, Almanya
PBS (79382)	Sigma-Aldrich, Almanya

- 1. PBS çözeltisi:** Ticari olarak hazır bulunan PBS tabletlerinden her biri 100 ml distile suda çözülerek hazırlandı. Çözeltiler otoklavda sterilize edildi.
- 2. MTT çözeltisi:** MTT 5mg/ml olacak şekilde PBS içerisinde çözülerek hazırlandı.
- 3. 0,01 M Hidroklorik asit (HCl) çözeltisi:** 82,81 ml %37'lik HCl asit çözeltisinden alınarak 1000 ml'ye distile su ile tamamlandı.
- 4. %10 sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi:** 50 g SDS tartılarak 500 ml 0,01 M HCl içinde çözüldü.

3.3.3. MTT deney protokolü

Deney protokolü aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi.

- 10.000 hücre/ kuyucuk şeklinde hücreler 96 kuyucuklu plaklara ekildi.
- Hücreler plaklarda 24 saat inkübe edildi ve 24. saat sonunda inkübasyon çözeltileri ilave edildi.
- Hücrelerin üzerine inkübasyon çözeltileri ilave edilerek son hacim 100 µl olacak şekilde ayarlandı.
- İnkübasyonu gerçekleştirilecek olan çözelti ilave edildikten sonra 6 – 24 – 48 – 72 saat inkübasyon süreleri beklendi.
- Her kuyucuğa 10 µl PBS içinde 5mg/ml hazırlanan MTT çözeltisi ilave edildi.
- 4 saat MTT çözeltisi ile inkübasyon sonunda 100 µl 0,01 M hidroklorik asit içerisindeki %10'luk SDS çözücü çözeltisi ilave edildi.
- Bir gece inkübasyon sonunda örneklerin absorbansları 550 nm ve 690 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü.

8. Örnek kuyucuklarındaki hücrelerin canlılıkları kontrol kuyucuklarından elde edilen absorbanslarla oranlanarak elde edildi.
9. Bütün örneklerin 550 nm'deki absorbanslarından 690 nm'deki absorbansları çıkartılarak hesaplamalar yapıldı. Hücre içermeyen kuyucuklarla tekrarlanan örnekler kör olarak kullanıldı.

3.4. Tripan Mavisi ile Hücre Sayılması

1. 100.000 hücre/ kuyucuk olacak şekilde hücreler 48 kuyucuklu plaklara ekildi.
2. Hücreler plaklarda 24 saat inkübe edildi ve 24. saat sonunda inkübasyon çözeltileri ilave edildi.
3. Hücrelerin üzerine inkübasyon çözeltileri ilave edilerek son hacim 500 µl olacak şekilde ayarlandı.
4. İnkübasyon süreleri (6 – 24 – 48 – 72 saat) tamamlandıktan sonra süpernatantlar toplandı.
5. Hücreler yapışma özelliğine sahip oldukları için 1:1 PBS ile dilüe edilmiş tripsin:EDTA çözeltisi ile kaldırıldı.
6. Hücreler PBS ile dağıtıldıktan sonra tripan mavisi ile 1/10 konsantrasyonda karıştırılarak "Thoma lamı" kullanılarak sayıldı.

Hücre başına düşen metabolik aktivitenin bulunması için MTT değerleri hücre sayısına (Cc) bölündü.

3.5. Nitrit-Nitrat, Kompleman Bileşenleri ve Glukoz taşıyıcı 3 Tayinleri

Tripan mavisi ile sayılmak için çözeltilerle inkübe edilerek toplanan süpernatantlarda ve deneyler tekrarlanarak elde edilen hücre lizatlarında ölçümler yapıldı.

3.5.1. Nitrit – nitrat tayini

NO'in biyolojik sistemlerde doğrudan ölçümü, çok düşük miktarlarda bulunması ve açığa çıkması sonrasında yarı ömrünün 10 saniyeden kısa olması, hızla oksijenle reaksiyona

girmesi nedeniyle oldukça zordur. Bu nedenle NO'nin daha stabil ürünleri olan nitrit (NO_2) ve nitrat (NO_3) ölçümleri yapılmaktadır. Bu çalışmada açığa çıkan NO düzeyini tayin etmek için NO_2 ve NO_3 [NO_x] miktarları diazotiazon yöntemi ile ölçülmüştür.

Nitrit – nitrat ölçümünde kullanılan Alet ve gereçler

Vorteks	Nüve, Türkiye
Spektrofotometre	Molecular Devices, A.B.D.
Mikropipet (0.1-1000 μl)	Axygen, İngiltere; Socorex, İsveç
Çok kanallı mikropipet (30-300 μl)	Eppendorf, Almanya
96 kuyucuklu hücre kültür plağı	Corning, Meksika

Nitrit – nitrat ölçümünde kullanılan kimyasal maddeler

Fosforik asit, %85	Merck, Almanya
Sülfanilamid (S9251)	Sigma-Aldrich, Almanya
N-(1-naftil) etildiamin (NED) (N9125)	Sigma-Aldrich, A.B.D.
Vanadyum klorür (208272)	Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum NO_2 (237213)	Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum NO_3 (S550&)	Sigma-Aldrich, Almanya

Nitrit – nitrat ölçümünde kullanılan çözeltiler

% 5'lik fosforik asit (H_3PO_4) çözeltisi: 1,18 ml %85'lik H_3PO_4 çözeltisinden alınarak distile su ile 20 ml'ye tamamlandı.

% 1 Sülfanilamid: 46 mg sülfonamid tartıldı, 4600 μl %5'lik H_3PO_4 çözeltisi içerisinde çözüldü.

% 0,1 N-(1-naftil) etildiamin (NED): 4,6 mg NED tartıldı, 4600 μl distile su içerisinde çözüldü.

0,05 M Vanadyum (III) klorür: 160 mg vanadyum (III) klorür tartılarak 20 ml 1 M HCl içinde çözüldü.

1 M HCl: 3,3 ml %37'lik HCl asit çözeltisinden alınarak 40 ml'ye distile su ile tamamlandı.

Griess reaktifi: Deneyden hemen önce Sülfanilamid ve NED çözeltileri 1:1 oranda karıştırılarak hazırlandı.

Stok sodyum NO₂ çözeltisi: 1 mg sodyum NO₂ tartıldı, 1000 µl distile suda çözülerek ara stok hazırlandı. Bu çözeltiden 13,8 µl alınarak 1000 µl'ye tamamlandı ve dilüsyonlar ile standart çözeltiler hazırlandı.

Sodyum NO₂ standartlarının hazırlanışı: 200 µM stok sodyum NO₂ çözeltisinden distile su ile dilüe edilerek 200 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM, 3,125 µM, 1,5625 µM ve 0,78125 µM konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlandı.

Stok sodyum NO₃ çözeltisi: 1 mg sodyum NO₃ tartıldı, 1000 µl distile suda çözülerek ara stok hazırlandı. Bu çözeltiden 17 µl alınarak 1000 µl'ye tamamlandı ve dilüsyonlar ile standart çözeltiler hazırlandı.

Sodyum NO₃ standartlarının hazırlanışı: 200 µM stok sodyum NO₃ çözeltisinden distile su ile dilüe edilerek 200 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM, 3,125 µM, 1,5625 µM ve 0,78125 µM konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlandı.

Yöntemin dayandığı prensip

Yöntemde Griess Reaksiyonu kullanılmaktadır. Yöntemin esası, NO₂'in asidik ortamda primer bir aromatik aminle (sülfanilamid) diazotizasyonu ve NED ile mor renkli bir azo türevi oluşturmaya dayanır. Oluşan kompleksin absorbanşı 540 nm'de ölçüldü. Örneklerdeki NO₃ vanadyum (III) klorür ile NO₂'e indirgenerek tayin edildi (Miranda, Espey ve Wink, 2001).

Deney yöntemi

1. 100 µl örnek / standart / kör üzerine 100 µl etanol ilave edildi ve karıştırılarak 30 dakika +4°C'de inkübe edildi.
2. Örnekler 14000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek süpernatantlar ayrıldı.
3. NO₂ ölçümü için 70 µl süpernatant/standart/kör üzerine 70 µl Griess reaktifi ilave edildi.

NO₃ ölçümü için 70 µl süpernatant/standart/kör üzerine 70 µl vanadyum (III) klorür ve 70 µl Griess reaktifi ilave edildi.

4. Çözeltiler 45 dakika 37°C'de inkübe edildikten sonra oluşan renkli kompleksin absorbansı 540 nm'de spektrofotometrede okundu.

Hesaplamalar

Absorbanları okunan NO₂ ve NO₃ [(NO₃+NO₂)] standartlar yardımıyla kalibrasyon doğrusu çizilerek örneklerin konsantrasyonları hesaplandı. NO₂ ve NO₃ konsantrasyonları toplanarak değerler µM [NO_x] şekline verildi. Hesaplanan [(NO₃+NO₂)] değerleri Cc ile bölünerek hücre başına düşen [(NO₃+NO₂)] miktarı hesaplandı.

Ortamda ölçülen [(NO₃+NO₂)]/Cc'nin meydana getirdiği oksidatif stresin şiddeti, mitokondride [NADPH+-NADP+]-[GSSG-GSH] döngüsünün fonksiyonu olan MTT/Cc'ye oranı ile belirlenmiştir. Bu çalışmada oksidatif stres $Q = \frac{[(NO_3+NO_2)]}{Cc} \cdot \frac{MTT}{Cc}$ oranı olarak hesaplanmıştır.

3.5.2. Kompleman bileşeni C1q tayini

Kompleman bileşeni C1q, klasik kompleman aktivasyon yolağında görevli C1 kompleksinin tanıma alt ünitesidir. Hücre kültürü süpernatantlarındaki C1q düzeyleri sandviç ELISA tekniği ile tayin edildi (AssayPro, USA). Poliklonal C1q spesifik antikor kaplı plaklar ile süpernatantlardaki C1q düzeyleri immobilize antikor ve biyotinle bağlı poliklonal C1q spesifik antikor ile sandviç tekniği kullanılarak kantitatif olarak tayin edildi. Deneyler protokolde anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Örneklerde ölçülen bütün C1q düzeyleri, kitin minimum tayin edebilme limiti olan 0,03 ng/ml'den yüksek olarak bulundu.

Hücre kültürü süpernatantlarının hazırlanması: Çalışma çözeltileriyle inkübe edilmiş SH-SY5Y hücrelerinin süpernatantları toplandı. Süpernatantlardaki kalıntıların uzaklaştırılması için 3000 x g'de 10 dakika santrifüjlendi. Örnekler çalışma gününe kadar -20°C'de saklandı.

Yöntem

1. Kuyucuklara 50 µl örnek/standart eklendi ve 2 saat inkübe edildi.
2. İnkübasyon sonunda 6 defa 300 µl yıkama çözeltisi ile kuyucuklar yıkandı.
3. Kuyucuklara 50 µl biyotinlenmiş insan C1q antikoru ilave edildi ve 1 saat inkübe edildi.
4. Kuyucuklara 50 µl streptavidin-peroksidaz konjugatı ilave edildi ve 30 dakika inkübe edildi.
5. Plaklar 6 defa 300 µl yıkama çözeltisi ile yıkandı.
6. Kuyucuklara 50 µl kromojen substratı ilave edildi ve 15 dakika inkübe edildi.
7. Kuyucuklara 50 µl durdurma çözeltisi ilave edildi ve oluşan renk absorbansı 450 nm ve 570 nm’de okundu. Hesaplamalar 450 nm’deki absorbanstan 570 nm’deki absorbanstan çıkartılarak yapıldı.

Hesaplamalar

Absorbansları okunan standartlar yardımıyla kalibrasyon doğrusu çizilerek örneklerin konsantrasyonları ng/ml cinsinden hesaplandı. C1q miktarları süpernatantlarda ölçülmüş olması nedeniyle hesaplanan C1q düzeyleri besi yerinden elde edilen değere bölündü. Daha sonra bu veriler Cc’ye bölünerek hücre başına düşen C1q miktarı hesaplandı.

3.5.3. Kompleman düzenleyici protein 59 tayini

CD59, kompleman membran atak kompleksinin potent inhibitörüdür. SH-SY5Y hücre kültürü süpernatantlarında CD59 glikoproteini çift antikorlu olan sandviç ELISA yöntemi ile ölçüldü (Hangzhou Eastbiopharm, Co. Ltd.). Önceden insan CD59 glikoprotein monoklonal antikorları ile kaplanmış ELISA plakları kullanıldı. Biyotinle işaretli CD59 antikorları ve streptavidin-HRP kullanılarak immün kompleks oluşumu kromojen çözeltisi aracılığıyla meydana gelen renk değişimi ile ölçüldü. Deneyler protokolde anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Örneklerde ölçülen bütün CD59 düzeyleri, kitin minimum tayin edebilme limiti olan 0,00723 ng/ml’den yüksek olarak bulundu.

Hücre lizatlarının hazırlanması

1. Çalışma çözeltileriyle inkübe edilmiş SH-SY5Y hücrelerinin süpernatantları toplandı.
2. Plaklarda yapışık kalan hücreler soğuk PBS çözeltisi ile yıkandı.
3. Hücreler bir gece -20°C’de bekletildi.
4. Hücrelerin üzerine 250 µl 37°C’ye ısıtılmış PBS ilave edildi.
5. Hücreler 3 defa dondurulup çözöldüler.
6. PBS içinde çözölmüş hücreler +4°C’de, 5 dakika 13.000xg’de santrifüjlenerek kalıntılar uzaklaştırıldı.
7. Süpernatantlar çalışma gününe kadar -20°C’de saklandı.

Yöntem

1. Kuyucuklara 40 µl örnek, 10 µl CD59 antikoru ve 50 µl Streptavidin-HRP eklendi ve 1 saat 37°C’de inkübe edildi.
2. İnkübasyon sonunda 6 defa 300 µl yıkama çözeltisi ile kuyucuklar yıkandı.
3. Kuyucuklara 50 µl kromojen çözeltisi A ve 50 µl kromojen çözeltisi B ilave edilerek 10 dakika 37°C’de inkübe edildi.
4. Kuyucuklara 50 µl durdurma çözeltisi ilave edildi ve oluşan renk absorbansı 450 nm’de okundu.

Hesaplamalar

Absorbansları okunan standartlar yardımıyla kalibrasyon doğrusu çizilerek örneklerin konsantrasyonları ng/ml cinsinden hesaplandı. Elde edilen CD59 miktarları Cc ile bölünerek hücre başına üretilen CD59 konsantrasyonu hesaplandı.

3.5.4. Glukoz taşıyıcı 3 tayini

Glukoz taşıyıcısı 3 [(GLUT3) aynı zamanda “solüt taşıyıcı ailesi 2, 3. üyesi” veya “kolaylaştırılmış glukoz taşıyıcısı 3 (SLC2A3)” olarak da adlandırılır] proteini SLC2A3 geninde kodlanır (Kayano ve diğerleri, 1988). GLUT3 memeli hücrelerinde glukozun

plazma membranlarından taşınmasını kolaylaştırır. GLUT3 çeşitli dokularda eksprese edilse de temel olarak nöronlarda eksprese olur (Vannucci, Maher ve Simpson, 1997). GLUT3'ün glukoza afinitesi GLUT1, GLUT2 ve GLUT4'den 5 kat daha yüksektir, ancak nöronal glukoz düzeyleri serumdan 5 kat daha düşüktür (Simpson ve diğerleri, 2008). GLUT3 kiti ile tayinde çift-antikor sandviç ELISA yöntemin kullanıldı (Hangzhou Eastbiopharm, Co. Ltd.). Önceden GLUT3 monoklonal antikoru ile kaplanmış plak kuyucuklarına örnekler ilave edilerek inkübasyona bırakıldı. Daha sonra Streptavidin-HRP ile kombine biyotinle işaretli GLUT3 antikorları immün kompleks yapmak üzere ilave edildi. Kromojen çözeltisi aracılığıyla meydana gelen renk değişimi ile ölçüldü. Deneyler protokolde anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi.

Hücre lizatlarının hazırlanması

1. Çalışma çözeltileriyle inkübe edilmiş SH-SY5Y hücrelerinin süpernatantları toplandı.
2. Plaklarda yapışık kalan hücreler soğuk PBS çözeltisi ile yıkandı.
3. Hücreler bir gece -20°C'de bekletildi.
4. Hücrelerin üzerine 250 µl 37°C'ye ısıtılmış PBS ilave edildi.
5. Hücreler 3 defa dondurulup çözüldüler.
6. PBS içinde çözülmüş hücreler +4°C'de, 5 dakika 13000xg'de santrifüjlenerek kalıntılar uzaklaştırıldı.
7. Süpernatantlar çalışma gününe kadar -20°C'de saklandı.

Yöntem

1. Kuyucuklara 40 µl örnek, 10 µl GLUT3 antikoru ve 50 µl Streptavidin-HRP eklendi ve 1 saat 37°C'de inkübe edildi.
2. İnkübasyon sonunda 6 defa 300 µl yıkama çözeltisi ile kuyucuklar yıkandı.
3. Kuyucuklara 50 µl kromojen çözeltisi A ve 50 µl kromojen çözeltisi B ilave edilerek 10 dakika 37°C'de inkübe edildi.
4. Kuyucuklara 50 µl durdurma çözeltisi ilave edildi ve oluşan renk absorbansı 450 nm okundu.

Hesaplamalar

Absorbansları okunan standartlar yardımıyla kalibrasyon doğrusu çizilerek örneklerin konsantrasyonları ng/ml cinsinden hesaplandı. Elde edilen GLUT3 miktarları Cc ile bölünerek hücre başına üretilen GLUT3 konsantrasyonu hesaplandı.

3.6. İstatistiksel Analiz

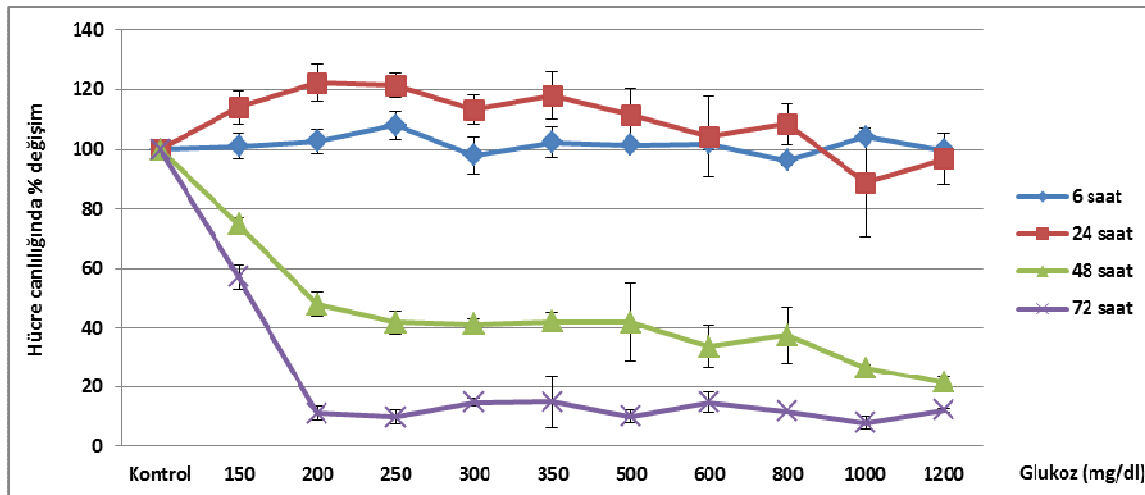
İstatistiksel analizler için SPSS, versiyon 13.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) programı kullanıldı. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata (Ort $\pm$ SH) olarak gösterildi. Hücre sayısına (Cc) bölünerek gösterilen bütün veriler 10.000 hücre başına düşen konsantrasyonu ifade etmektedir. Gruplardaki değişimler non-parametrik Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi ve $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Korelasyon analizleri için “Spearman’s rank” korelasyon testi kullanıldı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Hücre Canlılığındaki Değişimlerin Değerlendirilmesi

4.1.1. Glukoz

SH-SY5Y dopaminerjik hücreler 150 – 1200 mg/dl arasında 11 farklı konsantrasyonda glukozu 6 – 24 – 48 ve 72 saat süresince maruz bırakılarak total mitokondrial metabolik aktivite/hücre canlılıkları MTT testi ile değerlendirildi (Bkz Şekil 4.1.).

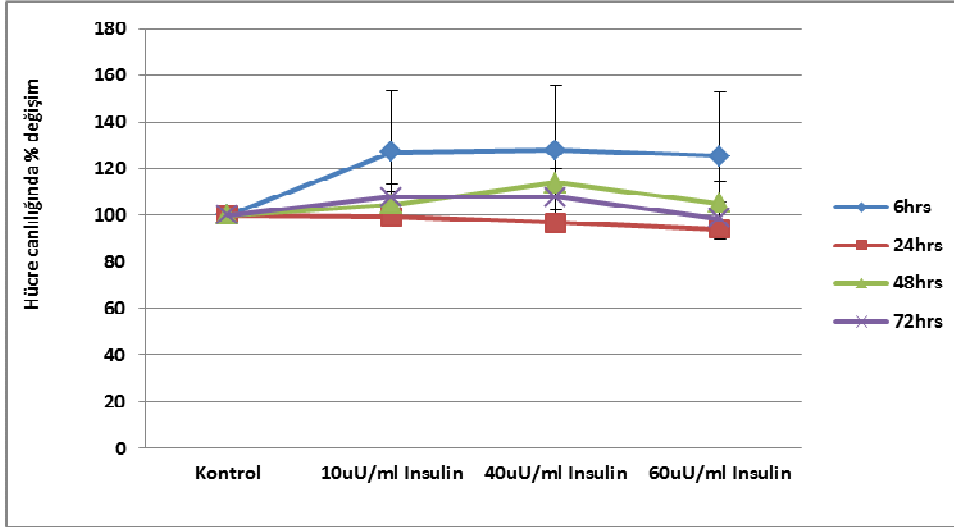


Şekil 4.1. Farklı glukoz konsantrasyonlarına maruz bırakılan hücrelerin farklı inkübasyon süreleri sonunda canlılıklarındaki değişim

Hücrelerin bir yaşam döngülerini sağlamak için geçirdikleri bölünme süresi 24 saattir. Elde edilen verilere göre 6 saat inkübasyonun hücre canlılığında değişiklik meydana getirmezken hücre canlılığının 72 saat sonunda %10 ve altındaki düzeylere düştüğü tespit edildi. Bu verilere göre, hücrelerin bölünme hızı da gözönünde bulundurularak ileri deneylerde çalışılmak üzere 24 ve 48 saat inkübasyon sürelerinin uygun olduğuna karar verildi.

4.1.2. Glukoz ve insülin

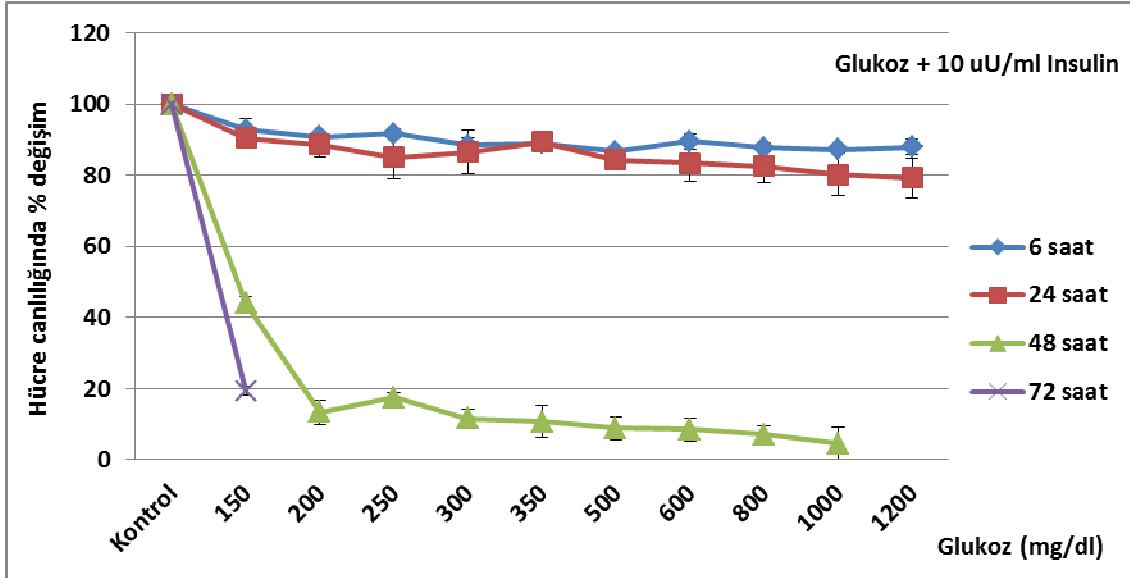
Bu çalışmada, 10 – 40 – 60 μ U/ml insülin ve 150 – 1200 mg/dl arasındaki 11 farklı konsantrasyonda glukoza 6 – 24 – 48 ve 72 saat süresince maruz bırakılan SH-SY5Y hücrelerinin canlılıklarındaki değişimler MTT testi ile değerlendirildi.



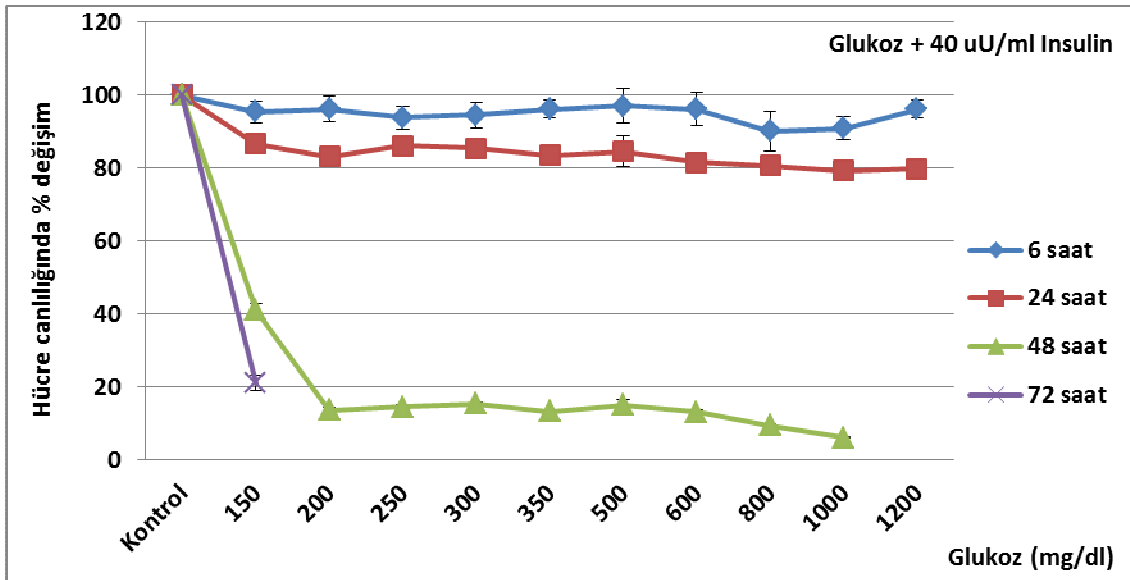
Şekil 4.2. Farklı dozlarda insüline maruz bırakılan hücrelerin farklı inkübasyon süreleri sonunda canlılıklarındaki değişim

Elde edilen verilere göre farklı insülin dozlarının farklı inkübasyon süreleri sonunda hücre canlılığında azalmaya neden olmadığı tespit edildi (Bkz Şekil 4.2.).

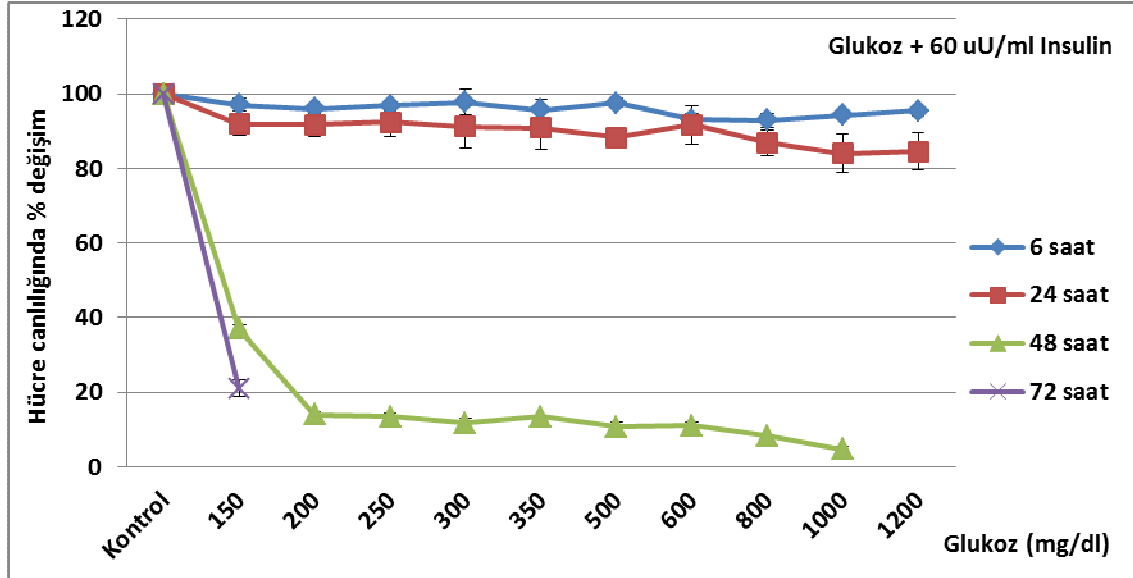
Daha sonra hücreler farklı dozlarda insülin ile birlikte farklı konsantrasyonlarda glukoza dört ayrı inkübasyon süresinde maruz bırakıldı. Ancak glukoz ve insüline tek başına maruz kalmalarından farklı olarak ikinci 24 saat inkübasyon süresinde 150 mg/dl glukoza maruziyette bile hücre canlılığının %50'nin altına düştüğü, üçüncü 24 saatte ise ortamda 150 mg/dl'den fazla glukoz ve insülinin birlikte bulunduğu koşullarda hücrelerin tamamen öldüğü tespit edildi (Bkz Şekil 4.3., Şekil 4.4., Şekil 4.5., Resim 4.1.).



Şekil 4.3. 10 μ U/ml insülin ve farklı glukoz konsantrasyonlarına maruz bırakılan hücrelerin farklı inkübasyon süreleri sonunda canlılıklarındaki değişim



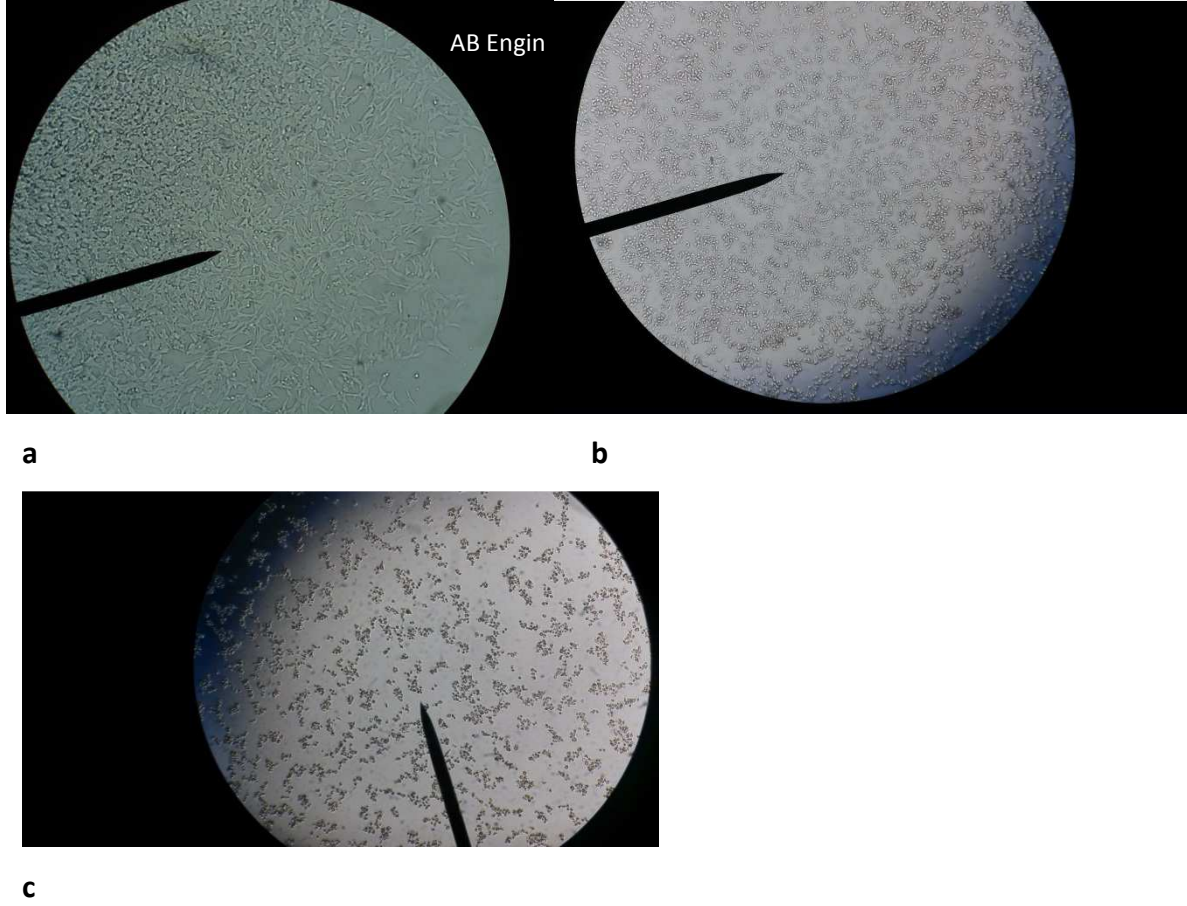
Şekil 4.4. 40 μ U/ml insülin ve farklı glukoz konsantrasyonlarına maruz bırakılan hücrelerin farklı inkübasyon süreleri sonunda canlılıklarındaki değişim



Şekil 4.5. 60 μ U/ml insülin ve farklı glukoz konsantrasyonlarına maruz bırakılan hücrelerin farklı inkübasyon süreleri sonunda canlılıklarındaki değişim

Elde edilen bulgulara göre 250 mg/dl'nin üzerindeki konsantrasyonlarda glukozun hücre canlılığına benzer etkileri olduğu gözlemlendi. Bu nedenle ADA ve IDF kriterleri de dikkate alınarak ileri deneylerin yapılması için 150 – 200 – 250 mg/dl glukoz konsantrasyonlarının seçilmesine karar verildi.

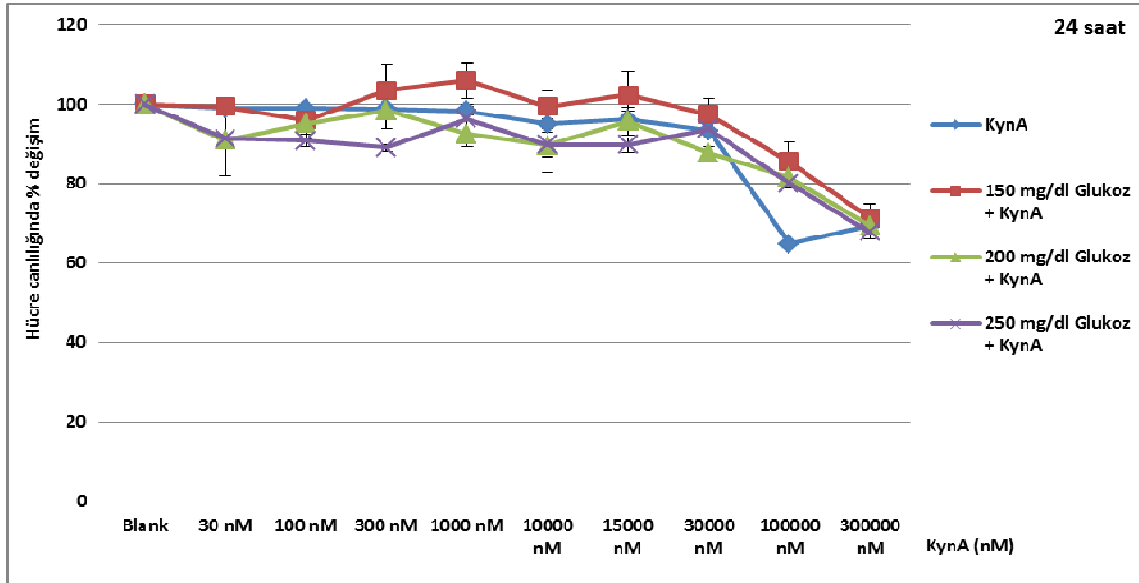
Bizim bulgularımız ile Cersosimo ve ark. (Cersosimo ve diğerleri, 2014) ve Huh ve ark. (Huh ve diğerleri, 2014) tarafından yapılan çalışmalar da gözönünde bulundurularak belirlenen yüksek glukoz konsantrasyonlarına insulin direncinin meydana geldiği 40 μ U/ml insulinin ilave edilmesine karar verildi.



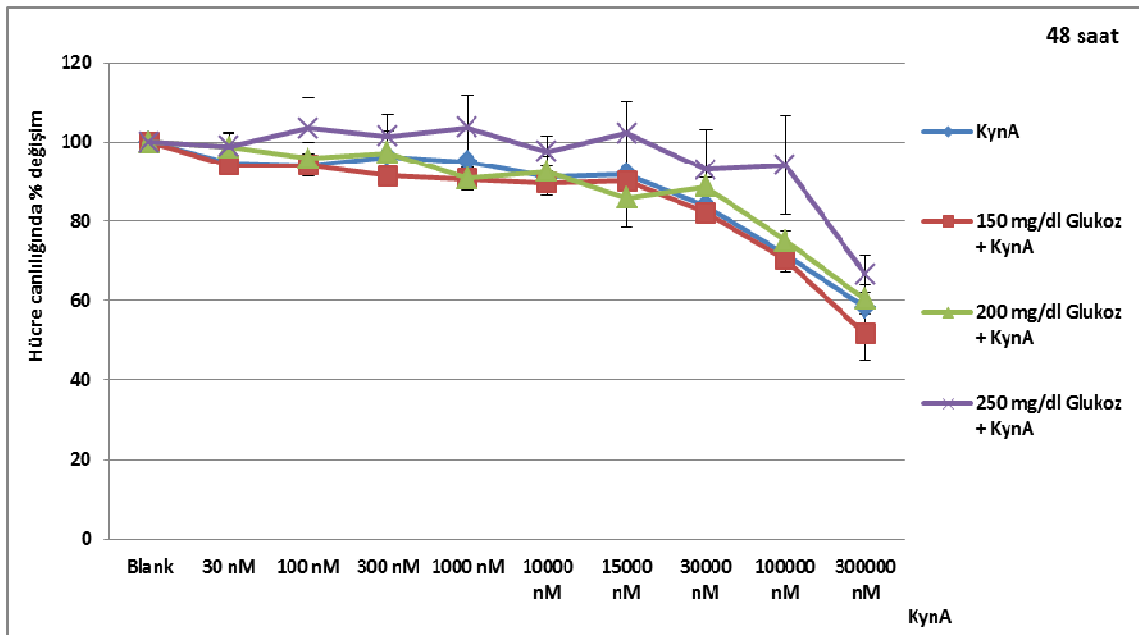
Resim 4.1. (a) 120 mg/dl Glukoz (kontrol – medium), (b) 250 mg/dl Glukoz, (c) 250 mg/dl Glukoz + 40 μ U/ml Insulin içeren besi yerlerinde 48 saat inkübe edilen SH-SY5Y hücreleri. (İnvert mikroskop, 100x)

4.1.3. Glukoz ve kinürenik asit

Hücreler 150 – 200 – 250 mg/dl glukoz varlığında 30 – 300.000 nM arasında 9 farklı konsantrasyonda KynA'e maruz bırakılarak MTT ile total mitokondrial metabolik aktivite/hücre canlılığı değişimleri tespit edildi (Bkz Şekil 4.6., Şekil 4.7.).

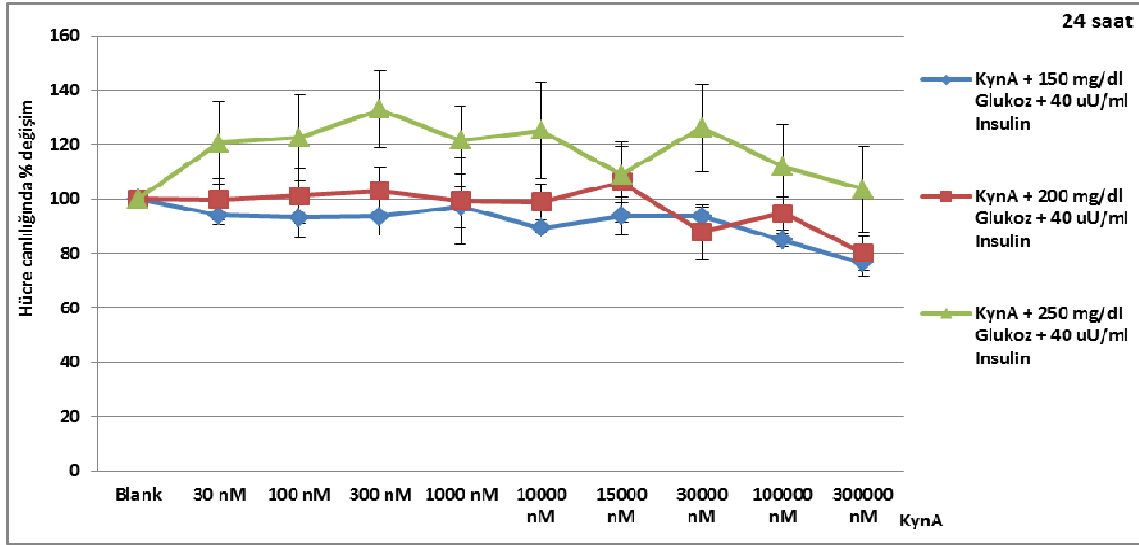


Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlarda kinürenik asit ve glukoz maruz bırakılan hücrelerin 24 saat inkübasyon süresi sonunda canlılıklarındaki değişim

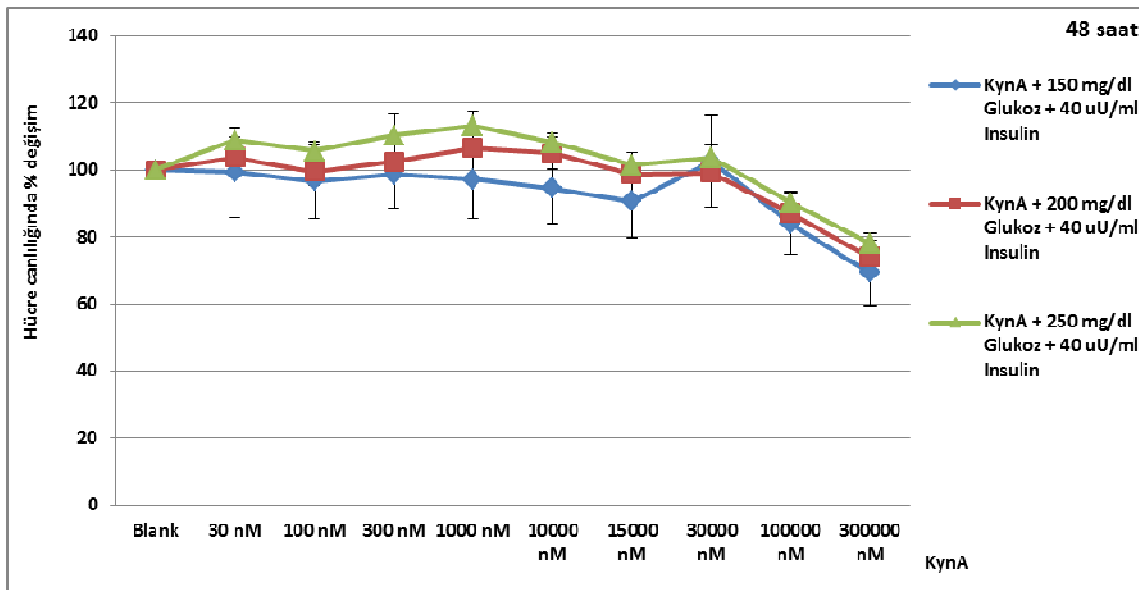


Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonlarda kinürenik asit ve glukoz maruz bırakılan hücrelerin 48 saat inkübasyon süresi sonunda canlılıklarındaki değişim

Daha sonra hücreler 150 – 200 – 250 mg/dl glukoz ve daha önceden tespit edildiği üzere 40 μ U/ml dozlarda insulin varlığında 30 – 300 000 nM arasında 9 farklı konsantrasyonda KynA'ye maruz bırakılarak MTT ile total mitokondrial metabolik aktivite/hücre canlılığı değişimleri tespit edildi (Bkz Şekil 4.8., Şekil 4.9.).



Şekil 4.8. Farklı konsantrasyonlarda kinürenik asit, glukoz ve 40 µU/ml insüline maruz bırakılan hücrelerin 24 saat inkübasyon süresi sonunda canlılıklarındaki değişim



Şekil 4.9. Farklı konsantrasyonlarda kinürenik asit, glukoz ve 40 µU/ml insüline maruz bırakılan hücrelerin 48 saat inkübasyon süresi sonunda canlılıklarındaki değişim

Luccini ve ark. NMDA reseptörlerinde glutamaterjik uyarının submikromolar konsantrasyonda (0,01-1 µM) KynA ile etkin biçimde antagonize edildiğini göstermişlerdir (Luccini, Musante, Neri, Raiteri ve Pittaluga, 2007). NMDA –aracılı oksidatif stres mitokondrial disfonksiyona sebep olur. Spesifik NMDA reseptör antagonisti KynA, aynı zamanda α7nAChR ve AMPA reseptörlere de bağlanmaktadır (Sas, Robotka, Toldi ve Vécsei, 2007). KynA'nın α7nAChR inhibisyonu yapma dozu ortalama 7 µM olduğu ileri

sürülmüştür. Gamma aminobütrik asit (GABA)erjik etkiyi azaltma dozu ise 20-200 μ M olarak bildirilmektedir (Albuquerque ve Schwarcz, 2013). Bazı araştırmacılar, KynA'in yüksek mM konsantrasyonlarda bile α 7nAChR üzerinde inhibitör etkisi olduğunu gösterememişlerdir (Mok, Fricker, Weil ve Kew, 2009; Dobelis, Staley ve Cooper, 2012). Aslında SH-SY5Y hücrelerinin erişkin kolinerjik fenotipi, retinoik asit ile farklılaşma gösteren hücrelerdir. Bunlar yüksek miktarda kolin asetil transferaz eksprese ederler (Påhlman, Ruusala, Abrahamsson, Mattsson ve Esscher, 1984). Ayrıca farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinin antioksidan kapasitesi de yüksektir (Schneider ve diğerleri, 2011). Buna göre, NMDA reseptör blokajı için önerilen doz nM düzeyde olacaktır.

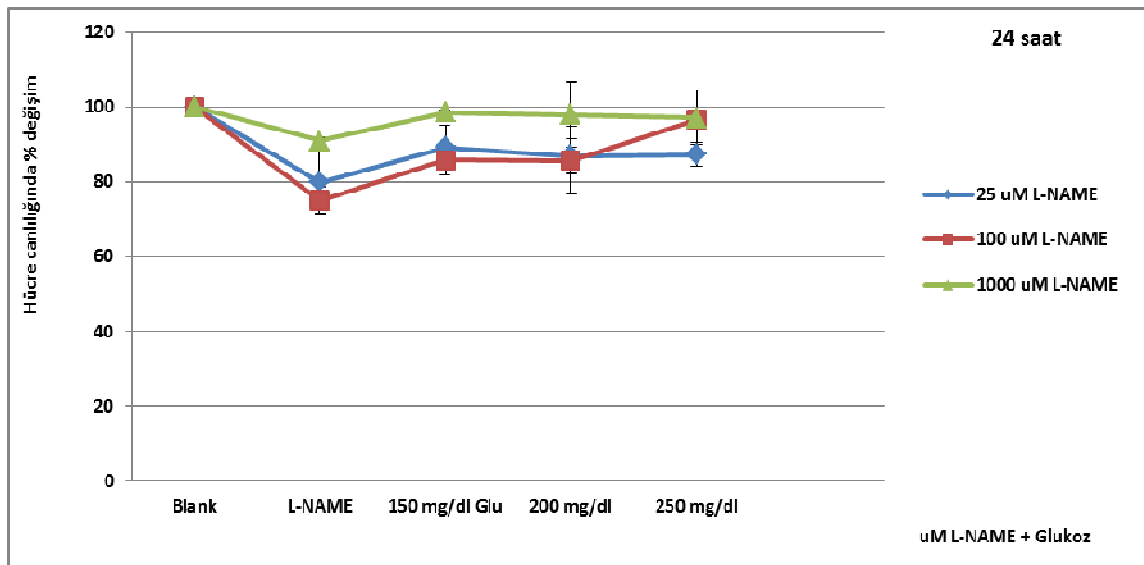
KynA'in presinaptik glutamaterjik nöronlar ve postsinaptik nöronlarda G-protein ile birleşik reseptör 35 (GPR35) ile etkileşimi glutamat ve pro-inflamatuvar sitokin serbestleşmesini azaltır (Moroni, Cozzi, Sili ve Mannaioni, 2012). GPR35 aktivasyonu için gerekli KynA miktarı 300 nM'in üzerindedir (Forrest, Gould, Darlington ve Stone, 2003; Jenkins ve diğerleri, 2011; Barth ve diğerleri, 2009). İnflamatuvar cevap ve sitokin serbestleşmesi için GPR35 uyarısı sözkonusu olduğunda, bildirilen KynA düzeyi 39,2 μ M'dır (Wang ve diğerleri, 2006). Yukarıda belirtilen bilgiler çerçevesinde KynA-NMDA, GPR35 ve α 7nAChR ilişkisi giderek artan doz-bağımlı olup, NMDA reseptör blokajı için kullanılacak doz, normal koşullarda insan fizyolojik KynA konsantrasyonuna en yakın olanıdır. Bu bilgilerin ve yaptığımız ön çalışmalarımızın ışığı altında NMDA reseptör blokajı için 30 nM KynA kullanılmasına karar verildi.

4.1.4. Glukoz ve N ω -nitro-L-arginin metil ester

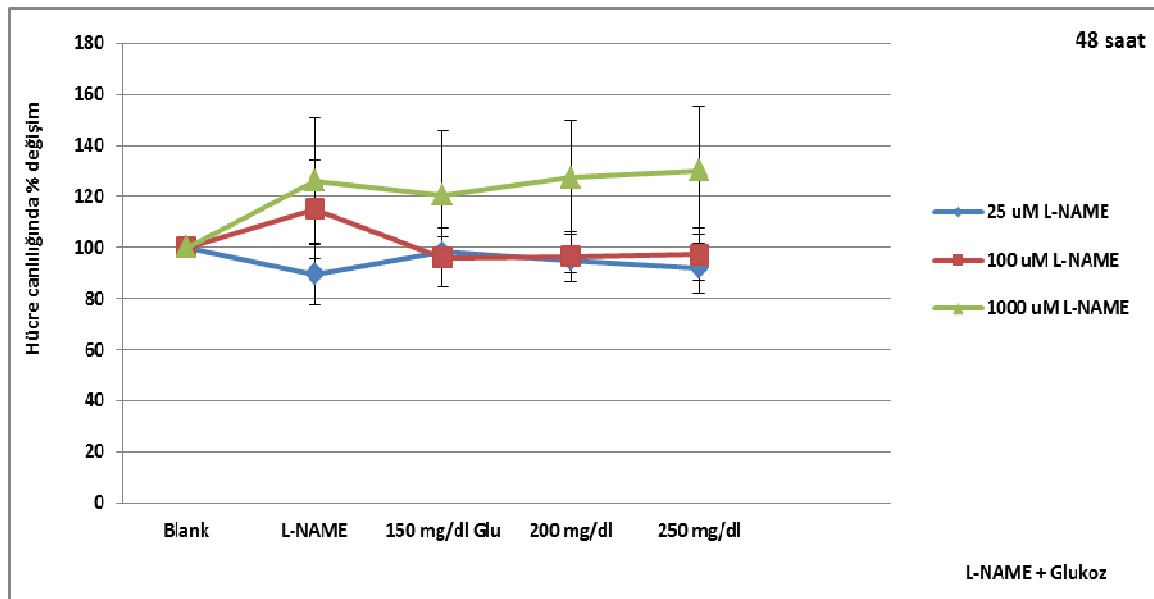
Tüm glukoz konsantrasyonlarında yüksek glukoz maruz kalan SH-SY5Y hücrelerine ortama ilave edilen glukoz konsantrasyonunun artması ile birlikte nöronal glikolizisi hızlandırarak oksidatif stresi artırmaktadır. SH-SY5Y hücrelerinde meydana gelen oksidatif stresin temel sebebi nNOS aktivitesi ile oluşan NO düzeyidir. Ortamda ölçülen $[(NO_3+NO_2)]/Cc$ 'in meydana getirdiği oksidatif stresin şiddeti, mitokondride $[NADPH+-NADP+]-[GSSG-GSH]$ döngüsünün fonksiyonu olan MTT/ Cc 'ye oranı ile belirlenmiştir. Bu çalışmada oksidatif stres $Q=[(NO_3+NO_2)]/Cc-MTT/Cc$ oranı olarak hesaplanmıştır. Oksidatif stresin artması her glukoz konsantrasyonu için ikinci hücre siklusunda ve glukoz

konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak hücre canlılığı-total mitokondrial metabolik aktiviteyi belirgin olarak azaltmaktadır.

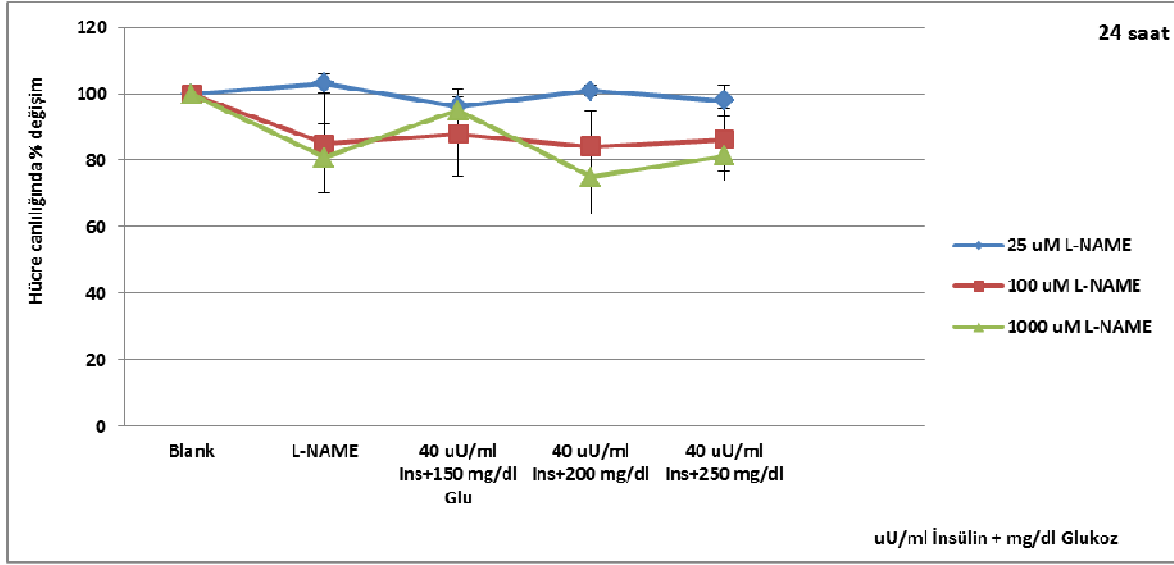
25 – 100 ve 1000 μ M konsantrasyonlarda L-NAME 40 μ U/ml insulin varlığında ya da tek başına 150 – 200 – 250 mg/dl glukoz ile 24 ve 48 saat inkübe edildi ve hücre canlılıklarındaki değişimler tespit edildi (Bkz Şekil 4.10., Şekil 4.11., Şekil 4.12., Şekil 4.13.).



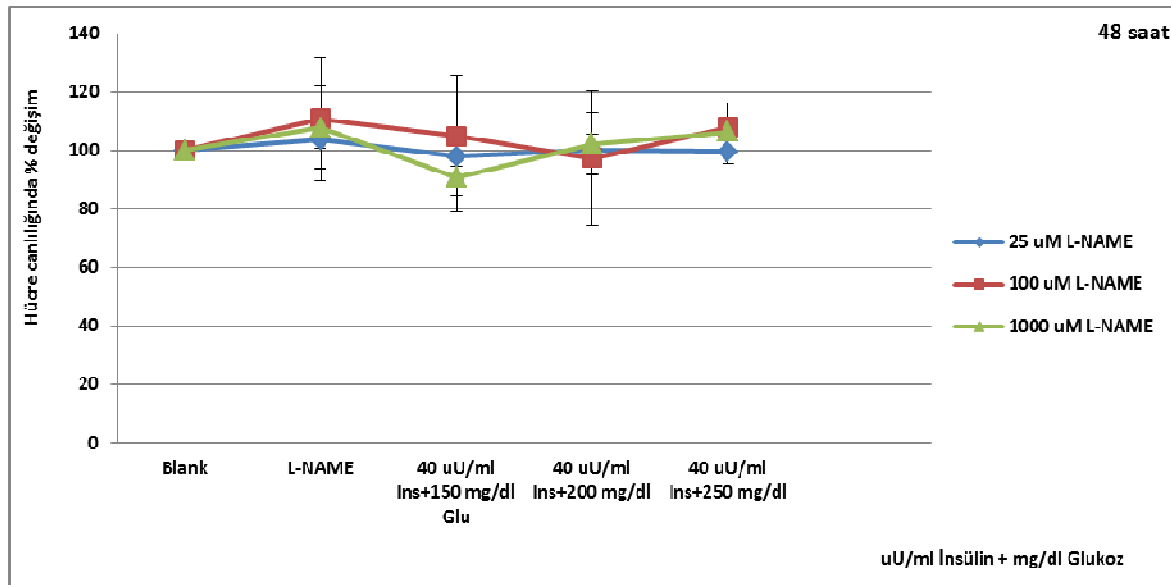
Şekil 4.10. Farklı konsantrasyonlarına L-NAME ve glukozu maruz bırakılan hücrelerin 24 saat inkübasyon süresi sonunda canlılıklarındaki değişim



Şekil 4.11. Farklı konsantrasyonlarına L-NAME ve glukozu maruz bırakılan hücrelerin 48 saat inkübasyon süresi sonunda canlılıklarındaki değişim



Şekil 4.12. Farklı konsantrasyonlarına L-NAME, glukoz ve 40 μ U/ml insüline maruz bırakılan hücrelerin 24 saat inkübasyon süresi sonunda canlılıklarındaki değişim



Şekil 4.13. Farklı konsantrasyonlarına L-NAME ve glukoz ve 40 μ U/ml insüline maruz bırakılan hücrelerin 48 saat inkübasyon süresi sonunda canlılıklarındaki değişim

Tek başına glukozu maruz bırakıldığında hücre canlılığındaki azalmayı daha az miktarda düzeltmekle birlikte insülin varlığında 25 μ M L-NAME'in hücre canlılığını en etkin şekilde artıran doz olduğu tespit edildi. NO sinaptik nöron fonksiyonlarının devamı ve antioksidan kapasitenin desteklenmesi bakımından son derece önemlidir. Bir non spesifik NOS inhibitörü olan L-NAME yüksek dozlarda kullanıldığında antioksidan kapasitenin ve

sinaptik nöronal fonksiyonların bozulması tehlikesi dikkate alındığında 25 μ M L-NAME'in en uygun doz olduğuna karar verilmiştir.

Karar verilen dozlara göre yeni deney planı yapılarak tek başına 150 – 200 – 250 mg/dl glukoz veya 40 μ U/ml varlığında ve/veya 30 nM KynA ve/veya 25 μ M L-NAME varlığında NOx, GLUT3, C1q, CD59 ve oksidatif stress düzeyleri tayin edildi. Diğer taraftan hücre başına düşen metabolik aktivite MTT değerlerinin tripan mavisi ile hücrelerin sayılması sonucunda MTT/ hücre sayısı (MTT/Cc) ile değerlendirildi.

4.2. Yüksek Konsantrasyonda Glukoza Maruziyet ve Nitrik Oksit

Bu çalışmada, insan nöroblastoma SH-SY5Y hücre hattı ADA ve IDF'nin tanı kriterleri dikkate alınarak 150 mg/dL (8,3mM), 200 mg/dL (11,1 mM) ve 250 mg/dL (13,9 mM) glukoza maruz bırakılmış ve ortamda tek başına glukoz bulunduğunda ilk 24 saatte giderek artan konsantrasyonlarda glukozla hücre canlılığı $\%114 \pm 5,4$ 'den $\%122 \pm 6,2$ 'ye kadar yükselmiştir. İkinci 24 saatte ise total metabolik aktiviteyi gösteren hücre canlılığı artan glukoz konsantrasyonu ile orantılı olarak $\%74,8 \pm 2,07$ 'den giderek $\%41,9 \pm 3,9$ 'a kadar düşmüştür (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1. SH-SY5Y hücrelerinin bulunduğu ortama 150, 200 ve 250mg/dL yüksek konsantrasyonda glukoza ilaveten 40 μ U/ml insülin, 30nM KynA veya 25 μ M L-NAME ilave edildiğinde ilk ve ikinci 24 saatte MTT, Q, NO ve GLUT3/Cc düzeylerinin karşılaştırılması

ORTAMA EKLENEN MADDE	Süre (saat)	MTT(%)	MTT/Cc (%/hücre sayısı)	Q	GLUT3/Cc (ng/ml/hücre sayısı)	(NO ₃ +NO ₂)/Cc (μ M/hücre sayısı)
Kontrol	24	100 $\pm$ 0,92	1,38 $\pm$ 0,01	0,41 $\pm$ 0,01	0,0006 $\pm$ 0,0001	0,57 $\pm$ 0,01
	48	100 $\pm$ 2,10	1,73 $\pm$ 0,04	0,39 $\pm$ 0,01	0,0010 $\pm$ 0,0001	0,68 $\pm$ 0,01
Glukoz 150mg/dL	24	114,0 $\pm$ 5,40	3,82 $\pm$ 0,18	0,36 $\pm$ 0,01	0,0011 $\pm$ 0,0001	1,39 $\pm$ 0,02
	48	74,8 $\pm$ 2,07	2,74 $\pm$ 0,07	0,48 $\pm$ 0,01	0,0014 $\pm$ 0,0001	1,32 $\pm$ 0,03
Glukoz 200mg/dL	24	122,2 $\pm$ 6,20	3,22 $\pm$ 0,16	0,34 $\pm$ 0,02	0,0007 $\pm$ 0,0000	1,09 $\pm$ 0,06
	48	47,9 $\pm$ 4,09	1,88 $\pm$ 0,16	0,79 $\pm$ 0,02	0,0016 $\pm$ 0,0001	1,50 $\pm$ 0,04
Glukoz 250mg/dL	24	121,5 $\pm$ 4,00	3,42 $\pm$ 0,11	0,32 $\pm$ 0,01	0,0009 $\pm$ 0,0000	1,11 $\pm$ 0,03
	48	41,9 $\pm$ 3,90	2,43 $\pm$ 0,22	0,95 $\pm$ 0,02	0,0025 $\pm$ 0,0004	2,30 $\pm$ 0,04

Çizelge 4.1. (devam) SH-SY5Y hücrelerinin bulunduğu ortama 150, 200 ve 250mg/dL yüksek konsantrasyonda glukoz ilaveten 40µU/ml insülin, 30nM KynA veya 25µM L-NAME ilave edildiğinde ilk ve ikinci 24 saatta MTT, Q, NO ve GLUT3/Cc düzeylerinin karşılaştırılması

150 mg/dL Glukoz +40µU/ml insülin	24	86,6±1,68*	2,20±0,04*	0,45±0,003*	0,0010±0,0001	1,01±0,01*
	48	40,9±1,78*	0,58±0,02*	0,97±0,05*	0,0007±0,0001*	0,57±0,03*
200 mg/dL Glukoz +40µU/ml insülin	24	83,1±0,97*	1,50±0,01*	0,52±0,3*	0,0006±0,0000*	0,77±0,04*
	48	13,5±0,79*	0,25±0,01*	3,05±0,07*	0,0007±0,0000*	0,76±0,02*
250 mg/dL Glukoz +40µU/ml insülin	24	86,0±0,90*	1,51±0,01*	0,48±0,01*	0,0006±0,0000*	0,72±0,01*
	48	14,4±0,56*	0,24±0,00*	2,87±0,12*	0,0008±0,0000*	0,69±0,03*
150 mg/dL Glukoz +30nM KynA	24	99,3±0,28*	1,96±0,00*	0,39±0,01	0,0006±0,0001*	0,77±0,02*
	48	94,2±1,71*	1,38±0,02*	0,38±0,01*	0,0008±0,0001*	0,53±0,01*
200 mg/dL Glukoz +30nM KynA	24	91,0±8,90*	1,43±0,14*	0,45±0,01*	0,0004±0,0001*	0,66±0,02*
	48	98,75±3,35*	2,07±0,07	0,37±0,02*	0,0011±0,0002	0,79±0,04*
250 mg/dL Glukoz +30nM KynA	24	91,4±1,00*	1,07±0,01*	0,43±0,00*	0,0003±0,0000*	0,46±0,003*
	48	98,9±3,50*	1,83±0,06*	0,36±0,01*	0,0010±0,0001	0,67±0,03*
150 mg/dL Glukoz +40µU/ml insülin+30nM KynA	24	93,9±3,20*	1,65±0,05*	0,42±0,01	0,0006±0,0001*	0,71±0,01*
	48	99,2±13,50	1,79±0,00*	0,39±0,01*	0,0009±0,0001*	0,71±0,03*
200 mg/dL Glukoz +40µU/ml insülin+30nM KynA	24	99,8±7,60*	2,26±0,17*	0,39±0,01	0,0009±0,0001*	0,88±0,01*
	48	103,7±5,08*	1,66±0,08	0,36±0,01*	0,0008±0,0001*	0,60±0,01*
250 mg/dL Glukoz +40µU/ml insülin+30nM KynA	24	120,7±15,20	1,97±0,25*	0,31±0,01	0,0006±0,0001	0,62±0,02*
	48	108,8±0,90*	1,99±0,00*	0,33±0,01*	0,0010±0,0001*	0,67±0,02*
150 mg/dL Glukoz +25 µM L-NAME	24	94,2±5,77*	1,32±0,08*	0,69±0,003*	0,0008±0,0000*	0,94±0,01*
	48	98,4±5,62*	1,19±0,06*	0,51±0,08	0,0009±0,0000*	0,62±0,01*
200 mg/dL Glukoz +25 µM L-NAME	24	92,9±4,61*	1,15±0,05*	0,69±0,02*	0,0007±0,0001	0,80±0,02*
	48	95,0±4,85*	1,28±0,06*	0,45±0,02*	0,0008±0,0000*	0,63±0,03*
250 mg/dL Glukoz+25 µM L-NAME	24	93,1±3,12*	1,02±0,03*	0,58±0,06*	0,0012±0,0001	0,65±0,07*
	48	101,8±1,36	1,40±0,02	0,44±0,04*	0,0007±0,0001*	0,94±0,10*
150 mg/dL Glukoz+40µU/ml insülin +25µM L-NAME	24	96,3±2,79*	1,32±0,08*	0,51±0,11	0,0008±0,0000	1,27±0,27
	48	97,9±3,47*	1,19±0,06*	0,35±0,003*	0,0009±0,0000*	0,55±0,01*
200 mg/dL Glukoz+40µU/ml insülin +25µM L-NAME	24	101,1±1,71*	1,15±0,05*	0,40±0,006*	0,0007±0,0001*	0,73±0,012*
	48	100,3±5,28*	1,28±0,06*	0,35±0,011*	0,0008±0,0000*	0,51±0,02*
250 mg/dL Glukoz+40µU/ml insülin +25µM L-NAME	24	97,9±4,57*	1,02±0,03*	0,40±0,01*	0,0012±0,0001*	1,14±0,03
	48	99,7±4,27*	1,40±0,018*	0,42±0,03*	0,0007±0,0001*	0,52±0,04*

*p<0,05; 150 – 200 – 250 mg/dL glukoz – glukoz + (insülin, KynA veya L-NAME) veya (KynA + insülin veya L-NAME + insülin) ile aynı konsantrasyon ve aynı inkübasyon süresindeki grupların karşılaştırılması. (Total mitokondrial metabolik aktivite/hücre canlılığı (MTT), oksidatif stress (Q), nitrik oksit $[(NO_3+NO_2)]/Cc$, glukoz taşıyıcı 3 (GLUT3/Cc))

150 mg/dl glukozla NMDA reseptör uyarısı sonucu meydana gelen $[(NO_3+NO_2)]/Cc$ (1,39±0,02), kontrollara (0,57±0,01) göre ilk 24 saatta %143,8 artmıştır (p<0.05). Bu sırada hücre canlılığı %114±5,4'dür. İkinci 24 saatta $[(NO_3+NO_2)]/Cc$ değeri 1,32±0,02 olup kontrollara (0,68±0,01) göre artış %94 (p<0,05) olmasına rağmen hücre canlılığı %74,8±2,07'e düşmüştür. 200 mg/dl glukozla ilk 24 saatta $[(NO_3+NO_2)]/Cc$ düzeyinde artış

%91,2 ($p<0,05$), bu süreçte hücre canlılığı %122±6,2 olarak elde edilmiştir. İkinci 24 saatta, $[(NO_3+NO_2)]/Cc$ 'de $1,50\pm0,04$ 'dür. Birinci 24 saata göre NO düzeyinde %27 artış meydana gelmesi ile hücre canlılığı %47,89±4,09'a düşmüştür ($p<0,05$). 250 mg/dl glukozla ise birinci 24 saatta hücre canlılığı %121,5±4'iken, $[(NO_3+NO_2)]/Cc$ değerinin $2,30\pm0,04$ 'e ilk 24 saata göre %107,2 yükselmesi ($p<0,05$) hücre canlılığını %41,93±3,9'a düşürmüştür (Çizelge 4.1.). Tüm glukoz konsantrasyonlarında ilk 24 saatta NO konsantrasyonları ile hücre canlılığı değerleri karşılaştırıldığında sonuç çelişkili gözükmemektedir. Yüksek glukozla maruz bırakılan SH-SY5Y hücrelerine ortama ilave edilen glukoz konsantrasyonunun artması ile birlikte her konsantrasyon için ikinci hücre siklusunda artan GLUT3/Cc ile nöron içine giren glukoz miktarının artması nöronal glikolizisi hızlandırarak oksidatif stresi artırmaktadır. Oksidatif stresin artması her glukoz konsantrasyonu için ikinci hücre siklusunda ve glukoz konsantrasyonu ile orantılı olarak hücre canlılığı/total mitokondrial metabolik aktiviteyi belirgin olarak azaltmaktadır (Çizelge 4.2.).

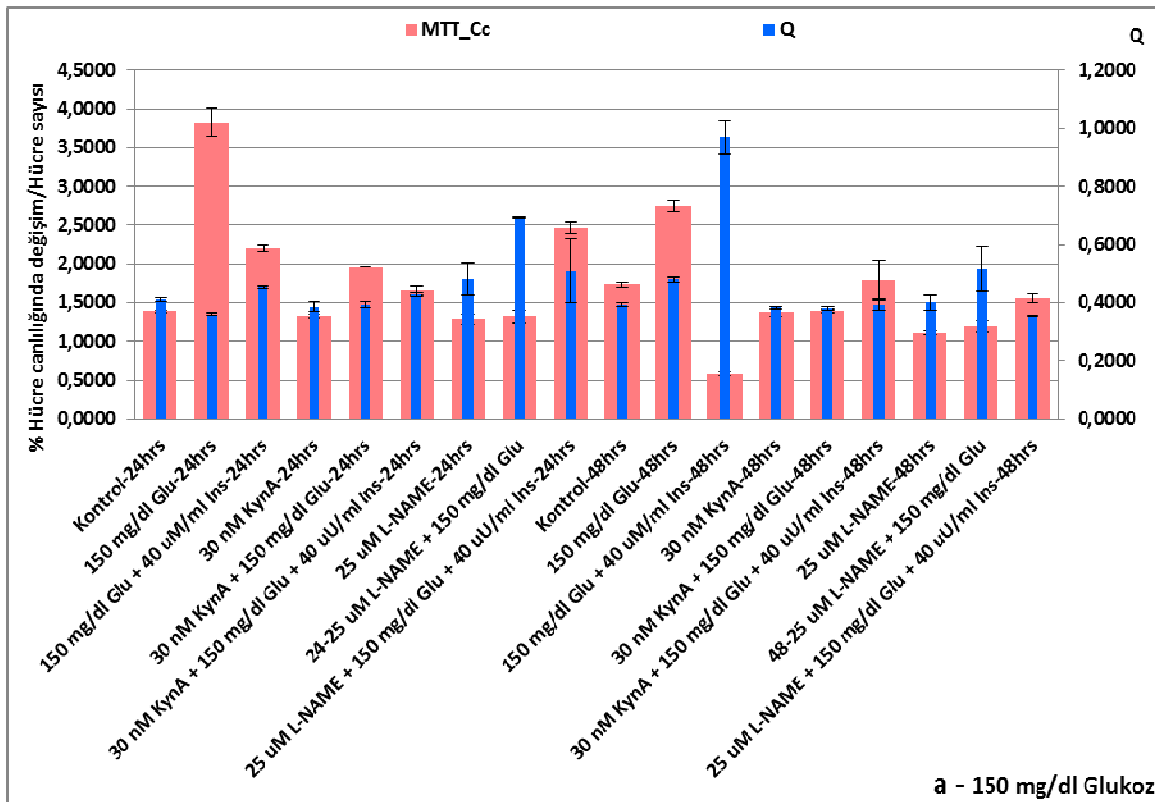
Çizelge 4.2. SH-SY5Y hücre kültürü ortamında 150, 200, 250 mg/dl yüksek konsantrasyonda glukoz bulunduğunda insülin, KynA, L-NAME) ilavesi ile ölçülen Q, GLUT3/Cc, MTT ve NO düzeylerinin ortalama değerlerinin, ortalama Q (glukoz), GLUT3 (glukoz), MTT (glukoz) ve (NO) glukoz değerlerine göre değişimi

Ortama eklenen madde	Süre (saat)	Q	Q %artış	GLUT3/Cc (ng/ml/hücre sayısı)	GLUT3/Cc % artış	MTT (%)	MTT %artış	NO ₃ +NO ₂ /Cc (µM/hücre sayısı)	NO %artış
Glukoz (mg/dL)	24	0,34±0,01	(100)	0,0009±0,000	(100)	119,2±5,2	(100)	1,196±0,04	(100)
	48	0,74±0,001	(100)	0,0018±0,0002	(100)	54,9±3,35	(100)	1,706±0,04	(100)
Glukoz (mg/dL)+ 40µU/ml insülin	24	0,48±0,01*	+41,0	0,0007±0,0000*	-22,2	85,2±1,20*	-29,5	0,832±0,02*	-30,4
	48	2,29±0,08*	+209,0	0,0007±0,0000*	-61,0	22,9±1,04*	-58,2	0,673±0,026*	-60,5
Glukoz (mg/dL) + 30nM KynA	24	0,42±0,02*	+23,5	0,0004±0,0001*	-55,5	93,9±3,39*	-21,2	0,630±0,014*	-47,3
	48	0,37±0,01*	-50,0	0,0012±0,0001*	-33,0	97,3±2,85*	+77,3	0,663±0,026*	-61,1
Glukoz (mg/dL) + 25µM L-NAME	24	0,65±0,02*	+91,0	0,0009±0,0001	0	93,4±4,46*	-21,6	0,796±0,03*	-33,4
	48	0,46±0,04*	-37,8	0,0008±0,0000*	-55,5	98,7±3,94*	+79,9	0,730±0,07*	-57,2
Glukoz (mg/dL)+ 30nM KynA+ 40µU/ml insülin	24	0,37±0,01	+8,8	0,0007±0,0001*	-22,0	104,8±8,6*	-12,0	0,736±0,01*	-38,5
	48	0,36±0,01*	-51,3	0,0009±0,0001*	-50,0	103,9±6,55*	+89,3	0,660±0,02*	-61,3
Glukoz (mg/dL)+ 25µM L-NAME + 40µU/ml insülin	24	0,43±0,04*	+26,4	0,0009±0,0001	0	98,4±3*	-17,4	1,044±0,10	-12,7
	48	0,37±0,01*	-50,0	0,0008±0,0001*	-55,5	99,3±4,34*	+80,9	0,526±0,02*	-69,2

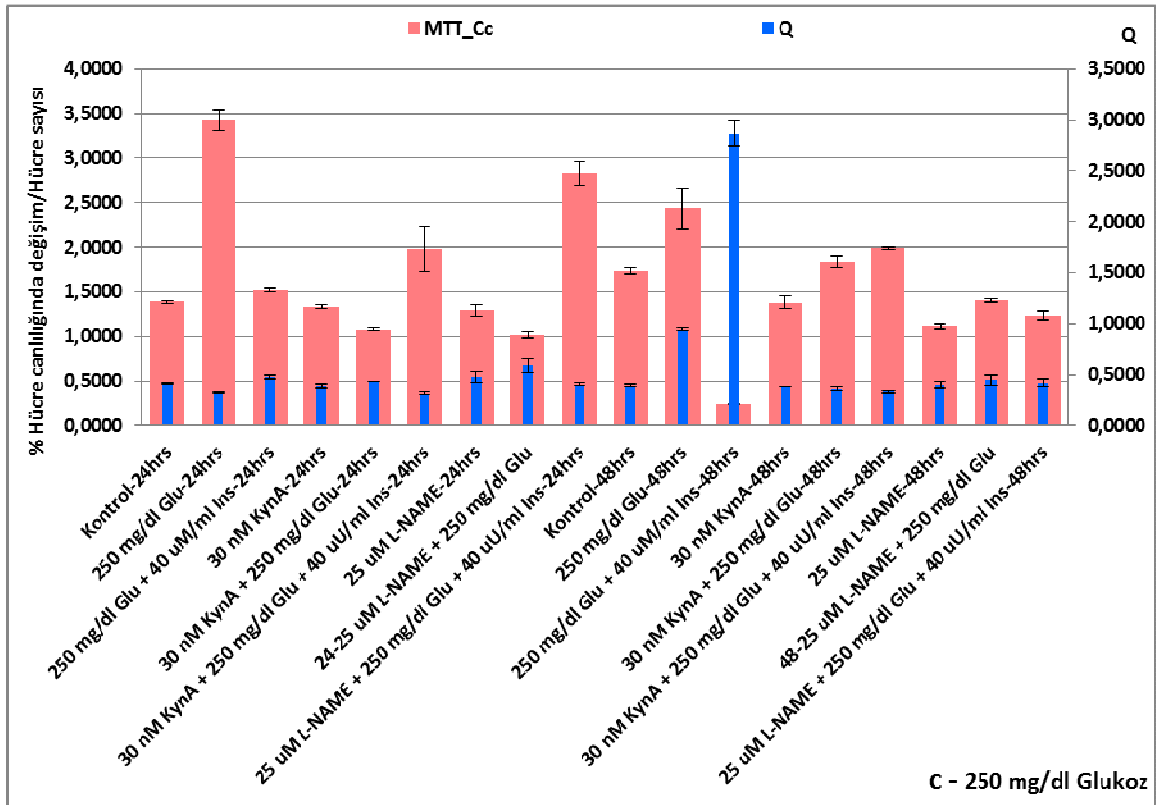
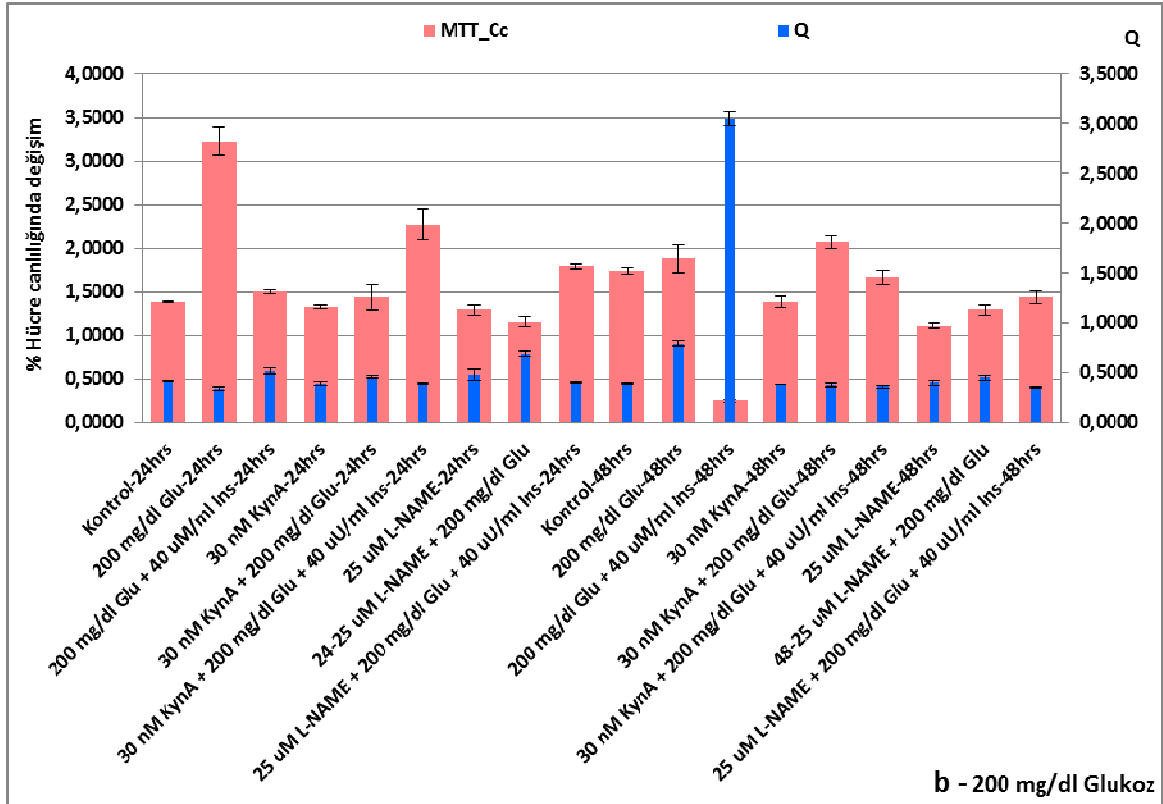
*p<0,05; 150 – 200 – 250 mg/dL ortalama glukoz – ortalama glukoz + (insülin, KynA veya L-NAME) veya (KynA + insülin veya L-NAME + insülin) ile aynı inkübasyon süresindeki grupların istatistiksel karşılaştırılması. (Kinürenik asit (KynA), N-nitro-L-arginine metil ester (L-NAME), oksidatif stres (Q), glukoz taşıyıcı-3 (GLUT3/Cc), total mitokondrial metabolik aktivite (MTT), nitrik oksit [(NO₃+NO₂)/Cc])

Oksidatif stres şiddetinin değişimleri incelendiğinde 150mg/dl glukoz bulunan ortamda ikinci 24 saatta, birinci 24 saata nazaran oksidatif stresin %33,3 artışına (p<0,05) karşın hücre canlılığı %34,3 azaldığını (p<0,05), 200mg/dl glukoz bulunan ortamda 48 saatta oksidatif stresin birinci 24 saata nazaran %132,3 artışına (p<0,05) karşın hücre canlılığı %60,7 azaldığını (p<0,05), 250mg/dl glukozla ise 48 saatta birinci 24 saata nazaran oksidatif stresin %196,8 artmasına (p<0,05) karşın hücre canlılığı %65,4 azaldığını (p<0,05)

göstermektedir (Bkz Şekil 4.14.). Tüm glukoz konsantrasyonlarında ilk 24 saatta ortalama hücre canlılığı yüksek ($119,1 \pm 5,2$), oksidatif stres şiddeti [$Q(\text{ortalama}) = 0,34 \pm 0,015$] düşükken ($p < 0,05$), ikinci 24 saatta en yüksek oksidatif stres şiddeti, 250 mg/dl glukoz konsantrasyonunda ($Q = 0,95 \pm 0,02$) ($p < 0,05$) görülmüştür. Hücre canlılığı ise giderek düşmüş 150 mg/dl ile $74,8 \pm 2,07$ ($p < 0,05$), 200mg/dl (11,1mM) ile $47,89 \pm 4,09$ ($p < 0,05$) ve 250mg/dl (13,9mM) ile $41,93 \pm 3,9$ ($p < 0,05$) olmuştur (Bkz Çizelge 4.1.). İlk 24 saatta oksidatif stresin şiddetinin kontrollara göre ortalama %17 azalmasına karşın total metabolik aktivite (MTT) %16 artmış, ikinci 24 saatta ortalama $Q = 89,7$ artmasına karşın MTT %45 azalmıştır. İlk 24 saatta hücre içine glukoz taşınmasında kontrollara nazaran %50 artış olurken, ikinci 24 saatta %80'e çıkmıştır. NO sentezinin hücre içine giren glukozla doğru orantılı olarak ilk 24 saatta %109,9, ikinci 24 saatta %149,3 arttığı gözlenmiştir (Çizelge 4.3.).



Şekil 4.14. 150 mg/dl (a) – 200 mg/dl (b) – 250 mg/dl (c) glukoz ve/veya 40 μ U/ml insülin ve/veya 30 nM KynA ve/veya 25 μ M L-NAME ile MTT/Cc ve Q değişimleri (Kinürenik asit (KynA), N-nitro-L-arginine metil ester (L-NAME), total mitokondrial metabolik aktivite/Hücre sayısı (MTT/Cc), oksidatif stres (Q))



Şekil 4.14. (devam) 150 mg/dl (a) – 200 mg/dl (b) – 250 mg/dl (c) glukoz ve/veya 40 μ U/ml insülin ve/veya 30 nM KynA ve/veya 25 μ M L-NAME ile MTT/Cc ve Q değişimleri (Kinürenik asit (KynA), N-nitro-L-arginine metil ester (L-NAME), total mitokondrial metabolik aktivite/Hücre sayısı (MTT/Cc), oksidatif stres (Q))

Çizelge 4.3. SH-SY5Y hücre kültürü ortamına 150, 200 ve 250 mg/dL yüksek konsantrasyonda glukoz ilavesi ile ilk ve ikinci hücre siklusunda ölçülen ortalama MTT, Q, GLUT3/Cc ve NO düzeylerinin, kontrol grubu değerlerine göre değişim oranları

Ortama eklenen madde	Süre (saat)	MTT %artış	Q %artış	GLUT3/Cc (ng/ml/hücre sayısı)	GLUT3/Cc % artış	(NO ₃ +NO ₂)/Cc (μM/hücre sayısı)	(NO ₃ +NO ₂)/Cc % artış
Kontrol	24	(100)	(100)	0,0006±0,0001	(100)	0,570±0,01	(100)
	48	(100)	(100)	0,0010±0,0001	(100)	0,684±0,01	(100)
Glukoz (mg/dL)	24	+16,0*	-17,0*	0,0009±0,0000	+50,0	1,196±0,04*	+109,9
	48	-45,0*	+89,7*	0,0018±0,0002*	+80,0	1,706±0,03*	+149,3

*p<0,05; Kontrol - 150 – 200 – 250 mg/dL ortalama glukoz gruplarının karşılaştırılması (Total mitokondrial metabolik aktivite (MTT), oksidatif stres (Q), glukoz taşıyıcı-3 (GLUT3/Cc) ve nitrik oksit [(NO₃+NO₂)/Cc])

4.2.1. Yüksek glukoz uyarısına SH-SY5Y hücrelerin glukoz taşıyıcı 3 ve nitrik oksit cevabına insülin ve kinürenik asitin etkisi

SH-SY5Y hücreleri 150 - 250 mg/dl arasında değişen seviyelerde yüksek glukoz konsantrasyonuna maruz bırakıldıklarında elde edilen hücre canlılığı, ortama 40 μU/ml sabit insülin ilave edilmesi ile hem ilk 24 saattaki (%86,6±1,68-83±0,97), (p<0,05), hem de ikinci 24 saattaki değerlerine nazaran (%40,9±1,78-13,55±0,79) istatistiksel olarak anlamlı miktarda azalmaktadır (p<0,05) (Bkz Çizelge 4.1.).

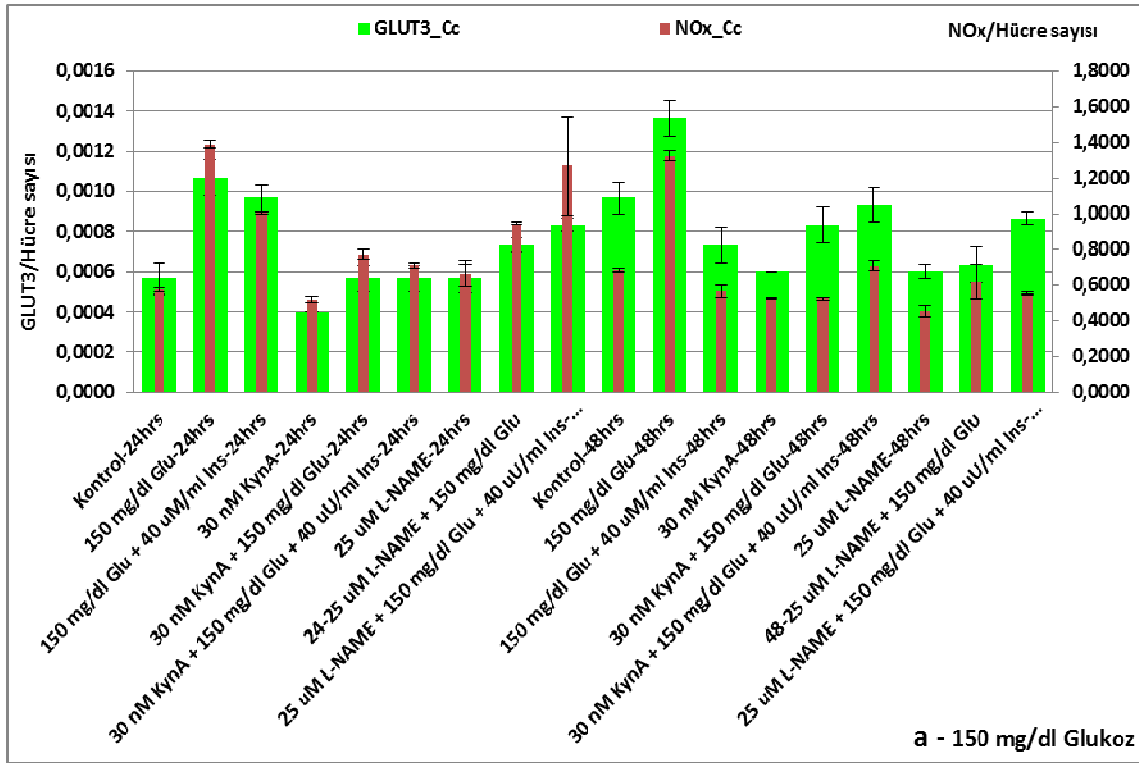
Glukoz+insülinle hücre canlılığında ilk 24 saatta görülen %29,5 (Q=%41 artmış) ve ikinci 24 saatta görülen %58,1 (Q=%209 artmış) azalmanın, yüksek glukoz ve 40μU/ml insülin konsantrasyonunda insüline direnç gelişerek oksidatif stresin artması sonucu olduğu düşünülmektedir (Bkz Çizelge 4.2.). İlk 24 saatta 150 mg/dl, 200 mg/dl ve 250 mg/dl glukozla elde edilen ortalama hücre canlılığı %119,1±5,2 (ortalama MMT/Cc=3,48±0,15) iken, ikinci 24 saatta ortalama hücre canlılığı, %54,87±3,35'e (MTT/Cc=2,35±0,15) düşmüştür (p<0,05). Ortama insülin ilave edildiğinde bu değerler ilk 24 saatta ortalama %85,2 (MTT/Cc=1,73±0,02), ikinci 24 saatta ise %22,95±1,04'e (MTT/Cc=0,36±0,01) düşmüştür (p<0,05) (Bkz Çizelge 4.1.). Ortama sadece glukoz ilave edildiğinde SH-SY5Y hücrelerinin maruz bulunduğu ortalama [NO₃+NO₂/Cc] ilk 24 saatta 1,197±0,04 μM/hücre sayısı iken, ikinci 24 saatta 1,706±0,04 μM/hücre sayısına yükselmiş (p<0,05) ve hücre canlılığı %54,87'ye (p<0,05) düşmüştür (Bkz Çizelge 4.2.).

Ortama glukoz+insülin ilave edildiğinde SH-SY5Y hücrelerinin maruz bulunduğu $[(NO_3+NO_2)/Cc]$ ilk 24 saatte ortalama $0,832\pm0,02$ $\mu M/hücre$ sayısı iken, ikinci 24 saatte ortalama $0,673\pm0,014$ $\mu M/hücre$ sayısı olmuştur. Sentezlenen $[(NO_3+NO_2)/Cc]$, mitokondrial aktivite (MTT/Cc)'ye oranlandığında; her hücre aktivitesi ile ortama salınan RNS ile oksidatif stresin şiddeti; ortalama MTT (yüksek glukoz)=%119,1 $\pm$ 5,2 hücre canlılığı için; ortalama $Q=0,34\pm0,01$, MTT=%54,87 $\pm$ 3,35 hücre canlılığı için; ortalama Q (yüksek glukoz)=0,74 $\pm$ 0,001'dir. Ortamda insülin bulunan grupta ilk 24 saatte %85,2 $\pm$ 1,20 ortalama hücre canlılığı için oksidatif stresin şiddeti, ortalama $Q=0,48\pm0,01$, %22,95 $\pm$ 1,04 ortalama hücre canlılığı için ise $Q=2,29\pm0,08$ 'dir. Görüldüğü üzere oksidatif stresin düzeyi artarken hücre canlılığı azalmaktadır (Bkz Şekil 4.15.). (Glukoz+insülin)-aracılı NO üretiminin sadece yüksek glukoz konsantrasyonu ile üretilen NO'ye oranla azalmıştır ($p<0,05$). Ancak, ilk 24 saatte ölçülen ortalama $Q(glukoz)=0,34\pm0,01$ iken, $Q(glukoz+insülin)=0,48\pm0,01$ 'e yükselmiş ($p<0,05$), ikinci 24 saatte ise ortalama $Q(glukoz)=0,74\pm0,001$ iken, ortalama $Q(glukoz+insülin)=2,29\pm0,08$ 'e yükselmiştir ($p<0,05$). Buna karşılık hücre canlılık değerleri ilk 24 saatte %29,5, ikinci 24 saatte %58,2 azalmıştır ($p<0,05$) (Bkz Çizelge 4.2.).

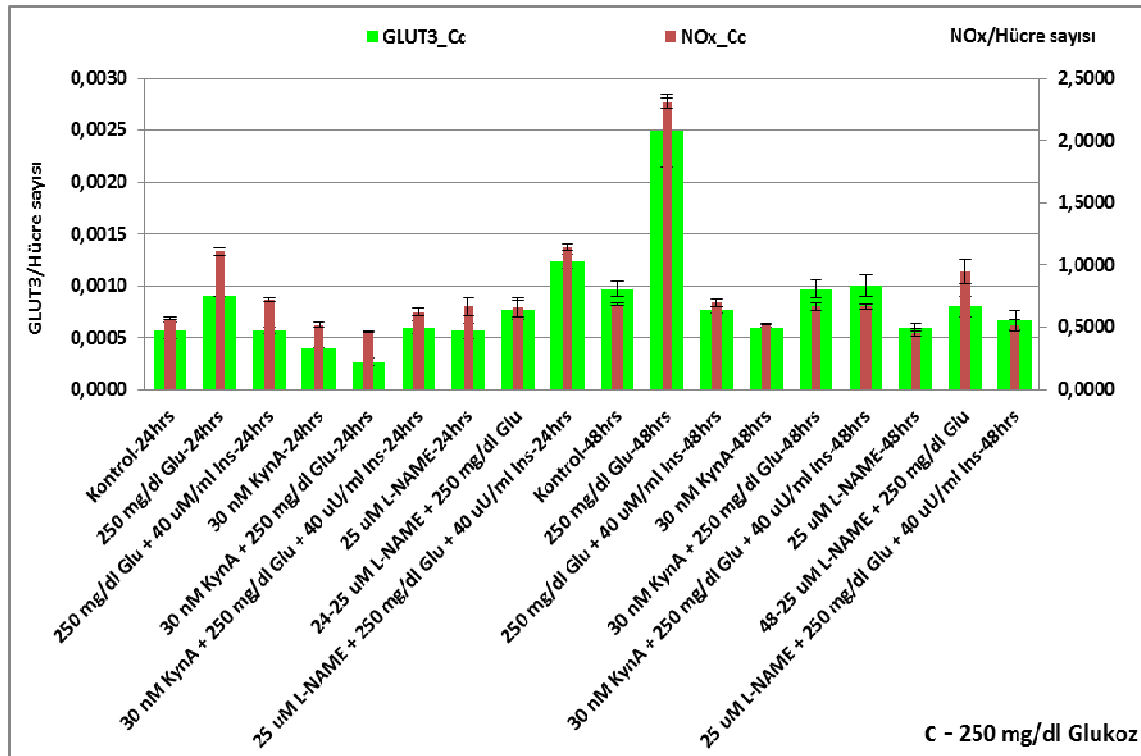
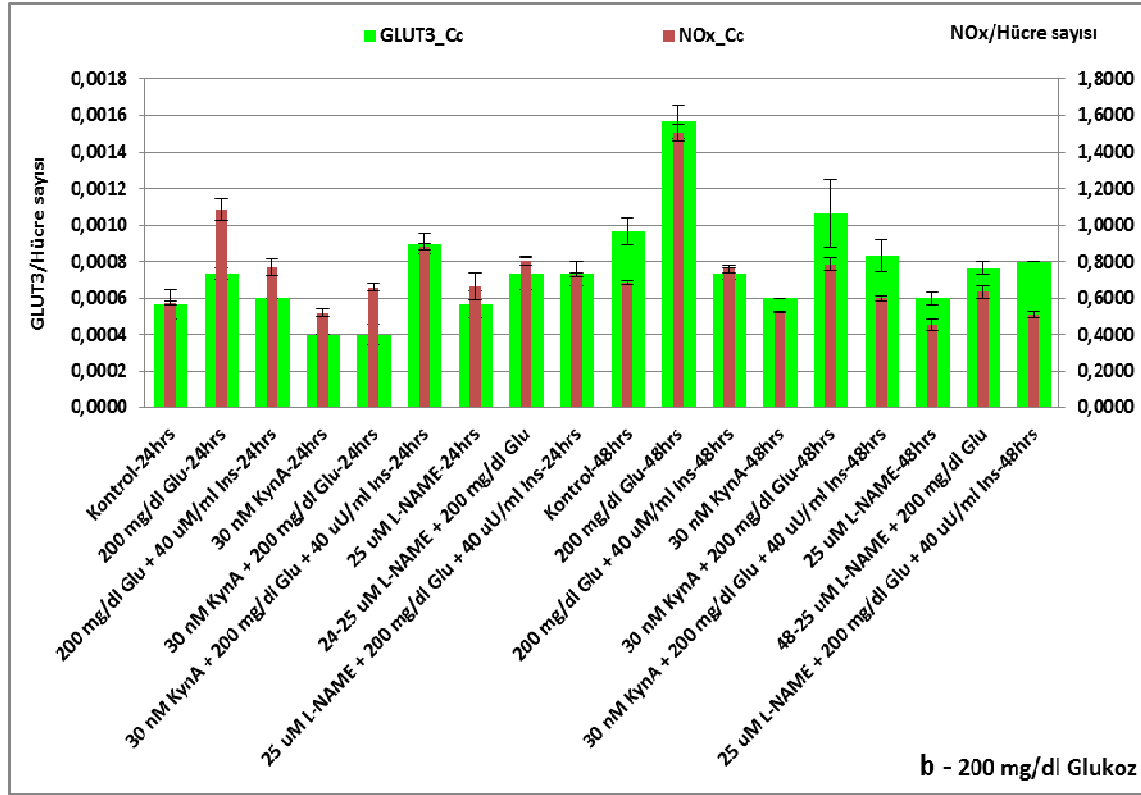
Bu çalışmada ortama yüksek konsantrasyonda glukoz ilavesi ile ilk 24 saatte ortalama $0,0009\pm0,000$ ng/ml/hücre sayısı olan GLUT3/Cc düzeyinde, kontrollara ($0,0006\pm0,0001$ ng/ml/hücre sayısı) göre de istatistiksel olarak önemli bir artma olmuştur ($p<0,05$). İkinci 24 saatte ise ortalama GLUT3 ($0,0018\pm0,0002$ ng/ml/hücre sayısı) hem kontrollara göre hem de ilk 24 saate göre anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0,05$). Glukoz ilave edilen ortamda ortalama NO değerlerinde hem ilk 24 saatte $[(NO_3+NO_2)/Cc]=1,1966\pm0,036$ $\mu M/hücre$ sayısı], hem de ikinci 24 saatte $[(NO_3+NO_2)/Cc]=1,7066\pm0,036$ $\mu M/hücre$ sayısı], kontrollara göre istatistiksel olarak anlamlı bir yükselme tespit edilmiştir ($p<0,05$). Ancak oksidatif stresin $Q=0,34\pm0,01$ 'den ikinci 24 saatte $0,74\pm0,016$ 'ya çıkması ile total mitokondrial metabolik aktivite MTT=%119,16 $\pm$ 5,2'den, % 54,87 $\pm$ 3,5'e düşmüştür.

Sadece glukoz bulunan ortamda, kontrollara göre GLUT3/Cc artışı ilk 24 saatte ortalama %50, ikinci 24 saatte ise %80'dir. Ortalama $[(NO_3+NO_2)/Cc]$ değerleri ise kontrollarla karşılaştırıldığında ilk 24 saatteki %109,9 artış, ikinci 24 saatte %149,3'e ulaşmıştır. NO düzeyinde ölçülen bu değerlerle, SH-SY5Y hücre lizatlarında ölçülen GLUT3/Cc artışı,

GLUT3 membran translokasyonunun ve füzyonunun NO-aracılı bir mekanizma ile olduğunu ortaya koymaktadır (Bkz Çizelge 4.3.).



Şekil 4.15. 150 mg/dl (a) – 200 mg/dl (b) – 250 mg/dl (c) glukoz ve/veya 40 μ U/ml insülin ve/veya 30 nM KynA ve/veya 25 μ M L-NAME ile GLUT3/Cc ve NO değişimleri (Kinürenik asit (KynA), N-nitro-L-arginine metil ester (L-NAME), glukoz taşıyıcısı 3/hücre sayısı (GLUT3/Cc), Nitrik oksit [(NO₃+NO₂)/Cc])



Şekil 4.15. (devam) 150 mg/dl (a) – 200 mg/dl (b) – 250 mg/dl (c) glukoz ve/veya 40 μ U/ml insülin ve/veya 30 nM KynA ve/veya 25 μ M L-NAME ile GLUT3/Cc ve NO değişimleri (Kinürenik asit (KynA), N-nitro-L-arginine metil ester (L-NAME), glukoz taşıyıcısı 3/hücre sayısı (GLUT3/Cc), Nitrik oksit [(NO₃+NO₂)/Cc])

Ortama insülin ilave edilmesi ile hem ilk 24 saatta, hem de ikinci 24 saattaki ortalama GLUT3 düzeylerinde sadece glukoz ilave edilen ortamdaki ortalama GLUT3/Cc değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana gelmiştir ($p<0,05$). Yüksek glukoz bulunan ortama insülin eklenmesi ile hücrelerde, sadece yüksek glukozla maruz kalanlara göre ortalama GLUT3/Cc miktarı ilk 24 saatta %22,2 azalırken ikinci 24 saatta %61 azalmıştır. Bu sırada hesaplanan oksidatif stresin şiddeti 200 mg/dl glukoz+insülin için $3,05\pm0,07$, 250 mg/dl glukoz+insülin için $2,87\pm0,12$ 'dir. İlk 24 saatta ortalama $Q=0,48\pm0,014$ olan oksidatif stres, ikinci 24 saatta ortalama $2,29\pm0,08$ 'a çıkarak %377 artmıştır ($p<0,05$) (Bkz Çizelge 4.2.).

Yüksek glukozla meydana gelen ortalama $[(NO_3+NO_2)/Cc]$ ye göre, yüksek glukoz+insülinle meydana gelen NO ilk 24 saatta $[(NO_3+NO_2)/Cc]=0,832\pm0,018$ μM /hücre sayısı olup %30,4 azalmış, ikinci 24 saatta ise $[(NO_3+NO_2)/Cc]=0,673\pm0,026$ μM /hücre sayısı olup %60,5 azalmıştır. Hem ilk 24 saatta ortalama GLUT3/Cc=0,0007 ng/ml/hücre sayısı, hem de ikinci 24 saatta GLUT3/Cc=0,0007 ng/ml/hücre sayısı'dir. İkinci 24 saatta GLUT3/Cc'de beklenen artışın görülmemesinin bir taraftan oksidatif streste meydana gelen artış, diğer taraftan NO üretiminde görülen azalmaya bağlı olduğu düşünülmektedir. Glukoz+insülin grubunda 200 mg/dl ve 250 mg/dl glukoz konsantrasyonlarında GLUT3/Cc'de 24 ile 48 saat arasındaki değerler arasındaki istatistiksel fark önemli bulunmuştur ($p<0,05$).

Glukoz+KynA ile ikinci 24 saatta birinci 24 saata nazaran ortalama GLUT3/Cc'de görülen %150 artış, NO'de %5,23 artış ve oksidatif streste %11,9 azalma ile birliktedir. Ortama 150 mg/dl, 200 mg/dl ve 250 mg/dl glukoz+30nM KynA ilave edildiğinde ilk 24 saatta ortalama $Q=0,42\pm0,01$, GLUT3/Cc=0,0004 $\pm$ 0,0001 ng/ml/hücre sayısıdır. İkinci 24 saatta ortalama $Q=0,37\pm0,011$, ortalama GLUT3/Cc=0,0009 $\pm$ 0,0001 ng/ml/hücre sayısıdır. Glukoz+KynA ile ortalama GLUT3/Cc, sadece yüksek glukoz varlığındaki GLUT3/Cc'ye göre ilk 24 saatta %55,5 azalmış, $[(NO_3+NO_2)/Cc]$ ise $(0,630\pm0,014$ μM /hücre sayısı) %47,3 azalmıştır, ikinci 24 saatta ise GLUT3/Cc %33 azalırken $[(NO_3+NO_2)/Cc]$ $(0,663\pm0,026$ μM /hücre sayısı) %61,1 azalmıştır (Bkz Çizelge 4.2.).

Ortamdaki glukoz+40 μU /ml insüline 30nM KynA ilave edildiğinde ilk 24 saatta ortalama $Q=0,37\pm0,008$ ve ortalama GLUT3/Cc=0,0007 $\pm$ 0,0001 ng/ml/hücre sayısı, ortalama

$[(\text{NO}_3+\text{NO}_2)/\text{Cc}]=0,736\pm0,01$ $\mu\text{M}/\text{hücre}$ sayısı'dir. İkinci 24 saatte ise ortalama $Q=0,36\pm0,01$ ve ortalama $\text{GLUT3}/\text{Cc}=0,0009\pm0,0001$ $\text{ng}/\text{ml}/\text{hücre}$ sayısı ve ortalama $[(\text{NO}_3+\text{NO}_2)/\text{Cc}]=0,660\pm0,02$ $\mu\text{M}/\text{hücre}$ sayısı olmuştur. Ancak 24 ile 48 saat arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. Glukoz+KynA ile ortalama hücre canlılığı ilk 24 saatte $\%93,9\pm3,39$, ikinci 24 saatte ise $\%97,28\pm2,85$ 'dir. Glukoz+ İnsülin+ KynA'le ilk 24 saatte ortalama hücre canlılığı $\%104,8\pm8,6$, ikinci 24 saatte $\%103,9\pm6,5$ 'dir. Hem Glukoz+KynA grubunda hem de Glukoz+İnsülin+KynA grubunda ilk ve ikinci 24 saatler arasında hücre canlılığı bakımından istatistiksel farkın 150 mg/dl ve 250 mg/dl glukoz konsantrasyonlarında anlamlı olduğu anlaşılmıştır ($p<0,05$). İkinci 24 saatte oksidatif strese $\%2,70$ azalma, $[(\text{NO}_3+\text{NO}_2)/\text{Cc}]$ 'de $\%10,3$ azalma olmakla birlikte, ortalama $\text{GLUT3}/\text{Cc}$ değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur (Bkz Çizelge 4.1., Çizelge 4.2., Çizelge 4.4.).

Çizelge 4.4. SH-SY5Y hücre kültürü ortamında glukoz+insülin, glukoz+KynA ve glukoz+ L-NAME ilavesi ile ölçülen Q, $\text{GLUT3}/\text{Cc}$ ve NO ortalama değerlerinin, ikinci 24 saatte ilk 24 saate göre değişim oranları

Ortama eklenen madde	Süre (saat)	Q	Q %artış	$\text{GLUT3}/\text{Cc}$ (ng/ml/hücre sayısı)	$\text{GLUT3}/\text{Cc}$ % artış	$[(\text{NO}_3+\text{NO}_2)/\text{Cc}]$ ($\mu\text{M}/\text{hücre}$ sayısı)	$(\text{NO}_3+\text{NO}_2)/\text{Cc}$ %artış
Kontrol	24	$0,41\pm0,007$	-4,87	$0,0006\pm0,0001^*$	+66,0	$0,5700\pm0,01^*$	+20,0
	48	$0,39\pm0,007$		$0,0010\pm0,0001$		$0,6844\pm0,01$	
Glukoz (mg/dL)	24	$0,34\pm0,01^*$	+117,6	$0,0009\pm0,0000^*$	+100,0	$1,196\pm0,04$	+42,6
	48	$0,74\pm0,001$		$0,0018\pm0,0002$		$1,706\pm0,03$	
Glukoz (mg/dL) +40 $\mu\text{U}/\text{ml}$ insülin	24	$0,48\pm0,01^*$	+377,0	$0,0007\pm0,0000$	0	$0,832\pm0,02$	-19,1
	48	$2,29\pm0,08$		$0,0007\pm0,0000$		$0,673\pm0,026$	
Glukoz (mg/dL) +30nM KynA	24	$0,42\pm0,02^*$	-11,9	$0,0004\pm0,0001^*$	+150,0	$0,630\pm0,014$	+5,2
	48	$0,37\pm0,01$		$0,0010\pm0,0001$		$0,663\pm0,026$	
Glukoz (mg/dL) +25 μM L-NAME	24	$0,65\pm0,02^*$	-27,7	$0,0009\pm0,0001$	-11,1	$0,796\pm0,036$	-8,3
	48	$0,47\pm0,04$		$0,0008\pm0,0000$		$0,730\pm0,032$	
Glukoz (mg/dL) +30nM KynA+ 40 $\mu\text{U}/\text{ml}$ insülin	24	$0,37\pm0,01$	-2,7	$0,0007\pm0,0001$	+28,5	$0,736\pm0,01$	-10,3
	48	$0,36\pm0,01$		$0,0009\pm0,0001$		$0,660\pm0,02$	
Glukoz (mg/dL) +25 μM L-NAME + 40 $\mu\text{U}/\text{ml}$ insülin	24	$0,43\pm0,04^*$	-13,9	$0,0009\pm0,0001$	-11,1	$1,044\pm0,10^*$	-49,6
	48	$0,37\pm0,014$		$0,0008\pm0,0001$		$0,526\pm0,02$	

* $p<0,05$; 150 – 200 – 250 mg/dL ortalama glukoz – ortalama glukoz + (insülin, KynA veya L-NAME) veya (KynA + insülin veya L-NAME + insülin) gruplarında ilk 24 saatte elde edilen değerlerin ikinci 24 saate göre istatistiksel karşılaştırılması ((KynA) ve glukoz+ N-nitro-L-arginin metilester (L-NAME) ilavesi ile ölçülen oksidatif stresin şiddeti (Q), glukoz taşıyıcı 3/hücre sayısı ($\text{GLUT3}/\text{Cc}$) ve nitrik oksit/hücre sayısı $[(\text{NO}_3+\text{NO}_2)/\text{Cc}]$ ortalama değerlerinin, ikinci 24 saatte ilk 24 saate göre değişim oranları ((-) değerler açık sarı ile işaretlenmiştir)

İlk 24 saatte, sadece ortamda yüksek glukozu maruz kalan hücrelere göre Glukoz+İnsülinle $[(NO_3+NO_2)/Cc]$ 'de %30,4 olan azalma meydana gelmiştir. İlk 24 saatte NO düzeyinde azalma glukoz+KynA'le %47,3'tür. Glukoz+İnsülinle NO sentezinde ikinci 24 saatte ise %60,5 olan azalma ortama KynA ilave edilmesine rağmen istatistiksel olarak önemli bir değişiklik meydana getirmez. Oksidatif stresteki bifazik değişiklik aynen devam eder. KynA'nın yüksek glukoz konsantrasyonuna ilaveten insülinle artan oksidatif stresi de %84,3 azaltması; NMDA reseptörü aktive olduğunda NO ve ROS/RNS üretimlerinin aynı sinyal iletim yolağından meydana gelebileceğini göstermektedir. Sonuçta KynA, insülinle ilk 24 saatte meydana gelen %41 oksidatif stresi %8,8'e, ikinci 24 saatte ise sadece yüksek glukozu göre %260,3 azaltarak $2,29 \pm 0,08$ 'e yükselen oksidatif stresi $0,36 \pm 0,01$ 'e düşürür. GLUT3'ün membran füzyonunu da azaltır. Glukoz+İnsülinle ortalama total mitokondrial metabolik aktivite ilk 24 saatte $MTT = 85,2 \pm 1,2$, ikinci 24 saatte ise $MTT = 22,95 \pm 1,04$ iken Glukoz+İnsülin+KynA'le ilk 24 saatte ($MTT = 104,8 \pm 8,66$) %18,7 artmış, ikinci 24 saatte ise ($MTT = 103,9 \pm 6,49$) %77,9 artmıştır (Bkz Çizelge 4.2.).

4.2.2. Yüksek glukoz uyarısı ve Nω -nitro-L-arginin metil ester

Bu çalışmada öncelikle yüksek glukoz konsantrasyonu ile devam eden NMDA reseptör uyarısı ve nNOS aktivasyonu karşısında nöron hasarını en az düzeye indirmek için ortama ilave edilecek L-NAME'in optimal dozu belirlenmiştir. Ortamdaki 150 mg/dL, 200 mg/dL ve 250 mg/dL glukozu 25 µM sabit dozda L-NAME ilavesi ile birinci 24 saatle ikinci 24 saat arasında MTT oranı ortalama %5,35 artmış, oksidatif stres şiddeti %29,2 azalmıştır. Ancak aynı glukoz konsantrasyonlarında ortama 100 µM L-NAME ilave edildiğinde, bu kez birinci ve ikinci 24 saatler arasında oksidatif stres şiddeti %15,8 azaldığında MTT %13,5 arttığı görülmüştür. 1000 µM L-NAME ilave edildiğinde ise MTT'nin %13,5 artmasına karşın oksidatif stres şiddeti %28,3 azalmıştır. Oksidatif stresin şiddetini en etkin biçimde azaltarak, MTT'yi artıran optimal L-NAME dozu 25 µM olarak belirlenmiştir (Bkz Çizelge 4.5., Çizelge 4.6.). Yüksek glukoz ve 40 µU/ml insülin bulunan ortamda ikinci 24 saatte SH-SY5Y hücrelerinin maruz bulunduğu oksidatif stres L-NAME ile sadece glukoz bulunan ortama nazaran $2,29 \pm 0,08$ 'den $0,37 \pm 0,01$ 'e düşerek %259 azalmıştır. Hücrelerin ürettiği NO miktarı ise $0,673 \pm 0,026$ 'dan $0,526 \pm 0,02$ 'ye düşerek %8,7 oranında azalmıştır. Bu sırada glukoz + 40 µU/ml insülin ile meydana gelen insülin direncinin total mitokondrial

metabolik aktivitede meydana getirdiği azalma ortadan kalkmıştır. 25 µM L-NAME ile 100 µM ve 1000 µM L-NAME karşılaştırıldığında ikinci 24 saatte nNOS inhibisyonunda ve insülin direncinin düzeltilmesinde en başarılı L-NAME dozunun 25 µM olduğu tespit edilmiştir. Sadece yüksek glukoz bulunan ortama 25 -100 ve 1000 µM L-NAME ilave edilmesinin ikinci hücre siklusunda meydana getirdiği nNOS inhibisyonunun birbirinden farklı olmadığı gözlenmiştir. Bu bulgular, 25 µM L-NAME'in aşırı NO sentezini önleyerek NO'in antioksidan etkisini öne çıkardığını ortaya koymuştur (Bkz Çizelge 4.6., Çizelge 4.7.). Belirlenen 25µM L-NAME'in ortama ilavesinin nNOS inhibisyonu yaptığı, yüksek glukoz uyarısı ile aşırı NO sentezi ve RNS'nin oluşumuna bağlı oksidatif stres meydana gelmesini engellediği, total mitokondrial metabolik aktivite ve hücre canlılığını artırdığını göstermiştir.

Çizelge 4.5. SH-SY5Y hücrelerinin bulunduğu ortama 25µM, 100µM, 1000µM L-NAME'e 150, 200 ve 250mg/dL yüksek konsantrasyonda glukoz ve 40µU/ml insülin ilave edildikten 24. ve 48. saatte MTT ve Q düzeyleri

ORTAMA EKLENEN MADDE	Süre (saat)	MTT (%)			Q		
		150 (mg/dL glukoz)	200 (mg/dL glukoz)	250 (mg/dL glukoz)	150 (mg/dL glukoz)	200 (mg/dL glukoz)	250 (mg/dL glukoz)
Glukoz (mg/dL)	24	114,0±5,45	122,2±6,24	121,5±4,06	0,36±0,01	0,34±0,02	0,32±0,01
	48	74,8±2,07	47,9±4,09	41,9±3,90	0,48±0,01	0,79±0,02	0,95±0,02
Glukoz (mg/dL)+40µU/ml İnsülin	24	86,6±1,68	83,1±0,97	86,0±0,98	0,45±0,003	0,52±0,03	0,48±0,01
	48	40,9±1,78	13,5±0,79	14,4±0,56	0,97±0,05	3,05±0,07	2,87±0,12
25µM L-NAME	24	94,2±5,77	92,9±4,61	93,1±3,12	0,69±0,03	0,69±0,02	0,58±0,06
	48	98,4±5,62	95,0±4,85	101,8±1,36	0,51±0,08	0,45±0,02	0,44±0,04
25µM L-NAME+40µU/ml İnsülin	24	96,3±2,79	101,1±1,71	97,9±4,57	0,51±0,1	0,40±0,01	0,40±0,01
	48	97,9±3,47	100,3±5,28	99,6±4,27	0,35±0,003	0,35±0,01	0,42±0,03
100µM L-NAME	24	92,7±3,80	96,0±9,0	94,5±1,20	0,61±0,01	0,64±0,07	0,65±0,04
	48	107,6±0,60	106,3±1,40	107,7±1,60	0,64±0,02	0,51±0,02	0,44±0,03
100µM L-NAME+40µU/ml İnsülin	24	100,0±7,70	95,0±1,40	95,7±3,30	0,57±0,06	0,57±0,05	0,67±0,06
	48	123±17,80	119,0±12,30	107,9±8,50	0,44±0,03	0,46±0,04	0,46±0,04
1000µM L-NAME	24	98,6±0,80	98,0±8,80	97,0±7,30	0,55±0,02	0,60±0,08	0,64±0,06
	48	120,06±2,5	106,3±1,40	107,7±1,60	0,51±0,11	0,40±0,04	0,39±0,08
1000µM L- NAME+40µU/ml İnsülin	24	95,0±6,50	82,7±1,40	81,5±7,50	0,81±0,05	0,80±0,11	0,90±0,05
	48	102,0±1,50	102,0±10,70	106,0±2,30	0,63±0,01	0,55±0,05	0,65±0,10

(N-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME), total mitokondrial metabolik aktivite/hücre canlılığı (MTT) ve oksidatif stress ($Q = \frac{[(NO_3 + NO_2)/Cc]}{[MTT/Cc]}$))

Çizelge 4.6. SH-SY5Y hücrelerinin bulunduğu ortama 25µM, 100µM, 1000µM L-NAME'e 150, 200 ve 250mg/dL yüksek konsantrasyonda glukoz ve 40 µU/ml insülin ilave edildikten 24. ve 48. saatte ortalama MTT ile ortalama Q ve NO değişim oranları

ORTAMA EKLENEN MADDE	Süre (saat)	MTT (%)	% MTT artma	Q	% Q artma	[NO ₃ +NO ₂ /Cc] (µM/hücre sayısı)	% [NO ₃ +NO ₂ / Cc] artma
Glukoz (mg/dL)	24	119,2±5,25	-53,9	0,34±0,01	+117,6	1,196±0,04	+42,6
	48	54,87±3,35		0,74±0,02		1,706±0,03	
Glukoz (mg/dL)+40µU/ml İnsülin	24	85,6±1,21	-73,2	0,48±0,01	+377	0,832±0,02	-19,0
	48	22,9±1,04		2,29±0,08		0,673±0,026	
Glukoz (mg/dL)+25µM L- NAME	24	93,4±4,5	+5,35	0,65±0,03	-29,2	0,796±0,03	-8,29
	48	98,4±3,94		0,46±0,04		0,730±0,07	
Glukoz (mg/dL)+25µM L- NAME+40µU/ml İnsülin	24	98,4±3,02	+0,8	0,43±0,04	-13,9	1,044±0,10	-49,6
	48	99,2±4,34		0,37±0,01		0,526±0,02	
Glukoz (mg/dL)+100µM L-NAME	24	94,4±1,97	+13,5	0,63±0,04	-15,8	1,256±0,43	-47,4
	48	107,2±1,2		0,53±0,02		0,66±0,15	
Glukoz (mg/dL)+100µM L-NAME+40µU/ml İnsülin	24	96,9±4,13	+20,3	0,60±0,06	-25	0,923±0,32	-6,5
	48	116,6±12,87		0,45±0,04		0,863±0,49	
Glukoz (mg/dL)+1000µM L-NAME	24	97,9±5,63	+13,5	0,60±0,05	-28,3	1,06±0,29	-32,0
	48	111,2±1,83		0,43±0,08		0,72±0,28	
Glukoz (mg/dL)+1000µM L-NAME+40µU/ml İnsülin	24	86,4±5,13	+19,5	0,84±0,07	-27,3	1,31±0,42	-6,8
	48	103,3±4,83		0,61±0,05		1,22±0,46	

(N-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME), ortalama total mitokondrial metabolik aktivite/hücre canlılığı (MTT), oksidatif stress ($Q = \frac{[NO_3 + NO_2]/Cc}{[MTT]/Cc}$), nitrik oksit ($NO = \frac{[NO_3 + NO_2]/Cc}{[MTT]/Cc}$))

Çizelge 4.7. SH-SY5Y hücrelerinin bulunduğu ortama 25µM, 100µM, 1000µM L-NAME'e 150, 200 ve 250mg/dL yüksek konsantrasyonda glukoz ve 40µU/ml insülin ilave edildikten sonra ortalama yüksek glukoz konsantrasyonuna göre ortalama MTT, ile ortalama Q ve NO değişim oranları

ORTAMA EKLENEN MADDE	Süre (saat)	MTT (%)	% MTT artma	Q	% Q artma	[NO ₃ +NO ₂ /Cc] (µM/hücre sayısı)	% [NO ₃ +NO ₂ /Cc] artma
Glukoz (mg/dL)	24	119,2±5,25	100	0,34±0,01	100	1,196±0,04	100
	48	54,87±3,35	100	0,74±0,02	100	1,706±0,03	100
Glukoz (mg/dL)+40µU/ml İnsülin	24	85,6±1,21	-28,2	0,48±0,01	+41,0	0,832±0,02	-30,4
	48	22,9±1,04	-58,3	2,29±0,08	+209,0	0,673±0,026	-60,5
Glukoz (mg/dL)+25µM L-NAME	24	93,4±4,46	-21,6	0,65±0,03	+91,2	0,796±0,03	-33,4
	48	98,4±3,94	+79,3	0,46±0,04	-37,8	0,730±0,07	-57,2
Glukoz (mg/dL)+25µM L-NAME+40µU/ml İnsülin	24	98,4±3,02	-17,4	0,43±0,04	+26,5	1,044±0,10	-12,7
	48	99,2±4,34	+80,8	0,37±0,01	-50,0	0,526±0,02	-69,0
Glukoz (mg/dL)+100µM L-NAME	24	94,4±1,97	-20,8	0,63±0,04	+85,3	1,256±0,43	+5,0
	48	107,2±1,2	+95,3	0,53±0,02	-28,4	0,66±0,15	-61,3
Glukoz (mg/dL)+100µM L-NAME+40µU/ml İnsülin	24	96,9±4,13	-18,7	0,60±0,06	+76,5	0,923±0,32	-22,8
	48	116,6±12,87	+112,5	0,45±0,04	-39,2	0,863±0,49	-49,4
Glukoz (mg/dL)+1000µM L- NAME	24	97,9±5,63	-17,8	0,60±0,05	+76,5	1,06±0,29	-11,3
	48	111,2±1,83	+102,6	0,43±0,08	-41,9	0,72±0,28	-57,7
Glukoz (mg/dL)+1000µM L- NAME+40µU/ml İnsülin	24	86,4±5,13	-27,5	0,84±0,07	+147,0	1,31±0,42	+9,5
	48	103,3±4,83	+88,2	0,61±0,05	-17,6	1,22±0,46	-28,4

(N-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME), ortalama total mitokondrial metabolik aktivite/hücre canlılığı (MTT), oksidatif stress ($Q = \frac{[NO_3 + NO_2]/Cc}{[MTT/Cc]}$), nitrik oksit ($NO = \frac{[NO_3 + NO_2]/Cc}{[Cc]}$))

25µM L-NAME ortamdaki glukozla ilave edildiğinde ilk 24 saatta ortalama hücre canlılığı %93,4±4,46, ortalama Q(Glukoz+L-NAME) =0,65±0,03'dir. İkinci 24 saatta ise sadece yüksek glukoz konsantrasyonu varlığında ölçülen ortalama hücre canlılığı %54,87±3,35 ve Q(Glukoz)= 0,74±0,02'dir. Glukoza, 25µM L-NAME ilave edildiğinde ise ikinci 24 saatta ortalama hücre canlılığı %98,4±3,94'e yükselmiş ve Q(Glukoz+L-NAME)= 0,46±0,04'e düşmüştür. Ortalama $[(NO_3 + NO_2)/Cc]$ ikinci 24 saatta 0,796±0,03 µM/hücre sayısı'ndan 0,730±0,07 µM/hücre sayısına düşerek oksidatif strese katkıda bulunan NO miktarı %8,29 azalmış ve total mitokondrial metabolik aktivite kontrol grubu düzeyine çıkmıştır. L-NAME, yüksek konsantrasyonda glukozla karşı karşıya bulunan nöronlarda kontrol grubuna nazaran %50 artan GLUT3 düzeyinin aynen kalmasını sağlamış, ikinci 24 saatta ise %55,5 oranında azaltmıştır. İlk 24 saatta %33,4 azalan NO düzeyi ikinci 24 saatta %57,2

azalmıştır. Ortamda sadece glukoza maruz bulunan nöronlarda ortama L-NAME ilavesi ile ilk 24 saatta NO %33,4 azalırken oksidatif stres %91 artmıştır. İkinci 24 saatta NO'in %57,2 azalması ile oksidatif stres %91 den yaklaşık %129 oranında düşmüştür. Bu esnada MTT oksidatif stresin artması ile %21,6 azalmış, oksidatif stresin azalması ile %79,9 artmıştır. Bu bulgular, NO sentezinde azalma sonucu nöron içine giren glukozun azaldığını ve oksidatif stresin azalması ile ters orantılı olarak hücre canlılığının arttığını ortaya koymaktadır (Bkz Çizelge 4.8.).

Çizelge 4.8. SH-SY5Y hücre kültürü ortamında 150, 200, 250mg/dL yüksek konsantrasyonda glukoz bulunduğunda insülin, KynA ve L-NAME ilavesi ile ölçülen Q, GLUT3/Cc, MTT ve NO düzeylerinin ortalama değerlerinin, ortalama Q (glukoz), GLUT3 (glukoz), MTT (glukoz) ve NO glukoz değerlerine göre değişimi

Ortama eklenen madde	Süre (saat)	Q	Q %artış	GLUT3/Cc (ng/ml /hücre sayısı)	GLUT3 /Cc % artış	MTT (%)	MTT %artış	NO ₃ +NO ₂ /Cc (μM/hücre sayısı)	NO %artış
Kontrol	24	0,41±0,01	--	0,0006±0,0001	--	100±0,92	--	0,5700±0,01	--
	48	0,39±0,01	--	0,0010±0,0001	--	100±2,11	--	0,6844±0,01	--
Glukoz (mg/dL)	24	0,34±0,01	(100)	0,0009±0,0000	(100)	119,2±5,2	(100)	1,196±0,04	(100)
	48	0,74±0,001	(100)	0,0018±0,0002	(100)	54,9±3,35	(100)	1,706±0,04	(100)
Glukoz (mg/dL) + 40μU/ml insülin	24	0,48±0,01*	+41,0	0,0007±0,0000*	-22,2	85,2±1,20*	-29,5	0,832±0,2*	-30,4
	48	2,29±0,08*	+209,0	0,0007±0,0000*	-61,0	22,95±1,4*	-58,2	0,673±0,026*	-60,5
Glukoz (mg/dL)+ 30nM KynA	24	0,42±0,02*	+23,5	0,0004±0,0001*	-55,5	93,9±3,39*	-21,2	0,630±0,014*	-47,3
	48	0,37±0,01*	-50,0	0,0010±0,0001	-33,0	97,3±2,85*	+77,3	0,663±0,026*	-61,1
Glukoz (mg/dL)+ 25μM L-NAME	24	0,65±0,02*	+91	0,0009±0,0001	0	93,4±4,46*	-21,6	0,796±0,03*	-33,4
	48	0,46±0,04*	-37,8	0,0008±0,0000*	-55,5	98,7±3,94*	+79,9	0,730±0,07*	-57,2
Glukoz (mg/dL) + 30nM KynA + 40μU/ml insülin	24	0,37±0,01	+8,8	0,0007±0,0001*	-22,0	104,8±8,60	-12,0	0,736±0,01*	-38,5
	48	0,36±0,01*	-51,3	0,0009±0,0001*	-50,0	103,9±6,49*	+89,3	0,660±0,02*	-61,3
Glukoz (mg/dL) + 25μM L-NAME + 40μU/ml insülin	24	0,43±0,04*	+26,4	0,0009±0,0001*	0	98,4±3,00*	-17,4	1,044±0,10	-12,7
	48	0,37±0,01*	-50,0	0,0008±0,0001*	-55,5	99,3±4,34*	+80,9	0,526±0,02*	-69,2

*p<0,05; 150 – 200 – 250 mg/dL ortalama glukoz – ortalama glukoz + (insülin, KynA veya L-NAME) veya (KynA + insülin veya L-NAME + insülin) ile aynı inkübasyon süresindeki grupların istatistiksel karşılaştırılması (Kinürenik asit (KynA) ve N-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME), oksidatif stres (Q), glukoz taşıyıcı-3 (GLUT3/Cc), total mitokondrial metabolik aktivite (MTT), nitrik oksit (NO; [(NO₃+NO₂)/Cc]))

Glukoz+insülin+L-NAME bulunan ortamdaki hücre lizatlarından elde edilen GLUT3 ile glukoz+insülin bulunan ortamdaki hücrelerin GLUT3/Cc değerleri karşılaştırıldığında sadece 250 mg/dl glukoz için ilk 24 saatte artma (p<0,05), ikinci 24 saatte ise azalma (p<0,05) bulunmuştur. Aslında L-NAME'in nNOS blokajının ancak ikinci 24 saatte etkili

olduğu bilinmektedir (Bkz Çizelge 4.1.). Nitekim ilk 24 saatte mevcut antioksidan kapasitede yüksek glukozla meydana gelen ortalama $[(NO_3+NO_2)/Cc]$ miktarı $1,196\pm0,036$ $\mu M/hücre$ sayısı'ndan L-NAME ilavesi ile $0,796\pm0,003$ $\mu M/hücre$ sayısı'na düşmüştür. Ancak GLUT3/Cc düzeyinde istatistiksel olarak önemli bir fark meydana gelmemiştir. İkinci 24 saatte ise L-NAME ile $[(NO_3+NO_2)/Cc]$ miktarı %57,2 azalırken oksidatif stresin şiddetinde %37,8 azalma meydana gelmiştir. NO'de %57,2 azalma, GLUT3/Cc de %55,5 azalmanın sonucudur. Ortama glukoz+L-NAME+İnsülin ilave edildiğinde ilk 24 saatte $[(NO_3+NO_2)/Cc]= 1,044\pm0,10$ $\mu M/hücre$ sayısı, GLUT3/Cc= $0,0009\pm0,0001$ ng/ml/hücre sayısı, ikinci 24 saatte $[(NO_3+NO_2)/Cc]=0,5266\pm0,02$ $\mu M/hücre$ sayısı, GLUT3/Cc= $0,0008\pm0,0001$ ng/ml/hücre sayısı'dır. Birinci 24 saata göre ikinci 24 saatte $[(NO_3+NO_2)/Cc]$ 'de %49,6 azalma olurken, GLUT3/Cc'de %11,1 azalma meydana gelmiştir. Glukoz+L-NAME ile oksidatif stres ilk 24 saatte %91 artarken, ikinci 24 saatte %37,8 azalmıştır. Glukoz+L-NAME+İnsülinle oksidatif stres ilk 24 saatte %26,4 artmış, ikinci 24 saatte ise %50 azalmıştır. Yüksek glukoz bulunan ortamda KynA, GLUT3/Cc'yi tek başına ilk 24 saatte %55,5, ikinci 24 saatte %33, insülinle birlikte ilk 24 saatte %22, ikinci 24 saatte %50 azaltmaktadır. Buna karşılık, yüksek glukoz bulunan ortamda L-NAME ilk 24 saatte, insülininden bağımsız olarak kontrollara göre glukozla artan ortalama GLUT3/Cc miktarında bir değişiklik yapmamakta, ancak ikinci 24 saatte GLUT3/Cc'yi %55,5 azaltmaktadır (Bkz Çizelge 4.2.).

Yüksek konsantrasyonda glukoz varlığında, mitokondrial $[NADPH+-NADP+]$ $-[GSSG-GSH]$ döngüsüne bağlı serbest radikal üretiminde rol oynayan NO'in $Q(\text{Glukoz}+\text{İnsülin})=0,48\pm0,014$ ortalama değerine karşı $Q(\text{glukoz}+\text{insülin}+\text{L-NAME})=0,43\pm0,04$ değeri istatistiksel olarak anlamlı düşüktür (200 mg/dl ve 250 mg/dl için $p<0,05$). Hücre canlılık oranı $NADP-NADPH^+$ 'ye bağlı total mitokondrial metabolik aktiviteyi gösterdiğinden, ilk 24 saatte oksidatif streste %26,4 artış, ilk hücre siklusu sırasında ortamda bulunan NO kaynaklı radikallerin, nNOS'tan bağımsız olarak mevcut bulunduğunu göstermektedir. İkinci 24 saatte 150, 200 veya 250 mg/dl glukoz+insülinle meydana gelen ortalama $[(NO_3+NO_2)/Cc]$ birikimi $0,673\pm0,03$ $\mu M/hücre$ sayısı iken, ortama L-NAME ilave edildikten sonra $[(NO_3+NO_2)/Cc]$ birikimi ortalama $0,526\pm0,02$ $\mu M/hücre$ sayısı'na düşmüştür. İkinci 24 saatte L-NAME ile NO sentezinde azalma %21,8 olarak bulunmuştur. L-NAME ile ikinci 24 saatte elde edilen $[(NO_3+NO_2)/Cc]$ miktarı ise ilk

24 saatta elde edilen değere ($1,044 \pm 0,10$ μM /hücre sayısı) nazaran %49,6 oranında düşmüştür. Bu bulgular, glukoz+insülin bulunan ortamda $25\mu\text{M}$ L-NAME'in ancak ikinci 24 saatta SH-SY5Y hücrelerinde önemli ölçüde nNOS inhibisyonu yaptığını, ilk hücre siklusu sırasında mevcut NO'nin SH-SY5Y hücrelerin nNOS aktivitesinden bağımsız olduğunu göstermektedir (Bkz Çizelge 4.2., Çizelge 4.4.).

Nitekim ikinci 24 saatta hem Q(Glukoz+L-NAME) hem de Q(Glukoz+İnsülin+L-NAME) ile meydana gelen oksidatif stresin şiddeti, ilk 24 saatta elde edilen değerlerden istatistiksel olarak düşük bulunmuştur ($p < 0,05$). Buna ilaveten L-NAME'in ikinci 24 saat içinde, ortamda sadece glukozla karşı karşıya bulunan nöronlara nazaran oksidatif stresin şiddetini tek başına %37,8, insülinle birlikte olduğunda %50 azaltarak SH-SY5Y hücre canlılığını %79,9 ve %80,9 artırmıştır. Ortamda Glukoz+İnsülin+L-NAME varken ilk 24 saatta hücre canlılığı ortalama $98,4 \pm 3$ (MTT/Cc= $2,35 \pm 0,07$ %/hücre sayısı), ikinci 24 saatta ise ortalama $99,29 \pm 4,34$ (MTT/Cc= $1,41 \pm 0,06$ %/hücre sayısı) bulunmuştur. Oksidatif stres şiddeti; ilk 24 saatta $98,4 \pm 3,02$ hücre canlılığı için $Q = 0,43 \pm 0,04$ ve ikinci 24saatta $99,29 \pm 4,3$ hücre canlılığı için $Q = 0,37 \pm 0,014$ bulunmuştur. Birinci ve ikinci 24 saatlar arasında tüm glukoz konsantrasyonlarında GLUT3/Cc değerleri arasında istatistiksel bir fark saptanmamıştır ($p > 0,05$). Oksidatif stres sadece glukoz ilave edilen ortama göre ilk 24 saatta %26,4 artmış, ikinci 24 saatta ise %50 azalmıştır. Birinci 24 saata göre, ikinci 24 saatta ortalama oksidatif streste azalma %76,4, $[(\text{NO}_3 + \text{NO}_2)/\text{Cc}]$ 'de azalma ise %56,5'dir. Bu sırada GLUT3/Cc'de azalma ortalama %11,1 bulunmuştur. Bu bulgular L-NAME ile nNOS inhibisyonunun NO ve oksidatif stres düzeylerini etkilediğini göstermektedir.

Ortamda glukoz+insülin varken oksidatif stres glukozla maruz bulunan nöronlara göre ilk 24 saatta %41, ikinci 24 saatta %209 artmıştır. Aynı ortama L-NAME ilave edilmesiyle oksidatif stres ilk 24 saatta %26,4 artmış, ikinci 24 saatta ise %50 azalmıştır. Bu da L-NAME ile Glukoz+İnsülin bulunan ortama göre ikinci 24 saatta nNOS inhibisyonunun meydana gelmesi ile $[(\text{NO}_3 + \text{NO}_2)/\text{Cc}]$ 'deki %49,6 azalmadan kaynaklanmaktadır. Hem Glukoz+İnsülin bulunan ortamla, Glukoz+İnsülin+L-NAME bulunan ortam arasında, hem de Glukoz+L-NAME ile Glukoz+İnsülin+L-NAME bulunan ortam arasında GLUT3/Cc düzeyleri bakımından istatistiksel bir fark yoktur. Bu bulgular ortamda insülin ve glukoz

varken ikinci 24 saatte meydana gelen oksidatif stresin, ortama L-NAME ilave edildiğinde %83,8 oranında azaldığını göstermektedir. Ancak ortamda yüksek konsantrasyonda glukoz bulunmasına rağmen insülin ilave edildiğinde GLUT3/Cc ekspresyonu bazal düzeyde kalmaktadır. Ortamdaki glukozu L-NAME ilave edildiğinde ikinci 24 saatte NO'de azalma %57,2, insülin ve L-NAME birlikte ilave edildiğinde ikinci 24 saatte NO'de azalma %69,2'dir. Bu azalma GLUT3'de ortama hem L-NAME, hem de L-NAME+insülin ilavesi ile ikinci 24 saatte meydana gelen %55,5 azalma ile açıklanabilir.

4.2.3. Yüksek glukoz uyarısı ve kinürenik asit

Bu çalışmada erişkin kolinerjik fenotip olmayan farklılaşmamış SH-SY5Y hücreleri kullanılmıştır. Bu nedenle nM konsantrasyonlarda KynA'nın, $\alpha 7nAChR$ inhibisyonu yapması beklenmemektedir (Luccini ve diğerleri, 2007; Pålman ve diğerleri, 1984). Ön çalışmalarda, NMDA reseptör blokajı için test edilen 30nM ve 300nM KynA dozları, SH-SY5Y hücre kültürü ortamında 150 mg/dL, 200mg/dL ve 250mg/dL glukozu ilave edilerek MTT, $[(NO_3+NO_2)/Cc]$ ve Q değerleri bakımından karşılaştırılmıştır. Literatürde KynA-C1q-CD59 ilişkisi konusunda bir bilgiye ulaşılamamakla birlikte ortama 30nM KynA veya 300nM KynA ilave edilmesi arasında total mitokondrial metabolik aktivitenin-nöron canlılığının ve hücrelerin maruz bulundukları oksidatif stresin şiddetinin istatistiksel değerlendirmede farklı olmadığı görülmektedir. Sinaptik NMDA reseptör aktivitesinin fizyolojik düzeyde devamı bakımından 30nM KynA dozu tercih edilmiştir. 30nM KynA, yeterli ekstrasinaptik NMDA reseptör-GluN2B alt ünite blokajı yaptığı düşünülen kritik doz olarak kabul edilmiştir (Bkz Çizelge 4.9., Çizelge 4.10.).

Çizelge 4.9. NMDA reseptör blokajı için KynA dozlarının karşılaştırılması

Ortama eklenen madde	Süre (saat)	(NO ₃ +NO ₂)/Cc (µM/hücre sayısı)	Q	MTT (%)	C1q/med/Cc (ng/ml/hücre sayısı)	CD59/Cc (ng/ml/hücre sayısı)
Kontrol	24	0,570±0,01	0,41±0,01	100±0,92	0,0151±0,0006	0,0102±0,0013
	48	0,684±0,01	0,39±0,01	100±2,11	0,0175±0,0004	0,0166±0,0013
150 mg/dl Glukoz+ 300nM KynA	24	0,780±0,01	0,36±0,003	103,5±6,71	0,0205±0,0001	0,0115±0,0006
	48	0,536±0,01	0,42±0,01	91,4±1,18	0,0140±0,0001	0,0100±0,0006
200 mg/dl Glukoz+ 300nM KynA	24	0,823±0,03	0,39±0,012	98,4±4,68	0,0212±0,0009	0,0125±0,0009
	48	0,626±0,01	0,39±0,003	97,3±5,52	0,0171±0,0000	0,0109±0,0002
250 mg/dl Glukoz+ 300nM KynA	24	0,676±0,03	0,42±0,02	89,04±0,84	0,0179±0,0001	0,0108±0,0011
	48	0,593±0,03	0,36±0,02	101,5±5,68	0,0161±0,0000	0,0109±0,0007
150 mg/dl Glukoz+40µU/ml İnsülin+300nM KynA	24	0,526±0,02	0,40±0,01	93,7±7,00	0,0143±0,0002	0,0074±0,0010
	48	0,706±0,03	0,39±0,02	99,3±13,50	0,0184±0,0002	0,0178±0,0008
200 mg/dl Glukoz+40µU/ml İnsülin+300nM KynA	24	0,660±0,02	0,36±0,01	103,0±8,31	0,0175±0,0002	0,0102±0,0005
	48	0,600±0,02	0,36±0,01	103,7±5,00	0,0160±0,0002	0,0146±0,0015
250 mg/dl Glukoz+40µU/ml İnsülin+300 nM KynA	24	0,746±0,04	0,27±0,01	132,9±13,90	0,0216±0,0004	0,0107±0,0007
	48	0,666±0,02	0,33±0,01	108,8±0,90	0,0179±0,0001	0,0172±0,0009

(N-metil-D-aspartat ile aktive reseptör (NMDAR), kinürenik asit (KynA), total mitokondrial metabolik aktivite-hücre canlılığı (MTT), oksidatif stress (Q=[(NO₃+NO₂)/Cc]/[MTT/Cc]), nitrik oksit ((NO₃+NO₂)/Cc), kompleman düzenleyici protein (CD59/Cc))

Çizelge 4.10. NMDA reseptör blokajı için 30 ve 300 nM KynA dozlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması

1	2	Süre (saat)	(NO ₃ +NO ₂)/Cc (µM/hücre sayısı)	Q	MTT (%)	C1q/med/Cc (ng/ml/hücre sayısı)	CD59/Cc (ng/ml/hücre sayısı)
150 mg/dl Glukoz+ 300 nM KynA	150 mg/dl Glukoz +30nM KynA	24	NS	NS	NS	S 1>2	NS
		48	NS	S 1>2	NS	S1<2	S 1<2
200 mg/dl Glukoz+ 300 nM KynA	200 mg/dl Glukoz +30nM KynA	24	S 1>2	S 1<2	NS	S 1>2	S 1>2
		48	S 1<2	NS	NS	S 1<2	S 1<2
250 mg/dl Glukoz+ 300 nM KynA	250 mg/dl Glukoz +30nM KynA	24	S 1>2	NS	NS	S 1>2	S 1>2
		48	NS	NS	NS	S 1<2	S 1<2
150 mg/dl Glukoz +40µU/ml İnsülin+ 300nM KynA	150 mg/dl Glukoz +40µU/ml insülin +30nM KynA	24	S 1<2	NS	NS	S 1<2	S 1<2
		48	S 1>2	S 1>2	NS	S 1>2	NS
200 mg/dl Glukoz +40µU/ml İnsülin+ 300nM KynA	200 mg/dl Glukoz +40µU/ml insülin +30nM KynA	24	S 1<2	NS	NS	S 1<2	S 1<2
		48	S1>2	NS	NS	S 1>2	NS
250 mg/dl Glukoz +40µU/ml İnsülin+ 300nM KynA	250 mg/dl Glukoz +40µU/ml insülin +30nM 30 KynA	24	S 1>2	NS	NS	S 1>2	NS
		48	NS	NS	NS	S 1>2	S 1<2

(N-metil-D-aspartat ile aktive reseptör (NMDAR), kinürenik asit (KynA), total mitokondrial metabolik aktivite-hücre canlılığı (MTT), oksidatif stress (Q=[(NO₃+NO₂)/Cc]/[MTT/Cc]), nitrik oksit ((NO₃+NO₂)/Cc), kompleman düzenleyici protein (CD59/Cc), S=p<0.05, NS=p>0.05 (Pembe ile taranmış alanlar))

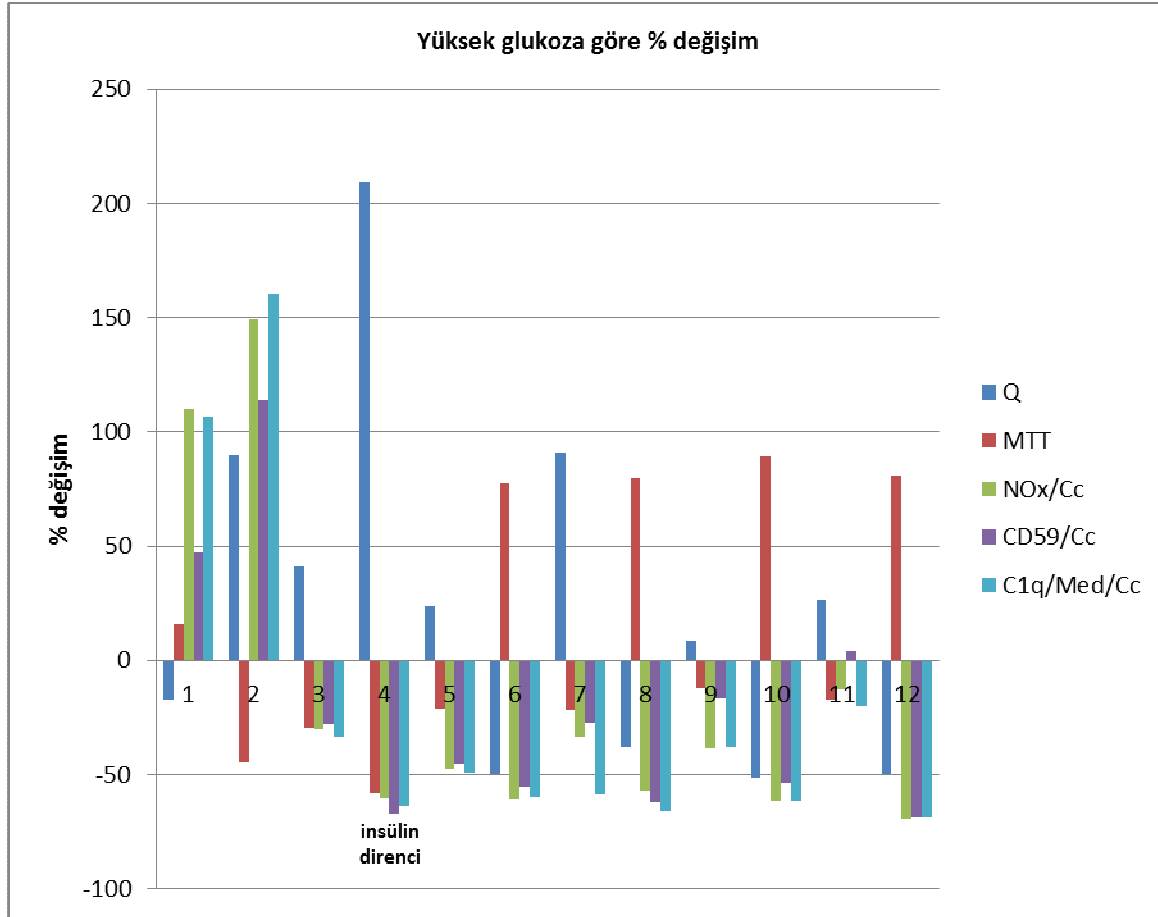
SH-SY5Y hücreleri bir siklus geçirdikten sonra ikinci 24 saatte 150 mg/ml, 200 mg/dl, 250 mg/dl glukoz konsantrasyonlarına maruz kaldıklarında oksidatif stresin $0,95 \pm 0,02$ 'ye kadar yükselmesi ile canlılık oranları $\%41,93 \pm 3,9$ 'a kadar düşmüş, 30nM KynA ilavesi ile ilk 24 saatte ortalama $MTT(Glukoz+KynA) = \%93,9 \pm 3,39$, ikinci 24 saatte $MTT(Glukoz+KynA) = \%97,28 \pm 2,85$ 'e çıkmıştır. İlk 24 saatte 150 ve 250 mg/dl glukoz + KynA ile elde edilen değerler ikinci 24 saatle farklı bulunmuştur ($p < 0,05$).

Glukoz+40 μ U/ml insülin ile ilk 24 saatte $MTT(Glukoz+insülin) = \%85,2 \pm 1,18$ ve ikinci 24 saatte $MTT(Glukoz+insülin) = \%22,95 \pm 1,04$ 'e kadar düşen canlılık oranları, KynA ilavesi ile ilk 24 saatte $MTT(Glukoz+insülin+KynA) = \%104,8 \pm 8,66$, ikinci 24 saatte $MTT(Glukoz+insülin+KynA) = \%103,92 \pm 6,49$ ($p < 0,05$) olmuş ve kontrollerle istatistiksel bakımdan farksız bulunmuştur. Hem 150 mg/dl glukoz hem de 150 mg/dl glukoz+ 40 μ U/ml insülinle aşırı miktarda NO üretilirken ortama KynA ilavesi hücre başına üretilen $[(NO_3+NO_2)/Cc]$ miktarını azaltmıştır. Buna karşılık hücre yaşamı kontrollerle aynı düzeyde korunmuştur (Bkz Çizelge 4.1.). Sonuçta; yüksek glukoz konsantrasyonuna maruz bırakılan SH-SY5Y hücrelerinde kontrollara göre birinci 24 saatte $\%109,9$, ikinci 24 saatte ise $\%149,3$ artan NO üretimi (Jimenez-Feltstrom, Lundquist ve Salehi, 2005), ortama KynA ilave edildiğinde ikinci hücre siklusunda $\%61,1$ azalmış ve oksidatif stres de $\%50$ düşmüştür (Bkz Çizelge 4.2.).

Yüksek glukoz uyarısı-insülin direnci ve kinürenik asit

Yüksek Glukoz+İnsülin bulunan ortamda NO üretiminin sadece glukoz bulunan ortama göre ilk 24 saatte $\%30,4$, ikinci 24 saatte ise $\%60,5$ azaldığı tespit edildi. İlk 24 saatte oksidatif stres $\%41$ artarken GLUT3 $\%22,2$, total mitokondrial metabolik aktivite $\%29,5$ azalmıştır. İkinci 24 saatte oksidatif stres $\%209$ 'a ulaşmış, GLUT3 $\%61$, NO sentezi $\%60,5$ ve total mitokondrial metabolik aktivite $\%58,2$ azalmıştır. Elde edilen bu sonuçlar 40 μ U/ml insülinle “**insülin direnci**”nin meydana geldiğini göstermektedir (Bkz Şekil 4.16.). Yüksek glukoz+insüline KynA ilave edildiğinde mitokondrial oksidatif stres ilk 24 saatte $\%32,2$, ikinci 24 saatte $2,29 \pm 0,08$ 'den $0,36 \pm 0,01$ 'e düşerek sadece yüksek glukozu göre $\%260,3$ azalmıştır. Buna karşılık hücre canlılığı ilk 24 saatte $\%23$ artmış, ikinci 24 saatte ise $\%22,95 \pm 1,04$ 'ten $\%103,9 \pm 6,49$ 'a çıkarak $\%352,7$ artmıştır. Ortama KynA ilavesi ile insülin

direnci sorunu ortadan kalkmış ve dopaminerjik nöron hasarı görülmemiştir (Bkz Çizelge 4.1., Çizelge 4.2.).



1 Glukoz - 24 saat

2 Glukoz - 48 saat

3 Glukoz + 40µU/ml
insülin - 24 saat

4 Glukoz + 40µU/ml
insülin - 48 saat

5 Glukoz+30nM KynA –
24 saat

6 Glukoz+30nM KynA –
48 saat

7 Glukoz+25µM L-NAME -
24 saat

8 Glukoz+25µM L-NAME -
48 saat

9 Glukoz+30nM KynA+ 40µU/ml
insülin - 24 saat

10 Glukoz+30nM KynA+ 40µU/ml
insülin - 48 saat

11 Glukoz+25µM L-NAME+
40µU/ml insülin - 24 saat

12 Glukoz+25µM L-NAME+
40µU/ml insülin - 48 saat

Şekil 4.16. Yüksek glukozu maruz kalan SH-SY5Y hücrelerinde 40 µU/ml insüline direnç (Glukoz= 150 mg/dl + 200 mg/dl + 250 mg/dl ortalama değerleri, MTT: total mitokondrial metabolik aktivite-hücre canlılığı, $Q = \frac{[(NO_3+NO_2)/Cc]}{[MTT/Cc]}$: oksidatif stress, nitrik oksit: $[(NO_3+NO_2)/Cc]$, CD59/Cc: kompleman düzenleyici protein, C1q/medium/Cc)

Goldstein ve ark. nöronlardaki insülin reseptörlerinin aktive olmasının mitokondrilerde reaktif radikaller ürettiğini göstermişlerdir (Goldstein, Mahadev ve Wu, 2005). Mitokondrial fonksiyonla insülin reseptör sinyal iletimi arasında doğrudan ilişki olması nedeni ile insülin direncinin mitokondrial disfonksiyonla sonuçlandığı ileri sürülmektedir

(Pomytkin, 2012). Glukoz+insülin'le meydana gelen oksidatif stresin kaynağı NADPH oksidaz'ın alt ünitesi NOX2'dir (Girouard ve diğerleri, 2009). nNOS ve NADPH oksidaz-NOX2, NMDA reseptörü ile aynı lokalizasyonda bulunur. NMDA reseptörü aktive olduğunda NO ve ROS/RNS üretimi aynı sinyal iletim yolağında meydana gelir. Ortama KynA ilave edilmesi ile meydana gelen NMDA reseptör blokajı NO üretimini azaltırken aynı lokalizasyondan kaynaklanan oksidatif stresi %84,2 oranında engellemektedir.

Kinürenik asit ve oksidatif stres

Sadece yüksek konsantrasyonda glukoz ilave edilen ortamda ikinci 24 saatta ortalama $0,74 \pm 0,016$ olan oksidatif stresi, KynA ilavesi $Q=0,37 \pm 0,011$ 'e düşürmüştür. Ortalama $Q(\text{glukoz}+\text{insülin})=2,29 \pm 0,08$ 'den, ortama KynA ilavesi ile $Q=0,36 \pm 0,01$ 'e düşmüştür. Yani oksidatif stresin şiddeti sadece glukoz ilave edilen ortama göre KynA ile ilk 24 saatta %23,5 artmışken ikinci 24 saatta %50 azalmıştır. Birinci 24 saattaki %23,5 artış ilk hücre siklusunda NMDA reseptör blokajı tamamlanmadan glikolizise bağlı ve ortamdan kaynaklanan serbest radikaller nedeni ile ortaya çıkmaktadır. Yüksek glukozla ilk 24 saatta kontrollara göre GLUT3/Cc artışı %33,3 olup, nöron içine glukoz transportu artmıştır. Glukoz uyarısı ile NO serbestleşmesi artmış $[(\text{NO}_3+\text{NO}_2)/\text{Cc}]=1,196 \pm 0,04 \mu\text{M}/\text{hücre}$ sayısına yükselmiştir; antioksidan kapasite kullanımı nedeniyle oksidatif stres %17 azalmıştır. Ortama KynA ilavesi ile NO düzeyi %47,3 düşerken, yüksek glukoz konsantrasyonu nedeni ile yeni antioksidan kapasite rejenere edilemediğinden oksidatif stres %23,5 artmaktadır. SH-SY5Y hücrelerinin ikinci siklusunda KynA etkisi ile NMDA reseptör blokajı sonucu GLUT3/Cc ilk 24 saata nazaran %150 artar, oksidatif stres ilk 24 saata göre %11,9, sadece glukoz bulunan ortama göre ise %50 oranında azalır. İkinci 24 saatta ortalama $\text{MTT}(\text{glukoz})= \%54,9 \pm 3,35$ 'ten $\text{MTT}(\text{glukoz}+\text{KynA})=\%97,3 \pm 2,85$ 'e yükselmiştir. KynA ilave edildiğinde total metabolik aktivite ilk 24 saatta %21,2 azalırken ikinci 24 saatta %77,3 artar. Yüksek glukozla maruz bulunan nöronlara göre KynA ile bir taraftan GLUT3 füzyonu ilk 24 saatta %55,5 azaltılır, ikinci 24 saatta ise %33,3 azaltılır. Diğer taraftan ekstrasinaptik NMDA reseptör blokajı ile ilk 24 saatta NO sentezi %47,3 azaltılarak, ikinci 24 saatta %61,1 azaltılarak aşırı NO sentezinin inhibe edilir ve NADPH oksidaz inhibisyonu ile nöron içine aşırı glukoz transportu ve serbest radikal üreten glikolitik yolağın hızı azalır (Bkz Çizelge 4.2.). Glukoz+KynA'le ikinci 24 saatta birinci 24

saata nazaran GLUT3 artışı %150 olmasına rağmen oksidatif stres ve NO sentezi azalmaktadır. Sadece yüksek glukoz ilave edilen ortamda NMDA reseptör blokajı yokken ikinci 24 saatta GLUT3 %100 artar, buna karşılık NO sentezi %42,6 artar ve oksidatif stres %117,6 artar. Bu bulgular KynA'le NMDA reseptör blokajının, nöron içine glukoz transportunun yüksek olmasına rağmen oksidatif stresi engellediğini göstermektedir (Bkz Çizelge 4.4.).

Glukoz+KynA ile ilk 24 saatta ortalama total metabolik aktivite $MTT/Cc=1,48\pm0,05$ (%/hücre sayısı) olup, bu değer ikinci 24 saatta $MTT/Cc=1,76\pm0,05$ 'dir. Bu değerler ortamda sadece glukoz bulunduğunda ilk 24 saattaki hücre metabolik aktivitesine ($3,48\pm0,15$ %/hücre sayısı) nazaran %57,47, ikinci 24 saattaki değerden ($2,35\pm0,15$ %/hücre sayısı) ise %25 düşüktür ($p<0,05$) (Bkz Çizelge 4.11.).

Çizelge 4.11. Kontrol grubu ve 150mg/dL, 200mg/dL ve 250mg/dL glukoz ilave edildikten sonra 40µU/ml insulin ve 30nM KynA ile 24 ve 48 saatta MTT, Q, NO, CD59 ve C1q cevabı

ORTAMA EKLENEN MADDE	Süre (saat)	MTT(%)	MTT/Cc (%/hücre sayısı)	Q	CD59/Cc (ng/ml/hücre sayısı)	GLUT3/Cc (ng/ml/hücre sayısı)
Kontrol	24	100±0,92	1,38±0,01	0,41±0,01	0,0102±0,0013	0,0006±0,0001
	48	100±2,10	1,73±0,04	0,39±0,01	0,0166±0,0013	0,0010±0,0001
Glukoz 150mg/dL	24	114,0±5,40	3,82±0,18	0,36±0,01	0,0187±0,0024	0,0011±0,0001
	48	74,8±2,07	2,74±0,07	0,48±0,01	0,0294±0,002	0,0014±0,0001
Glukoz 200mg/dL	24	122,2±6,20	3,22±0,16	0,34±0,02	0,0129±0,0015	0,0007±0,0000
	48	47,9±4,09	1,88±0,16	0,79±0,02	0,0276±0,0009	0,0016±0,0001
Glukoz 250mg/dL	24	121,5±4,00	3,42±0,11	0,32±0,01	0,0134±0,0008	0,0009±0,0000
	48	41,9±3,90	2,43±0,22	0,95±0,02	0,0496±0,0014	0,0025±0,0004
150 mg/dL Glukoz +40µU/ml insulin	24	86,6±1,68*	2,20±0,04*	0,45±0,003*	0,0149±0,0001*	0,0010±0,0001
	48	40,9±1,78*	0,58±0,02*	0,97±0,05*	0,0122±0,0002*	0,0007±0,0001*
200 mg/dL Glukoz +40µU/ml insulin	24	83,1±0,97*	1,50±0,01*	0,52±0,3*	0,0086±0,0005*	0,0006±0,0000*
	48	13,5±0,79*	0,25±0,01*	3,05±0,07*	0,0128±0,0006*	0,0007±0,0000*
250 mg/dL Glukoz +40µU/ml insulin	24	86,0±0,90*	1,51±0,01*	0,48±0,01*	0,0089±0,0004*	0,0006±0,0000*
	48	14,4±0,56*	0,24±0,00*	2,87±0,12*	0,0103±0,0004*	0,0008±0,0000*
150 mg/dL Glukoz +30nM KynA	24	99,3±0,28*	1,96±0,00*	0,39±0,01	0,0103±0,0001*	0,0006±0,0001*
	48	94,2±1,71*	1,38±0,02*	0,38±0,01*	0,0126±0,0009*	0,0008±0,0001*
200 mg/dL Glukoz +30nM KynA	24	91,0±8,90*	1,43±0,14*	0,45±0,01*	0,0084±0,0005*	0,0004±0,0001*
	48	98,75±3,35*	2,07±0,07	0,37±0,02*	0,0175±0,0010*	0,0011±0,0002
250 mg/dL Glukoz +30nM KynA	24	91,4±1,00*	1,07±0,01*	0,43±0,00*	0,0059±0,0004*	0,0003±0,0000*
	48	98,9±3,50*	1,83±0,06*	0,36±0,01*	0,0174±0,0020*	0,0010±0,0001

Çizelge 4.11. (devam) Kontrol grubu ve 150mg/dL, 200mg/dL ve 250mg/dL glukoz ilave edildikten sonra 40µU/ml insülin ve 30nM KynA ile 24 ve 48 saatta MTT, Q, NO, CD59 ve C1q cevabı

150 mg/dL Glukoz +40µU/ml insülin+30nM KynA	24	93,9±3,20*	1,65±0,05*	0,42±0,01	0,0117±0,0005	0,0006±0,0001*
	48	99,2±13,50	1,79±0,00*	0,39±0,01*	0,0178±0,0008*	0,0009±0,0001*
200 mg/dL Glukoz +40µU/ml insülin+30nM KynA	24	99,8±7,60*	2,26±0,17*	0,39±0,01	0,0144±0,0009*	0,0009±0,0001*
	48	103,7±5,08*	1,66±0,08	0,36±0,01*	0,0146±0,0015*	0,0008±0,0001*
250 mg/dL Glukoz +40µU/ml insülin+30nM KynA	24	120,7±15,20	1,97±0,25*	0,31±0,01	0,0116±0,0024*	0,0006±0,0001
	48	108,8±0,90*	1,99±0,00*	0,33±0,01*	0,0172±0,0009*	0,0010±0,0001*
150 mg/dL Glukoz +25 µM L-NAME	24	94,2±5,77*	1,32±0,08*	0,69±0,003*	0,0126±0,0012*	0,0008±0,0000*
	48	98,4±5,62*	1,19±0,06*	0,51±0,08	0,0139±0,0011*	0,0009±0,0000*
200 mg/dL Glukoz +25 µM L-NAME	24	92,9±4,61*	1,15±0,05*	0,69±0,02*	0,0100±0,0004	0,0007±0,0001
	48	95,0±4,85*	1,28±0,06*	0,45±0,02*	0,0135±0,0005*	0,0008±0,0000*
250 mg/dL Glukoz+ 25 µM L-NAME	24	93,1±3,12*	1,02±0,03*	0,58±0,06*	0,0101±0,0007*	0,0012±0,0001
	48	101,8±1,36	1,40±0,02	0,44±0,04*	0,0130±0,0009*	0,0007±0,0001*
150 mg/dL Glukoz+40µU/ml insülin +25µM L- NAME	24	96,3±2,79*	1,32±0,08*	0,51±0,11	0,0132±0,0006*	0,0008±0,0000
	48	97,9±3,47*	1,19±0,06*	0,35±0,003*	0,0139±0,0019*	0,0009±0,0000*
200 mg/dL Glukoz+40µU/ml insülin +25µM L-NAME	24	101,1±1,71*	1,15±0,05*	0,40±0,006*	0,0113±0,0018	0,0007±0,0001*
	48	100,3±5,28*	1,28±0,06*	0,35±0,011*	0,0096±0,0004*	0,0008±0,0000*
250 mg/dL Glukoz+40µU/ml insülin +25µM L- NAME	24	97,9±4,57*	1,02±0,03*	0,40±0,01*	0,0225±0,0017*	0,0012±0,0001*
	48	99,7±4,27*	1,40±0,018*	0,42±0,03*	0,0096±0,0009*	0,0007±0,0001*

*p<0,05; 150 – 200 – 250 mg/dL glukoz – glukoz + (insülin, KynA veya L-NAME) veya (KynA + insülin veya L-NAME + insülin) ile aynı konsantrasyon ve aynı inkübasyon süresindeki grupların karşılaştırılması (Kinürenik asite (KynA), total mitokondrial metabolik aktivite-hücre canlılığı (MTT), oksidatif stres (Q), nitrik oksit (NO; NO₃+NO₂)/Cc), kompleman düzenleyici protein (CD59), komplemanproteini C1q)

İkinci 24 saatta glukoz+insülin ilave edilen ortamda ortalama oksidatif stresin şiddeti sadece glukoz bulunan ortamdaki hücrelere nazaran %209 artmışken, KynA ilavesi ile ortalama total metabolik aktivite MTT(glukoz+insülin)= %22,95±1,04'ten MTT(glukoz+insülin+KynA)= %103,9±6,49'a yükselmiş, buna karşılık oksidatif stresin şiddeti %84,27 azalmıştır. Yüksek glukoz konsantrasyonuna maruz kalan SH-SY5Y hücrelerinde glukoz transportu ilk 24 saata göre ikinci 24 saatta %50 artar. Ortama KynA ilave edildikten sonra GLUT3/Cc düzeyi ilk 24 saatta %55,5, ikinci 24 saatta %33 düşer, ancak yine ilk 24 saata göre ikinci 24 saatta glukoz transportu yine %150'dir. Buna rağmen

glukoz+insülin ile meydana gelen şiddetli oksidatif stresin KynA ilavesi ile büyük oranda düzelmesi ve insülin direncinin ortadan kalkması, nöron içine alınan glukozun bir bölümünün antioksidan sistemin rejenerasyonunda kullanıldığını düşündürmektedir. Bu çalışmada, NMDA reseptörü-GluN2B'nin 30nM KynA ile blokajının, yüksek glukoz konsantrasyonunun ekstrasinaptik NMDA reseptör- ve yüksek glukoz+insülin-aracılı şiddetli oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir. Ancak glukoz+KynA bulunan ortamdaki SH-SY5Y hücrelerinde GLUT3 düzeyi birinci 24 saata göre ikinci 24 saatta %150 artarken, ortama insülin ilavesi ile bu artış %28,57 olmuştur. Ortamda glukoz+L-NAME varlığında elde edilen GLUT3 değerleri insülin ilavesi ile aynı düzeylerde kalmıştır. Glukoz+L-NAME+insülinle ilk 24 saattaki GLUT3 düzeyi ikinci 24 saatta %11 oranında azalmıştır. Tüm bu gruplarda ilk 24 saatta oksidatif strese yükselme olurken ikinci 24 saatta glukoz+insüline maruz bulunan nöronlar dışında diğerlerinde istatistiksel olarak anlamlı düşme meydana gelmiştir. Sadece glukoz+insülin grubunda ikinci 24 saatta ilk 24 saata nazaran %377 artış meydana gelmiştir (Bkz Çizelge 4.4.).

Hem KynA, hem de L-NAME'le elde edilen ortak sonuç, farklı mekanizmalarla olmakla birlikte dört grupta da NO üretiminde benzer düzeyde düşmeler görülmesidir. nNOS ve NADPH oksidaz-NOX2 alt ünitesi, NMDA reseptörü ile aynı lokalizasyonda bulunur. NMDA reseptörü aktive olduğunda NO ve ROS/RNS üretimi aynı sinyal iletim yolağında meydana gelir. Ortama KynA ilave edilmesi ile meydana gelen NMDA reseptör blokajı NO üretimini azaltırken aynı lokalizasyondan kaynaklanan oksidatif stresi de engellemektedir.

4.2.4. Yüksek glukoz uyarısı ve kompleman bileşeni 1q

Bu çalışmada SH-SY5Y hücrelerinde 150 mg/dl, 200 mg/dl ve 250 mg/dl glukozla ilk 24 saatta hücre canlılığında kontrollara göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış ($p<0,05$) meydana gelirken, C1q değerleri de kontrollara göre artmıştır ($p<0,05$) (Bkz Çizelge 4.12.). Ortamda sadece glukoz bulunduğunda ilk 24 saattaki oksidatif stresin şiddeti ($Q=0,34\pm0,01$), hem kontrollara ($Q=0,41\pm0,01$) göre hem de ikinci 24 saata ($Q=0,74\pm0,01$) göre düşüktür. C1q/Med/Cc ise kontrollara ($0,0151\pm0,0006$ ng/ml/hücre sayısı) göre ilk 24 saatta ortalama ($0,0312\pm0,0003$) %106,6, ikinci 24 saatta ($0,0456\pm0,0003$) %160,6 artmıştır ($p<0,05$). $[(NO_3+NO_2)/Cc]$ düzeylerinde artış ise ilk 24 saatta %109,9, ikinci 24

saatta ise %149,3'dür (Bkz Çizelge 4.13.). C1q'da ilk ve ikinci 24 saattaki artışlar, $[(NO_3+NO_2)/Cc]$ düzeyleri ile uyumlu gözükmemektedir.

Çizelge 4.12. Kontrol grubu ve 150mg/dL, 200mg/dL ve 250mg/dL glukoz ilave edildikten sonra, 40µU/ml insülin ve 30nM Kyn ile 24 ve 48 saatta C1q, nitrik oksit ve total mitokondrial metabolik aktivite/hücre canlılığı cevabı

ORTAMA EKLENEN MADDE	Süre (saat)	$(NO_3+NO_2)/Cc$ (µM/hücre sayısı)	C1q/med/Cc (ng/ml/hücre sayısı)	MTT (%)	Q
Kontrol	24	0,57±0,01	0,0151±0,0006	100±0,92	0,41±0,01
	48	0,68±0,01	0,0175±0,0004	100±2,10	0,39±0,01
Glukoz 150mg/dL	24	1,39±0,02	0,0356±0,0003	114,0±5,40	0,36±0,01
	48	1,32±0,03	0,0370±0,0001	74,8±2,07	0,48±0,01
Glukoz 200mg/dL	24	1,09±0,06	0,0284±0,0005	122,2±6,20	0,34±0,02
	48	1,50±0,04	0,0416±0,0006	47,9±4,09	0,79±0,02
Glukoz 250mg/dL	24	1,11±0,03	0,0298±0,0002	121,5±4,00	0,32±0,01
	48	2,30±0,04	0,0584±0,0002	41,9±3,90	0,95±0,02
150 mg/dL Glukoz +40µU/ml insülin	24	1,01±0,01*	0,0259±0,0002*	86,6±1,68*	0,45±0,003*
	48	0,57±0,03*	0,0142±0,0003*	40,9±1,78*	0,97±0,05*
200 mg/dL Glukoz +40µU/ml insülin	24	0,77±0,04*	0,0183±0,0002*	83,1±0,97*	0,52±0,3*
	48	0,76±0,02*	0,0189±0,0004*	13,5±0,79*	3,05±0,07*
250 mg/dL Glukoz +40µU/ml insülin	24	0,72±0,01*	0,0181±0,0004	86,0±0,90*	0,48±0,01*
	48	0,69±0,03*	0,0168±0,0002*	14,4±0,56*	2,87±0,12*
150 mg/dL Glukoz +30nM KynA	24	0,77±0,02*	0,0196±0,0004*	99,3±0,28*	0,39±0,01
	48	0,53±0,01*	0,0146±0,0001*	94,2±1,71*	0,38±0,01*
200 mg/dL Glukoz +30nM KynA	24	0,66±0,02*	0,0160±0,0001*	91,0±8,90*	0,45±0,01*
	48	0,79±0,04*	0,0211±0,0001*	98,75±3,35*	0,37±0,02*
250 mg/dL Glukoz +30nM KynA	24	0,46±0,003*	0,0122±0,0001*	91,4±1,00*	0,43±0,00*
	48	0,67±0,03*	0,0190±0,0002*	98,9±3,50*	0,36±0,01*
150 mg/dL Glukoz +40µU/ml insülin+30nM KynA	24	0,71±0,01*	0,0181±0,0001*	93,9±3,20*	0,42±0,01
	48	0,71±0,03*	0,0184±0,0002*	99,2±13,50	0,39±0,01*
200 mg/dL Glukoz +40µU/ml insülin+30nM KynA	24	0,88±0,01*	0,0234±0,0005*	99,8±7,60*	0,39±0,01
	48	0,60±0,01*	0,0160±0,0002*	103,7±5,08*	0,36±0,01*
250 mg/dL Glukoz +40µU/ml insülin+30nM KynA	24	0,62±0,02*	0,0164±0,0001*	120,7±15,20	0,31±0,01
	48	0,67±0,02*	0,0179±0,0001*	108,8±0,90*	0,33±0,01*
150 mg/dL Glukoz +25 µM L-NAME	24	0,94±0,01*	0,0144±0,0002*	94,2±5,77*	0,69±0,003*
	48	0,620±0,009*	0,0136±0,0001*	98,4±5,62*	0,51±0,08
200 mg/dL Glukoz +25 µM L-NAME	24	0,80±0,02*	0,0131±0,0002*	92,9±4,61*	0,69±0,02*
	48	0,63±0,03*	0,0158±0,0004*	95,0±4,85*	0,45±0,02*
250 mg/dL Glukoz+25 µM L-NAME	24	0,65±0,07*	0,0112±0,0003*	93,1±3,12*	0,58±0,06*
	48	0,94±0,10*	0,0170±0,0008*	101,8±1,36	0,44±0,04*

Çizelge 4.12. (devam) Kontrol grubu ve 150mg/dL, 200mg/dL ve 250mg/dL glukoz ilave edildikten sonra, 40µU/ml insülin ve 30nM Kyn ile 24 ve 48 saatta C1q, nitrik oksit ve total mitokondrial metabolik aktivite/hücre canlılığı cevabı

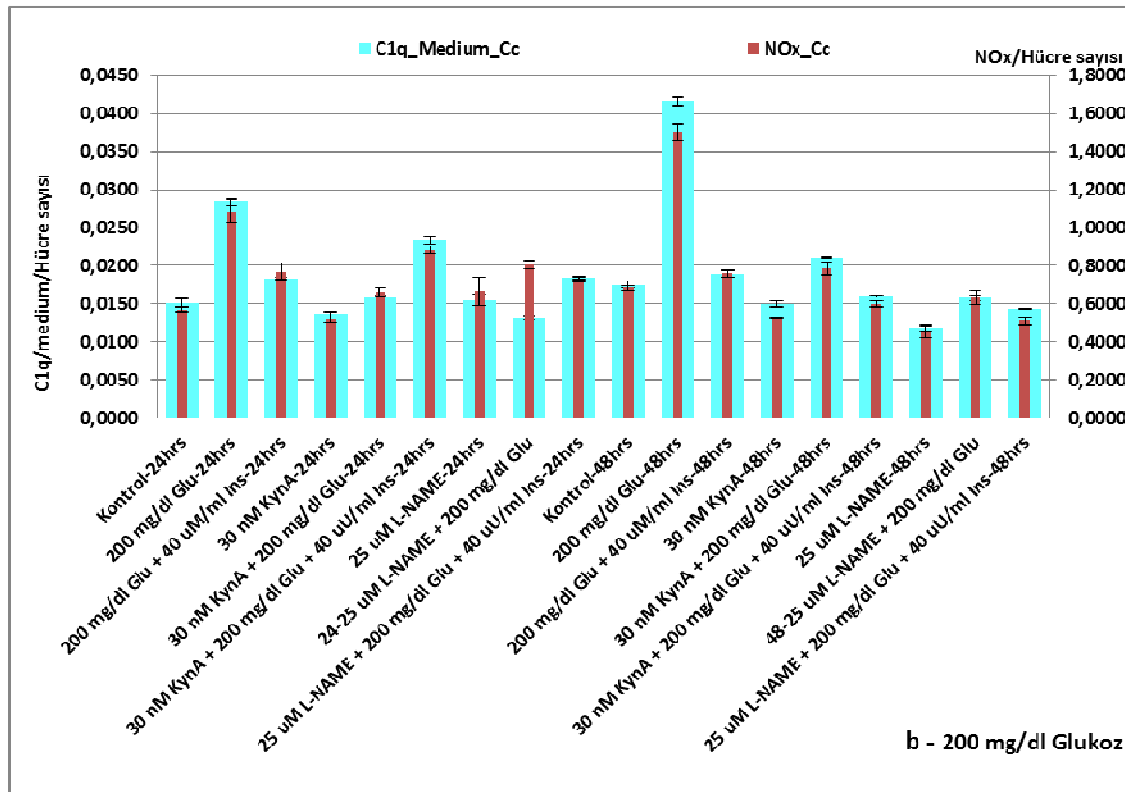
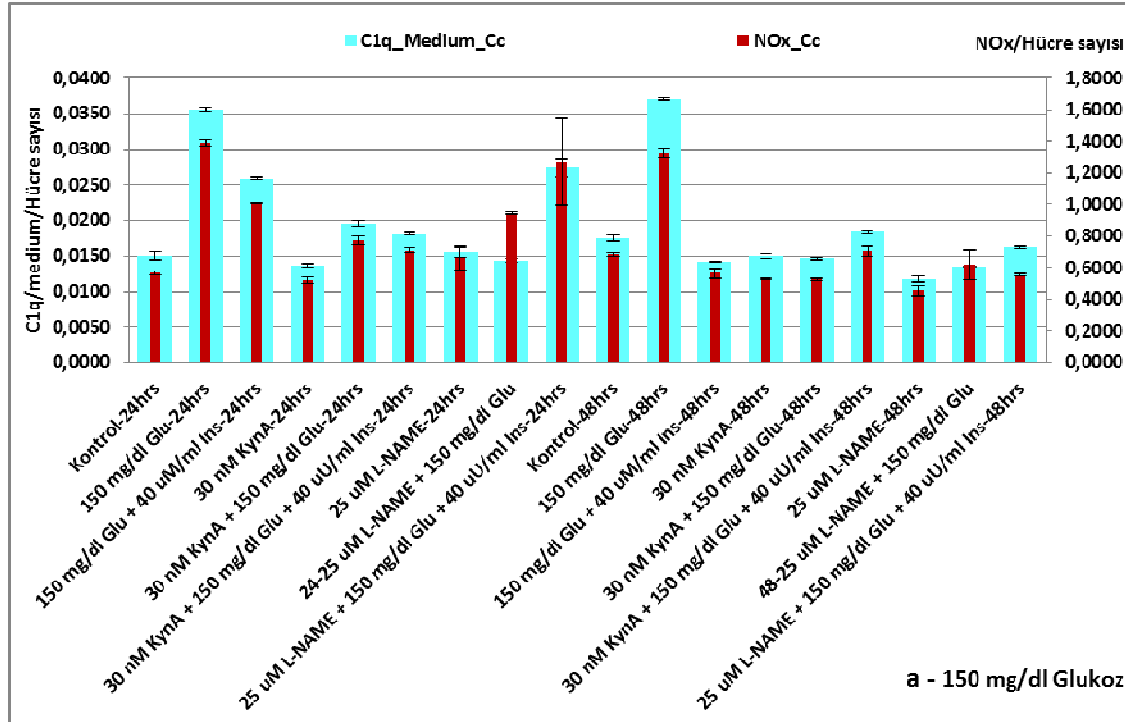
150 mg/dL Glukoz+40µU/ml insülin +25µM L-NAME	24	1.2667±0.27	0,0273±0,0012*	96,3±2,79*	0,51±0,11
	48	0.5533±0.008*	0,0162±0,0002*	97,9±3,47*	0,35±0,003*
200 mg/dL Glukoz+40µU/ml insülin +25µM L-NAME	24	0.7267±0.012*	0,0184±0,0002*	101,1±1,71*	0.40±0.006*
	48	0.5100±0.017*	0,0143±0,0000*	100,3±5,28*	0.35±0.011*
250 mg/dL Glukoz+40µU/ml insülin +25µM L-NAME	24	1.14±0.026	0,0294±0,0001	97,9±4,57*	0.40±0.01*
	48	0.5167±0.04*	0,0124±0,0000*	99,7±4,27*	0.42±0.03*

*p<0,05; 150 – 200 – 250 mg/dL glukoz – glukoz + (insülin, KynA veya L-NAME) veya (KynA + insülin veya L-NAME + insülin) ile aynı konsantrasyon ve aynı inkübasyon süresindeki grupların karşılaştırılması (KynA: kinürenik asid, L-NAME: N-nitro-L-arginin metilester, Q: [NO₃+NO₂/Cc]/ (MTT/Cc), oksidatif stresin şiddeti, C1q/med/Cc: ortamda hücre başına düşen C1q miktarı, MTT: Total mitokondrial metabolik aktivite/hücre canlılığı, (NO₃+NO₂)/Cc: ortamda hücre başına düşen nitrat+nitrat miktarı)

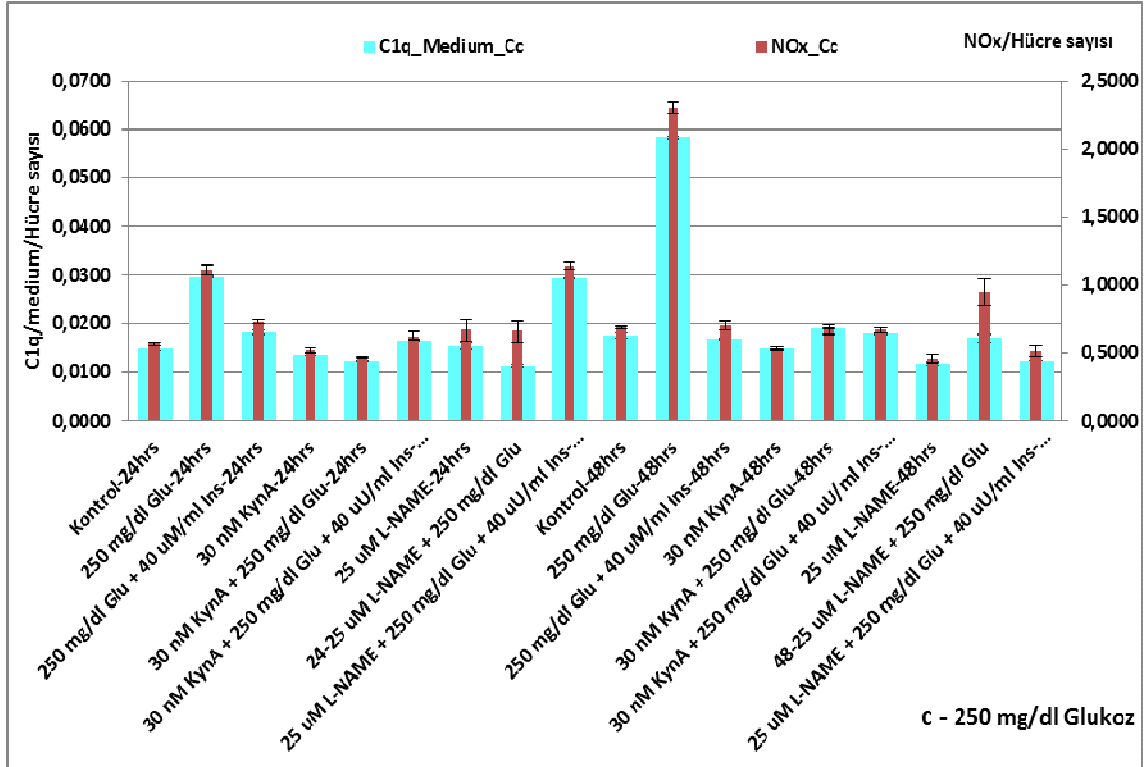
Çizelge 4.13. SH-SY5Y hücre kültürü ortamına 150, 200 ve 250mg/dL yüksek konsantrasyonda glukoz ilavesi ile ilk ve ikinci hücre siklusunda ölçülen ortalama Q, CD59/Cc, C1q/Med/Cc ve NO düzeylerinin kontrollara göre değişimi

Ortama eklenen madde	Süre saat	Q	% artış	CD59/Cc (ng/ml/hücre sayısı)	% artış	C1q/Med/Cc (ng/ml/hücre sayısı)	% artış	(NO ₃ +NO ₂)/Cc (µM/hücre sayısı)	% artış
Kontrol	24	0,41±0,01	(100)	0,0102±0,0013	(100)	0,0151±0,0006	(100)	0,5700±0,01	(100)
	48	0,39±0,01	(100)	0,0166±0,0013	(100)	0,0175±0,0004	(100)	0,6844±0,01	(100)
Glukoz (mg/dL)	24	0,34±0,01*	-17,0	0,0150±0,001*	+47,0	0,0312±0,0003*	+106,6	1,1966±0,04*	+109,9
	48	0,74±0,00*	+89,7	0,0355±0,0008*	+113,8	0,0456±0,0003*	+160,6	1,7066±0,03*	+149,3

*p<0,05; Kontrol ile 150 – 200 – 250 mg/dL ortalama glukoz gruplarında ilk 24 saatta elde edilen değerlerin ikinci 24 saata göre istatistiksel karşılaştırılması (oksidatif stres (Q), kompleman düzenleyici protein (CD59/Cc), kompleman bileşeni (C1q/Med/Cc) ve nitrik oksit (NO; [(NO₃+NO₂)/Cc]))



Şekil 4.17. 150 mg/dl (a) – 200 mg/dl (b) – 250 mg/dl (c) glukoz ve/veya 40 μ U/ml insülin ve/veya 30 nM KynA ve/veya 25 μ M L-NAME ile C1q ve NO değişimleri (Kinürenik asit (KynA), N-nitro-L-arginin metilester (L-NAME), kompleman bileşeni (C1q), nitrik oksit $[(NO_3+NO_2)/Cc]$)



Şekil 4.17. (devam) 150 mg/dl (a) – 200 mg/dl (b) – 250 mg/dl (c) glukoz ve/veya 40 μ U/ml insülin ve/veya 30 nM KynA ve/veya 25 μ M L-NAME ile C1q ve NO değişimleri (Kinürenik asit (KynA), N-nitro-L-arginin metilester (L-NAME), kompleman bileşeni (C1q), nitrik oksit [(NO₃+NO₂)/Cc])

Yüksek glukoz konsantrasyonu ile ikinci 24 saatte oksidatif streste %117,6 artışla total mitokondrial aktivite %53,9 azalmıştır. Hücre canlılığı hem kontrollara göre hem de ilk 24 saata göre de istatistiksel olarak anlamlı biçimde azalmıştır ($p<0,05$). İlk 24 saatte ortalama Q değeri kontrollara göre %17 azalırken C1q'nun %106,6 artması ve daha sonra ikinci 48 saatte oksidatif stresin şiddetinin %117,6'ya yükselmesi ile birlikte C1q'nun ilk 24 saatte göre ikinci 24 saatte %46 kadar artmaya devam etmesi, C1q üretiminin yüksek glukozla bağlı oksidatif stresin başlamasını önceden algılayan bir biyosensör olduğunu düşündürmektedir. Ortama yüksek konsantrasyonda glukoz ilave edildiğinde C1q, NO düzeyinin artması ile birlikte fakat oksidatif stresin şiddetinden bağımsız olarak artar (Bkz Çizelge 4.3., Çizelge 4.12., Çizelge 4.14.).

Çizelge 4.14. SH-SY5Y hücre kültürü ortamında glukoz+insülin, glukoz+ KynA ve glukoz+ L-NAME ilavesi ile ölçülen Q, MTT, C1q ve NO ortalama değerlerinin, ikinci 24 saatta ilk 24 saata göre değişim oranları

Ortama eklenen madde	Süre (saat)	Q % artış	MTT (%)	MTT %artış	C1q/Med/Cc (ng/ml/hücre sayısı)	C1q/ Medium /Cc % artış	(NO ₃ +NO ₂)/ Cc (μM/hücre sayısı)	(NO ₃ +NO ₂) / Cc % artış
Kontrol	24	-4,87	100±0,92	+0.1	0,0151±0,0006	+15,9	0,5700±0,01*	+20,0
	48		100±2,11		0,0175±0,0004		0,6844±0,01	
Glukoz (mg/dL)	24	+117,6	119,16±5,20*	-50.6	0,0312±0,0003*	+46,0	1,196±0,04	+42,6
	48		54,87±3,35		0,0456±0,0003		1,706±0,03	
Glukoz (mg/dL) +40μU insülin	24	+377,0	85,20±1,20*	-73	0,0207±0,0002	-19,8	0,832±0,02	-19,1
	48		22,95±1,04		0,0166±0,0003		0,673±0,03	
Glukoz (mg/dL) +30nM KynA	24	-11,9	93,90±3,39	+3.6	0,0159±0,0002	+14,4	0,630±0,01	+5,23
	48		97,28±2,85		0,0182±0,0008		0,663±0,03	
Glukoz (mg/dL) +25μM L-NAME	24	-27,7	93,39±4,46*	+5.7	0,0129±0,0002	+19,4	0,796±0,04	-8,3
	48		98,73±3,94		0,0154±0,0004		0,730±0,03	
Glukoz (mg/dL) + 30nMKynA + 40μU/ml insülin	24	-2,7	104,80±8,60	-0.8	0,0193±0,0003	-9,84	0,736±0,01	-10,3
	48		103,90±6,49		0,0174±0,0001		0,660±0,02	
Glukoz (mg/dL) + 25μM L-NAME +40μU/ml insülin	24	-13,9	98,40±3,00	+0.9	0,0250±0,0005*	-42,8	1,044±0,10*	-49,6
	48		99,29±4,34		0,0143±0,0001		0,526±0,02	

*p<0,05; 150 – 200 – 250 mg/dL ortalama glukoz – ortalama glukoz + (insülin, KynA veya L-NAME) veya (KynA + insülin veya L-NAME + insülin) gruplarında ilk 24 saatta elde edilen değerlerin ikinci 24 saata göre istatistiksel karşılaştırılması (Kinürenik asit (KynA), N-nitro-L-arginine methylester (L-NAME), oksidatif stres (Q), total mitokondrial metabolik aktivite (MTT), kompleman bileşeni 1q (C1q), nitrik oksit (NO; [(NO₃+NO₂)/Cc]). (-) değerler açık sarı ile işaretlenmiştir)

Ortama sadece glukoz ilavesi ile ilk 24 saatta ölçülen ortalama C1q/Med/Cc=0,0312±0,0003 ng/ml/hücre sayısı ve ortalama [(NO₃+NO₂)/Cc]= 1,1966±0,036 μM/hücre sayısı'dır. Ortama glukoz+KynA ilave edildikten sonra ilk 24 saatta ölçülen ortalama C1q/Med/Cc= 0,0159±0,0002 ng/ml/hücre sayısı ve (NO₃+NO₂)/Cc=0,630±0,014 μM/hücre sayısı düzeyleri yalnızca glukoz içeren ortama göre

istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir ($p<0,05$). İkinci 24 saatte yüksek konsantrasyonda glukoz bulunan ortamda, ortalama $C1q/Med/Cc= 0,0456\pm0,0003$ ng/ml/hücre sayısı, $[(NO_3+NO_2)/Cc]=1,706\pm0,036$ μM /hücre sayısı, glukoz 30nM KynA ilave edildikten sonra ikinci 24 saatte ortalama $C1q/Med/Cc=0,0182\pm0,0001$ ng/ml/hücre sayısı ve $[(NO_3+NO_2)/Cc]=0,663\pm0,026$ μM /hücre sayısı olarak elde edilmiştir ($p<0.05$). Yüksek glukoz bulunan ortama ilave edilen KynA'nın ilk 24 saatte, NMDA reseptör blokajı yapmasına rağmen mitokondrial oksidatif stres %23,5 artmıştır. $[(NO_3+NO_2)/Cc]$ μM /hücre sayısı düzeyleri ise sadece glukoz bulunan ortama göre %47,3 düşmüştür. SH-SY5Y hücre canlılığı oksidatif stresin artması ile birlikte %21,2 azalırken, bu sırada C1q düzeyinde %49 azalma meydana gelmiştir. İkinci 24 saatte sadece yüksek glukoz bulunan ortama göre glukoz+KynA ile $C1q/Med/Cc$ 'de azalma %60 olmuş, $[(NO_3+NO_2)/Cc]$ ise %61,1 azalmıştır (Çizelge 4.15.).

Çizelge 4.15. SH-SY5Y hücre kültürü ortamında glukoz+insülin, glukoz+kinürenik asit KynA ve glukoz+ L-NAME ilavesi ile ölçülen Q ve C1q ortalama değerlerinin, ortamda yüksek konsantrasyonda glukoz bulunduğunda elde edilen ortalama Q(glukoz), ve C1q (glukoz) değerlerine göre değişimi

Ortama eklenen madde	Süre	Q	Q %artış	NO ₃ +NO ₂ /Cc (μM/ hücre sayısı)	NO ₃ +NO ₂ /Cc %artış	C1q/Med/Cc (ng/ml/hücre sayısı)	C1q/Med/Cc %artış	MTT (%)	MTT %artış
Kontrol	24	0,41±0,01	--	0,5700±0,01	--	0,0151±0,0006	--	100±0,92	--
	48	0,39±0,01	--	0,6844±0,01	--	0,0175±0,0004	--	100±2,11	--
Glukoz (mg/dl)	24	0,34±0,01	(100)	1,196±0,04	(100)	0,0312±0,0003	(100)	119,16±5,2	(100)
	48	0,74±0,001	(100)	1,706±0,04	(100)	0,0456±0,0003	(100)	54,87±3,35	(100)
Glukoz (mg/dl) +40μU/ml insülin	24	0,48±0,01*	+41,0	0,832±0,02*	-30,4	0,0207±0,0002*	-33,6	85,20±1,20*	-29,5
	48	2,29±0,08*	+209,0	0,673±0,03*	-60,5	0,0166±0,0003*	-63,6	22,95±1,04*	-58,2
Glukoz (mg/dl) +30nM KynA	24	0,42±0,02*	+23,5	0,630±0,01*	-47,3	0,0159±0,0002*	-49,0	93,90±3,39*	-21,2
	48	0,37±0,01*	-50,0	0,663±0,03*	-61,1	0,0182±0,0008*	-60,0	97,28±2,85*	+77,4
Glukoz (mg/dl)+25μM L-NAME	24	0,65±0,02*	+91,0	0,796±0,03*	-33,4	0,0129±0,0002*	-58,6	93,39±4,46*	-21,6
	48	0,46±0,04*	-37,8	0,730±0,07*	-57,3	0,0154±0,0004*	-66,2	98,73±3,94*	+79,9
Glukoz (mg/dl) +30nM KynA +40μU/ml insülin	24	0,37±0,01	+8,8	0,736±0,01*	-38,5	0,0193±0,0003*	-38,1	104,80±8,6	-12,0
	48	0,36±0,01*	-51,3	0,660±0,02*	-61,3	0,0174±0,0001*	-61,8	103,9±6,49*	+89,3
Glukoz (mg/dl) +25μM L-NAME +40μU/ml insülin	24	0,43±0,04*	+26,4	1,044±0,10	-12,7	0,0250±0,0005	-19,8	98,40±3,00*	-17,4
	48	0,37±0,014*	-50,0	0,526±0,02*	-69,2	0,0143±0,0001*	-68,6	99,29±4,34*	+80,9

*p<0,05; 150 – 200 – 250 mg/dL ortalama glukoz – ortalama glukoz + (insülin, KynA veya L-NAME) veya (KynA + insülin veya L-NAME + insülin) ile aynı inkübasyon süresindeki grupların istatistiksel karşılaştırılması (Süre (saat), Kinürenik asit (KynA), N-nitro-L-arginine methylester (L-NAME), oksidatif stres (Q: [(NO₃+NO₂)/Cc]/ (MTT/Cc), kompleman bileşeni (C1q))

Glukozla ortalama Q değeri ilk 24 saata göre ikinci 24 saatta %117,6 artarken, Glukoz+KynA'le %11,9 azalmıştır. Buna karşılık sadece glukoz bulunan ortamda ortalama C1q/Med/Cc düzeyi %46 artmış, glukoz+KynA bulunan ortamda ise %14,4 artmıştır. Bu sırada [(NO₃+NO₂)/Cc]'daki artma yüksek glukoz bulunan ortamda %42,6, glukoz+KynA

bulunan ortamda %5,23'dür. SH-SY5Y hücrelerinin $[(NO_3+NO_2)/Cc]$ ile ifade edilen bireysel NO üretimlerinin kontrollara göre ve C1q/Cc düzeylerindeki değişikliklerle birlikte değişim göstermesi; $[(NO_3+NO_2)/Cc]$ düzeylerinin C1q ile doğrudan ilişkili olduğunu ve NO konsantrasyonundaki değişiklikleri C1q sentezinin önceden algıladığını ortaya koymaktadır (Çizelge 4.14.).

Bizim çalışmamızda ortama glukoz+KynA ilavesi ile ortaya çıkan C1q-NO ilişkisinin kanıtlanması için ortama yüksek glukoz+25 μ M L-NAME ilave edilerek SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde ikinci 24 saatta C1q, oksidatif stres ve $[(NO_3+NO_2)/Cc]$ düzeyleri incelenmiştir.

Sadece yüksek glukoz bulunan ortamda ikinci 24 saatta ortalama C1q/med/Cc düzeyi= $0,0456\pm0,0003$ ng/ml/hücre sayısı, $Q= 0,74\pm0,016$ ve $[(NO_3+NO_2)/Cc] = 1,706\pm0,036$ μ M/hücre sayısı olmasına karşın, Glukoz+L-NAME bulunan ortamda ikinci 24 saatta ortalama C1q/med/Cc düzeyi= $0,0154\pm0,0004$ ng/ml/hücre sayısı, $Q=0,47\pm0,04$ ve $[(NO_3+NO_2)/Cc] =0,730\pm0,032$ μ M/hücre sayısı olarak ölçülmüştür. İkinci 24 saatta C1q/med/Cc düzeyindeki düşüş oksidatif stresin şiddetinde azalma ile pozitif korelasyon göstermektedir. Yüksek glukoz konsantrasyonuna maruz bulunan SH-SY5Y hücrelerinde L-NAME, ikinci 24 saatta C1q/med/Cc (%66,2 azalma), NO sentezi (%57,3 azalma) ve oksidatif strete (%37,8 azalma) azalmaya sebep olmaktadır. Glukoz+L-NAME bulunan ortamda ise L-NAME'in nNOS'u ikinci 24 saatta inhibe ettiği dikkate alınırsa; ilk 24 saatta $[(NO_3+NO_2)/Cc] =0,796\pm0,03$ μ M/hücre sayısı oksidatif stresin şiddeti $Q=0,65\pm0,027$ ve C1q= $0,0129\pm0,0002$ ng/ml/hücre sayısı olarak bulunmuştur. İkinci 24 saatta ise $[(NO_3+NO_2)/Cc]=0,730\pm0,032$ μ M/hücre sayısı $Q=0,46\pm0,046$ ve C1q= $0,0154\pm0,0004$ ng/ml/hücre sayısı ölçülmüştür. İkinci 24 saatta NO sentezi %8,29 ve oksidatif stres %27,7 azalırken, C1q %19,4 artmıştır. Ortama glukoz+L-NAME ilave edildiğinde C1q düzeyinin oksidatif stres ve NO düzeyi ile ters orantılı olarak arttığı gözlenmiştir (Bkz Çizelge 4.14., Çizelge 4.15.).

İkinci 24 saatta glukoz+insülin'le ortalama C1q/med/Cc düzeyi= $0,0166\pm0,0003$ ve istatistiksel olarak kontrol grubundan farksızdır. Buna karşılık ortalama $Q(\text{Glukoz+insülin})=2,29\pm0,08$ 'dir. Yine ikinci 24 saatta glukoz+insülin+L-NAME ile ortalama

C1q/med/Cc düzeyi= $0,0143 \pm 0,0001$ ng/ml/hücre ve ortalama $Q=0.37 \pm 0.014$ olarak bulunmuştur (Çizelge 4.15.). L-NAME ilavesi ile yüksek glukoz konsantrasyonuna maruz kalan nöronlarda uyarılan nNOS aktivitesi baskılanmış ve C1q düzeyi tüm glukoz konsantrasyonlarında ikinci 24 saatte istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş göstermiştir ($p < 0.05$). Bu düşüş insülin+L-NAME ilavesi ile daha belirgin hale gelmiştir. L-NAME ile oksidatif stres bifazik değişiklik göstererek ikinci 24 saatte düşer. Burada glukoz+40 μ U/ml insülin uyarısı ile ikinci 24 saatte artan oksidatif stres, L-NAME ile nNOS aktivitesinin %69,2 baskılanması sonucu %83,8 azalmıştır (Çizelge 4.14.). NO düzeyindeki düşüş C1q düzeyine aynen yansımış ve yüksek glukoz bulunan ortama göre glukoz+insülin+L-NAME ile C1q düzeyinde %68,6 azalma gözlenmiştir. KynA ile NMDA reseptör blokajı eşzamanlı NO ve C1q azalması ile sonuçlanmaktadır. Ortamda insülin bulunması ve %209 oksidatif stres artışı, C1q'nun ilk 24 saatte %33,6 azalmasına, ikinci hücre siklusunda ise %63,6 düşmesine sebep olmaktadır. Eş zamanlı NO azalması %30,4 ve %60,5'tir (Bkz Çizelge 4.15.). Yüksek konsantrasyonda glukoz ve 40 μ U/ml insülinle C1q ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler, şiddetli oksidatif stres ve insülin direnci ile açıklanmaktadır (Hillian ve diğerleri, 2013). İnsülin direncinin gelişmesi ile birlikte oksidatif stres ikinci 24 saatte ilk 24 saata nazaran %377 artarken NO'de %19,1, C1q'da %19,8 azalma ile birlikte total mitokondrial metabolik aktivite-hücre canlılığı %73,06 azalmıştır. Glukoz+insülin bulunan ortamda KynA ile ikinci 24 saatte NO, C1q ve MTT kontrol değerlerine yaklaşıırken, L-NAME etkisi ile NO, C1q düzeyi ve oksidatif stres istatistiksel olarak önemli oranda azalır ($p < 0,05$) (Bkz Çizelge 4.14., Çizelge 4.15.).

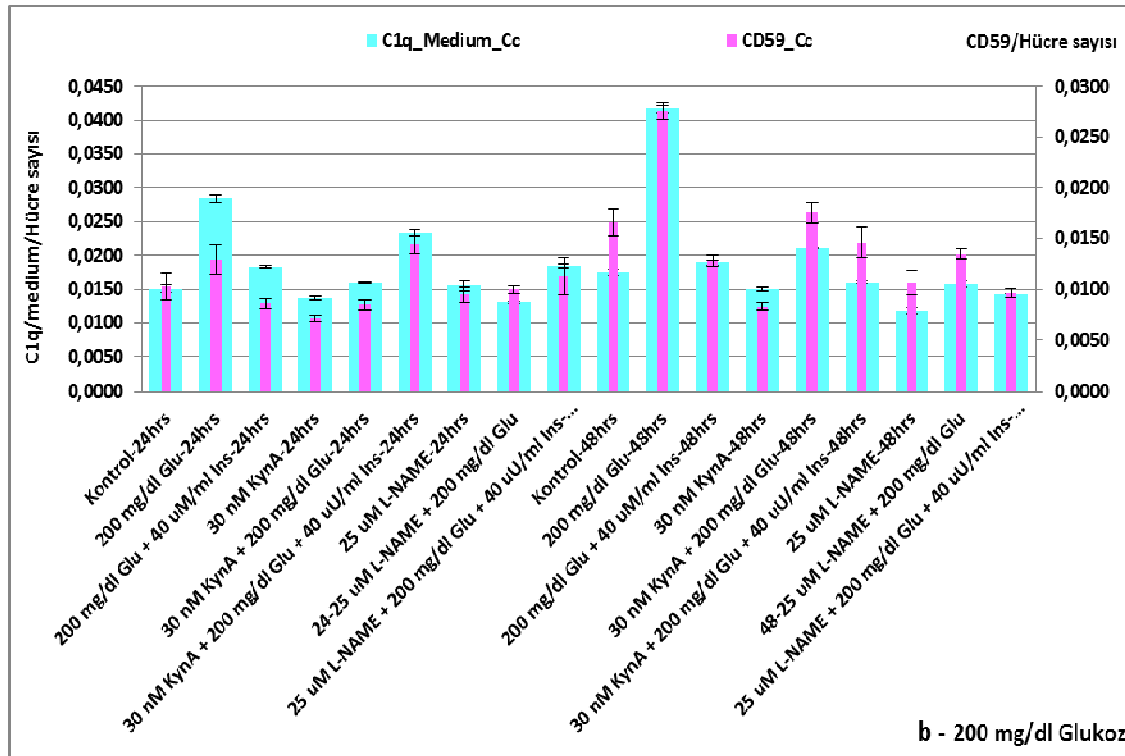
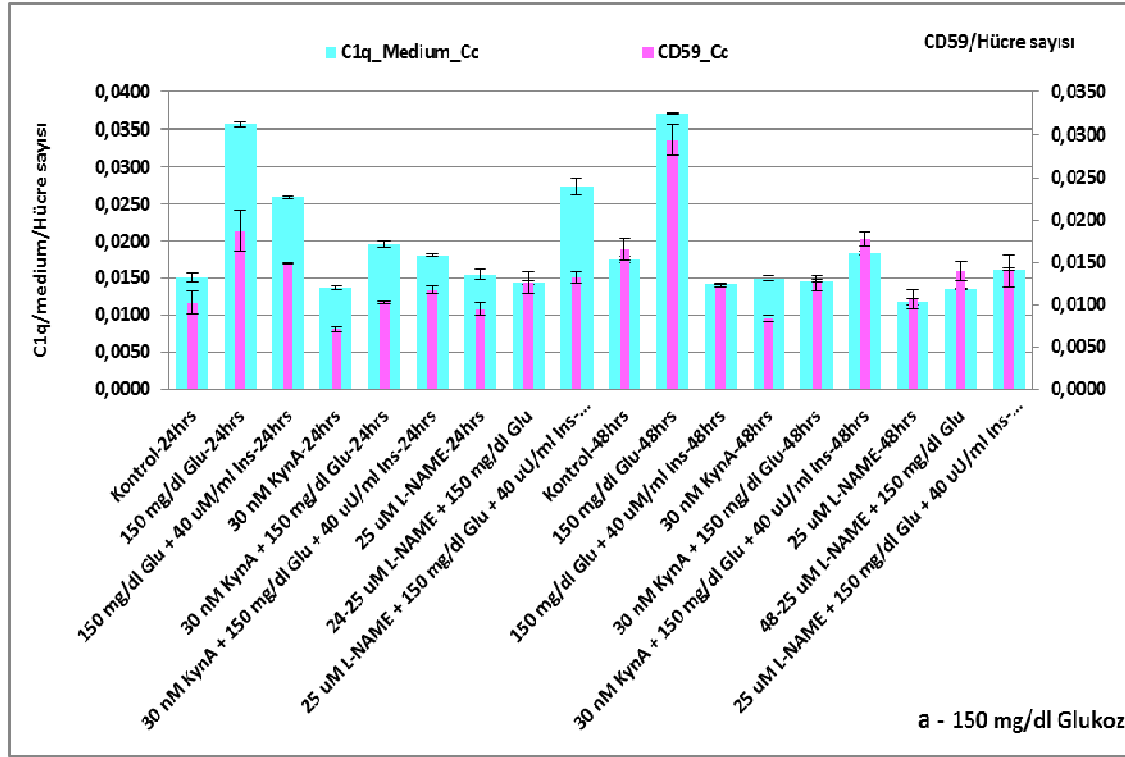
4.2.5. Yüksek glukoz uyarısı ve kompleman düzenleyici protein 59

Bizim çalışmamızda, kontrol, yüksek glukoz, yüksek glukoz+insülin, yüksek glukoz+KynA, yüksek glukoz+insülin+KynA ve yüksek glukoz+L-NAME bulunan SH-SY5Y hücrelerinde CD59/Cc sentezi ikinci 24 saatte ilk 24 saata oranla artmıştır. Ortama yalnızca yüksek glukoz+insülin+L-NAME ilave edildiğinde SH-SY5Y hücrelerinin CD59 düzeyi %29,5 oranında azalmıştır (Bkz Çizelge 4.16.). Ortama glukoz+insülin ilave edildiğine oksidatif stresin aşırı yükselmesi pek muhtemelen ortamdaki CD59 ve C1q'nun okside olmasına ve total mitokondrial metabolik aktivite/hücre canlılığının %73,06 azalmasına sebep olmaktadır.

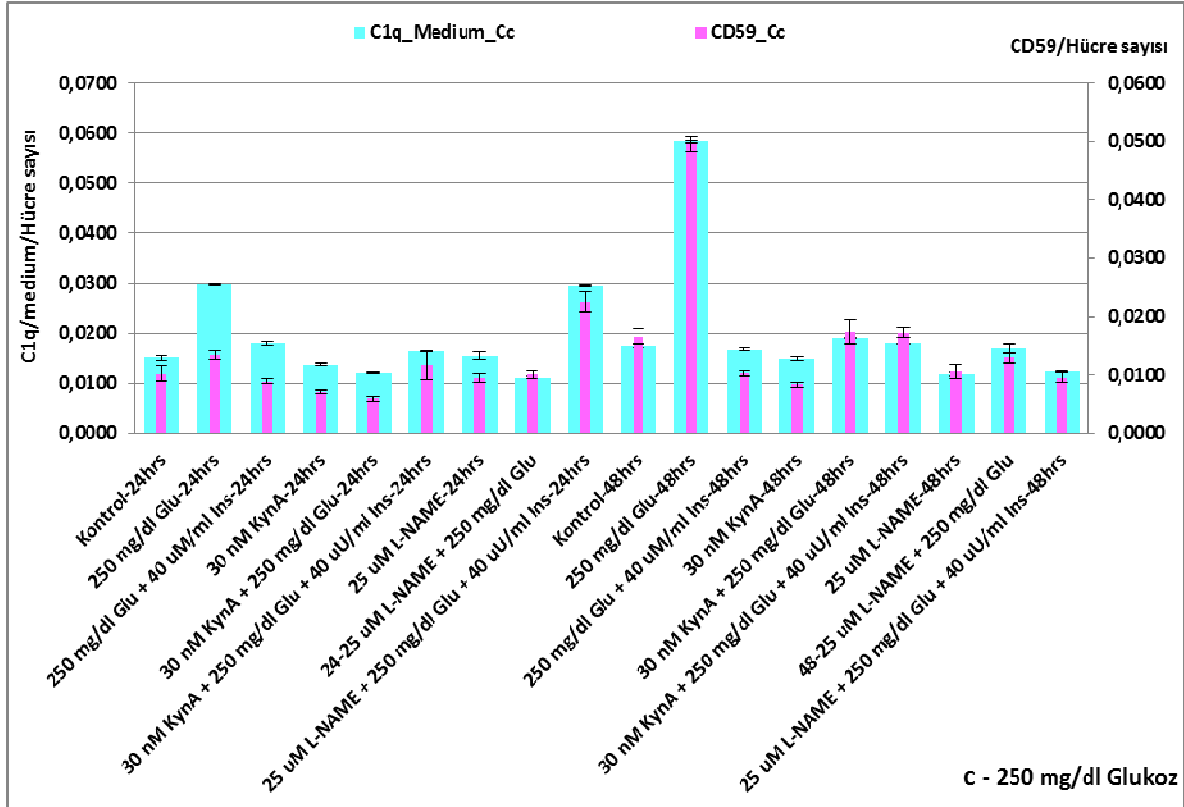
Çizelge 4.16. SH-SY5Y hücre kültürü ortamında glukoz+insülin, glukoz+ KynA ve glukoz+L-NAME ilavesi ile ölçülen Q, CD59, C1q ve NO ortalama değerlerinin, ikinci 24 saatta ilk 24 saata göre değişim oranları

Ortama eklenen madde	Süre	Q	Q % artış	CD59/Cc (ng/ml/hücre sayısı)	CD59/ Cc % artış	C1q/Med/Cc (ng/ml/hücre sayısı)	C1q/ Med/ Cc % artış	(NO ₃ +NO ₂)/ Cc (μM/hücre sayısı)	(NO ₃ + NO ₂)/ Cc % artış
Kontrol	24	0,41±0,01*	-4,87	0,0102±0,0013*	+62,7	0,0151±0,0006	+15,9	0,570±0,1	+20,0
	48	0,39±0,01		0,0166±0,0013		0,0175±0,0004		0,684±0,01	
Glukoz (mg/dL)	24	0,34±0,01*	+117,6	0,0150±0,001*	+136,6	0,0312±0,0003*	+46,0	1,196±0,04	+42,6
	48	0,74±0,001		0,0355±0,0008		0,0456±0,0003		1,706±0,03	
Glukoz (mg/dL)+ 40μU/ml insülin	24	0,48±0,01*	+377,0	0,0108±0,0003	+8,3	0,0207±0,0002	-19,8	0,832±0,02	-19,1
	48	2,29±0,08		0,0117±0,0004		0,0166±0,0003		0,673±0,03	
Glukoz (mg/dL) + 30nM KynA	24	0,42±0,02*	-11,9	0,0082±0,0003*	+92,7	0,0159±0,0002	+14,4	0,630±0,01	+5,23
	48	0,37±0,01		0,0158±0,0013		0,0182±0,0008		0,663±0,03	
Glukoz (mg/dL)+ 25μM L-NAME	24	0,65±0,02*	-27,7	0,0109±0,0007*	+22,9	0,0129±0,0002	+19,4	0,796±0,04	-8,3
	48	0,47±0,04		0,0134±0,0008		0,0154±0,0004		0,730±0,03	
Glukoz (mg/dL) + 30nM KynA + 40μU/ml insülin	24	0,37±0,008	-2,70	0,0125±0,0012	+32,0	0,0193±0,0003	-9,84	0,736±0,01	-10,3
	48	0,36±0,01		0,0165±0,0010		0,0174±0,0001		0,660±0,02	
Glukoz (mg/dL) + 25μM L-NAME+ 40μU/ml insülin	24	0,43±0,04*	-13,9	0,0156±0,0013*	-29,5	0,0250±0,0005*	-42,8	1,044±0,10 *	-49,6
	48	0,37±0,014		0,0110±0,0010		0,0143±0,0001		0,526±0,02	

*p<0,05; 150 – 200 – 250 mg/dL ortalama glukoz – ortalama glukoz + (insülin, KynA veya L-NAME) veya (KynA + insülin veya L-NAME + insülin) gruplarında ilk 24 saatta elde edilen değerlerin ikinci 24 saata göre istatistiksel karşılaştırılması (Süre (saat), Kinürenik asit (KynA), N-nitro-L-arginin metilester (L-NAME), oksidatif stresin şiddeti (Q), kompleman düzenleyici protein (CD59), kompleman beileşeni (C1q), nitrik oksit (NO; [(NO₃+NO₂)/Cc]), (-) değerler açık sarı ile işaretlenmiştir)



Şekil 4.18. 150 mg/dl (a) – 200 mg/dl (b) – 250 mg/dl (c) glukoz ve/veya 40 μ U/ml insülin ve/veya 30 nM KynA ve/veya 25 μ M L-NAME ile C1q ve CD59 değişimleri (Kinürenik asit (KynA), N-nitro-L-arginin metilester (L-NAME), kompleman bileşeni (C1q), kompleman düzenleyici protein (CD59))



Şekil 4.18. (devam) 150 mg/dl (a) – 200 mg/dl (b) – 250 mg/dl (c) glukoz ve/veya 40 µU/ml insülin ve/veya 30 nM KynA ve/veya 25 µM L-NAME ile C1q ve CD59 değişimleri (Kinürenik asit (KynA), N-nitro-L-arginin metilester (L-NAME), kompleman bileşeni (C1q), kompleman düzenleyici protein (CD59))

NMDA reseptör blokajı olduğunda oksidatif stresin azalması CD59/Cc düzeyini %92,7 artırmaktadır. Gerek C1q gerekse CD59 değerleri metabolik aktiviteden etkilenen net sonuçları yansıtmaktadır. SH-SY5Y dopaminerjik hücrelerinin yüksek glukoz konsantrasyonu karşısında ürettikleri oksidatif stresle protein glikasyonu C1q/Med/Cc ve CD59/Cc sonuçlarını ciddi biçimde etkilediğinden ölçtüğümüz düzeyler oksidatif stresle ilişkili gözükmemektedir (Bkz Çizelge 4.11., Çizelge 4.16.). Ortama yüksek glukoz+insülin+L-NAME ilave edildiğinde oksidatif stres, glukoz+insüline maruz kalan nöronlara nazaran ikinci 24 saatta %83,8 azalmıştır. Oksidatif stresin azalması ile CD59 %29,5, C1q ise %42,8 azalmıştır.

Bizim çalışmamızda yüksek glukozu maruz kalan SH-SY5Y hücreleri tarafından ilk 24 saatta ortalama CD59 düzeyi $0,0150 \pm 0,001$ ng/ml/hücre sayısı, $Q(\text{glukoz}) = 0,34 \pm 0,01$ ve hücre canlılığı %119,16'dır. İkinci 24 saatta CD59 $0,0355 \pm 0,0014$ ng/ml/hücre sayısı olup kontrollara göre %113,8, ilk 24 saata göre ise %136,6 artmış ve $Q(\text{glukoz}) = 0,74 \pm 0,016$ 'ye

yükselirken, hücre canlılığı ise ortalama $54,87 \pm 3,35$ 'e düşmüştür. Ortamda 150 mg/dl, 200 mg/dl ve 250 mg/dl glukoz varlığında CD59 ve Q değerleri, ilk 24 saatteki değerlere nazaran istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterirken ($p < 0,05$), MTT anlamlı bir düşüş göstermiştir ($p < 0,05$). C1q değeri ise %46 artmıştır ($p < 0,05$) (Bkz Çizelge 4.15., Çizelge 4.16.).

Ortama glukoz+insülin ilave edildiğinde ilk 24 saatte ortalama $MTT = 85,2 \pm 1,18$, Q (Glukoz+insülin) $= 0,48 \pm 0,01$, CD59 ise $0,0108 \pm 0,0003$ ng/ml/hücre sayısı'dır. İkinci 24 saatte oksidatif stresin şiddeti 5 kat artmış ($p < 0,05$), buna karşılık MTT 3,7 kat azalmıştır ($p < 0,05$). CD59 $= 0,0118 \pm 0,0004$ 'e yükselmiştir. Bu yükselme, 200 mg/dl ve 250 mg/dl glukoz konsantrasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı gözükmemektedir.

Ortama NMDA reseptörü-GluN2B antagonisti olan KynA ilave edildiğinde; ilk 24 saatte ortalama $MTT = 93,9 \pm 3,39$, Q(glukoz+KynA) $= 0,42 \pm 0,02$, C1q $= 0,0159 \pm 0,0002$ ng/ml/hücre sayısı, CD59 ise $0,0082 \pm 0,0003$ ng/ml/hücre sayısı olarak elde edilmiştir. İkinci 24 saatte $MTT = 97,28 \pm 2,85$ 'e yükselirken, oksidatif stresin şiddeti %11,9 azalmış, buna karşılık CD59 %92,7, C1q ise %14,46 artmıştır. Ortamda sadece glukoz bulunması halindeki oksidatif strese nazaran 30nM KynA ile ikinci 24 saatte elde edilen Q değeri %50 azalmış, CD59 değeri %55,5, C1q değeri ise %60 azalmıştır. Buna karşılık 30nM KynA ile hücre canlılığında artma ortalama %77,3'dür. KynA ile NMDA reseptör blokajı sonucunda oksidatif streste ikinci 24 saatte meydana gelen %50 azalma C1q'da daha fazla olmak üzere hem C1q hem de CD59'da azalma meydana getirmektedir (Bkz Çizelge 4.15., Çizelge 4.16.).

SH-SY5Y dopaminerjik hücreler yüksek glukoz konsantrasyonuna maruz kaldıklarında ikinci 24 saatte $54,87 \pm 3,35$ olan hücre canlılığı hem NMDA reseptör blokajı hem de nNOS inhibisyonu ile etkin biçimde artmaktadır (Glukoz+KynA: $97 \pm 2,85$, Glukoz+L-NAME: $98,37 \pm 3,9$). KynA ile oksidatif stresin şiddeti yalnız glukoz içeren ortama nazaran %50 azalırken, L-NAME oksidatif stresin şiddetini %37,8 azaltmaktadır. L-NAME ile nNOS inhibisyonu sonucu Q değerinin %37,8 azalması, CD59'un %62,2 azalmasına, C1q'nun ise %66,2 azalmasına yol açmaktadır. Reaktif nitrojen/oksijen radikallerinin meydana getirdiği oksidatif stres, hem NMDA reseptörünün blokajı hem de nNOS'un L-NAME ile inhibisyonu

ile azaltılmakta ve sonuçta hem klasik kompleman yolağı inhibe edilmekte hem de ikinci hücre siklusunda total mitokondrial metabolik aktivite artmaktadır. Ancak yüksek glukoz konsantrasyonuna maruz kalan SH-SY5Y hücreleri, ortama KynA ilave edildiğinde oksidatif stresin baskılanması ilk 24 saatta başlamakta ve C1q düzeyinin azalması ilk 24 saatta %49, ikinci 24 saatta %60 olmaktadır. L-NAME etkisi ikinci 24 saatta ortaya çıktığından, ilk 24 saatta oksidatif stres %91 artmakta ve C1q azalması ise ikinci 24 saatta en fazla %66,2 olmaktadır. Ayrıca 30nM KynA, yüksek glukoz konsantrasyonuna maruz kalan nöronlarda meydana gelen insülin direncininin aşılmasında total mitokondrial metabolik aktivitenin artırılmasında daha başarılı gözükmemektedir (Bkz Çizelge 4.17.).

Çizelge 4.17. SH-SY5Y hücre kültürü ortamında glukoz+insülin, glukoz+ KynA ve glukoz+ L-NAME ilavesi ile ölçülen Q, CD59 ve C1q ortalama değerlerinin, ortamda yüksek konsantrasyonda glukoz bulunduğunda elde edilen ortalama Q(glukoz), CD59(glukoz) ve C1q(glukoz) değerlerine göre değişimi

Ortama eklenen madde	Süre	Q	Q %artış	CD59/Cc (ng/ml/hücre sayısı)	CD59/ Cc % artış	C1q/Med/Cc (ng/ml/hücre sayısı)	C1q/M ed/ Cc % artış	MTT (%)	MTT % artış
Kontrol	24	0,41±0,01	--	0,0102±0,0013	--	0,0151±0,0006	--	100±0,92	--
	48	0,39±0,01	--	0,0166±0,0013	--	0,0175±0,0004	--	100±2,11	--
Glukoz (mg/dl)	24	0,34±0,01	(100)	0,0150±0,001	(100)	0,0312±0,0003	(100)	119,16±5,2	(100)
	48	0,74±0,001	(100)	0,0355±0,0008	(100)	0,0456±0,0003	(100)	54,87±3,35	(100)
Glukoz (mg/dl) + 40µU/ml insülin	24	0,48±0,01*	+41,0	0,0108±0,0003	-28,0	0,0207±0,0002*	-33,6	85,20±1,20*	-29,5
	48	2,29±0,08*	+209,0	0,0117±0,0004*	-67,0	0,0166±0,0003*	-63,6	22,95±1,04*	-58,2
Glukoz (mg/dl) +30nM KynA	24	0,42±0,02*	+23,5	0,0082±0,0003*	-45,3	0,0159±0,0002*	-49,0	93,90±3,39*	-21,2
	48	0,37±0,01*	-50,0	0,0158±0,0013*	-55,5	0,0182±0,0008*	-60,0	97,28±2,85*	+77,4
Glukoz (mg/dl) +25µM L-NAME	24	0,65±0,02*	+91,0	0,0109±0,0007*	-27,3	0,0129±0,0002*	-58,6	93,39±4,46*	-21,6
	48	0,46±0,04*	-37,8	0,0134±0,0008*	-62,2	0,0154±0,0004*	-66,2	98,73±3,94*	+79,9
Glukoz (mg/dl) +30nM KynA+ 40µU/ml insülin	24	0,37±0,01	+8,8	0,0125±0,0012	-16,6	0,0193±0,0003*	-38,1	104,80±8,6	-12,0
	48	0,36±0,01*	-51,3	0,0165±0,0010*	-53,5	0,0174±0,0001*	-61,8	103,9±6,49*	+89,3
Glukoz (mg/dl) +25µM L-NAME+ 40µU/ml insülin	24	0,43±0,04*	+26,4	0,0156±0,0013	+4,0	0,0250±0,0005	-19,8	98,40±3,00*	-17,4
	48	0,37±0,01*	-50,0	0,0110±0,0010*	-69,0	0,0143±0,0001*	-68,6	99,29±4,34*	+80,9

*p<0,05; 150 – 200 – 250 mg/dL ortalama glukoz – ortalama glukoz + (insülin, KynA veya L-NAME) veya (KynA + insülin veya L-NAME + insülin) ile aynı inkübasyon süresindeki grupların istatistiksel karşılaştırılması (Süre (saat), Kinürenik asit (KynA), N-nitro-L-arginin metilester (L-NAME), oksidatif stres şiddeti (Q), kompleman düzenleyici protein (CD59), kompleman bileşeni (C1q))

5. TARTIŞMA

Yüksek glukoz konsantrasyonu ile meydana gelen hücrel stresin patogeneğinde aşırı mitokondrial serbest radikal oluşumu son derece önemli rol oynamaktadır (Cao ve diğeri, 2012). Rotterdam ve Hisayama çalışması gibi birçok çalışma, demans grubundaki nörodejeneratif hastalık riskinin, yüksek glukoz maruziyet sonucu meydana gelen mitokondrial oksidatif strese bağlı nöron hasarı ile arttığını göstermiştir (Ott ve diğeri, 1999; Kopf ve Frölich, 2009; Williams, WM, Weinberg ve Smith, 2011).

“The American Diabetes Association (ADA)” tarafından önerilen güncel tanı kriterleri arasında belirtilen klasik hiperglisemi tanımı plazma glukoz düzeyinin 200 mg/dl (11,1 mM) den yüksek olması, açlık plazma glukoz düzeyinin 126 mg/dl (7,0 mM) den yüksek ve oral glukoz tolerans testi esnasında ikinci saattaki plazma glukoz düzeyinin ise 200 mg/dl (11,1 mM)’den yüksek olmasıdır (Alqahtani, Khan, Alhumaidi ve Ahmed, 2013). Normoglisemik koşullarda sıçanlarda plazma glukozu $7,6 \pm 0,3$ mM iken beyin glukoz konsantrasyonu $2,4 \pm 0,13$ mM, hiperglisemik koşullarda ise plazma glukozu $15,2 \pm 2,4$ mM, beyin glukoz konsantrasyonu $4,5 \pm 0,35$ mM’dır (Silver ve Erecinska, 1994). İnsanda $5,64 \pm 0,39$ mM olan plazma glukozu $11,5 \pm 1,27$ mM’a yükselerek %209 artış gösterdiğinde, beyin diyalizatında glukoz artışı %190 olmaktadır (Abi-Saab ve diğeri, 2002). Hiperglisemiye bağlı doku hasarına sebep olan dört ana mekanizma ileri sürülmektedir. Bunlar DAG aracılığı ile protein kinase C (PKC) izoformlarının aktivasyonu, AGE oluşumu, heksozamin yolağının hızlanması ve poliol yolağının hızlanmasıdır. Yüksek glukoz maruziyetin farklı aşamalarında aktive olan bu mekanizmalarla yüksek glukoz bağlı doku hasarı arasındaki ilişki, mitokondrial ROS üretimindeki artmadır. ROS üretimindeki bu artma “glukoz toksisitesi” olarak tanımlanmaktadır (Rolo ve Palmeira, 2006). Ancak incelenen kaynaklarda; ADA tarafından hiperglisemi için ileri sürülen güncel tanı kriterlerine uygun glukoz konsantrasyonlarında glukoz maruz kalan dopaminerjik hücrelerin davranışı konusunda bir bilgiye rastlanamamıştır.

İnsan kaynaklı nöroblastoma hücreleri dopaminerjik özellikleri ve NMDA reseptör ekspresyon kapasiteleri bakımından normal nöronlara benzediğinden (Kulikov, Rzhahinova, Goldshtein ve Boldyrev, 2007) ve *in vitro* nöron çalışmalarında yaygın biçimde kullanıldığından (Xie, Hu ve Li, 2010) bizim çalışmamızda da SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattı kullanılmıştır. Birçok çalışmada insan SH-SY5Y nöroblastoma hücre kültürleri için fizyolojik glukoz düzeyi olarak kabul edilen 25mM’da bazal düzeyde ölçülen AMPK, glukozun bu düzeyin altına inmesi ile artmaya başladığı, yani hücrelerin düşük glukozla canlılıklarını sürdürülebilmeleri için AMPK fosforilasyonunun arttığı ileri sürülmüştür (Lee, Li, Xi, Suh ve Martin, 2005). Bundan dolayı SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre kültürlerinde yapılan çalışmalarda ADA kriterleri dikkate alınmadan 25mM’ın üstü yüksek, altı ise düşük glukoz konsantrasyonu olarak kullanılmıştır (Dodson ve diğerleri, 2013; Li ve diğerleri, 2013). Ancak insanlarda görülen diyabet gibi metabolik hastalıklarda 25mM glukoz konsantrasyonuna ulaşılması sık görülmemektedir. Ortalama plazma glukoz düzeyinin, 9 mM’in üzerinde her 1 mM artışı için ölüm riski %10 artmaktadır (tehlike oranı (“hazard ratio” HR)1,10; 95% güvenlik sınırı (“confidence interval” CI) 1,07–1,13). Bu risk 9,8 mM’in üzerinde %16,8 olarak hesaplanmıştır. Evvelce diyabet olduğu bilinen hastaların %33,8’inde ortalama glukoz konsantrasyonu 11,7mM (10-14,8 mM)’dır (Lipton ve diğerleri, 2013). Kan glukoz konsantrasyonu 11,1 mM’in üzerinde bulunan diyabetik ve acil cerrahi girişim yapılan hastalarda post-operatif ilk 30 gün içinde mortalite %24,1, kardiyak sorunu olanlarda ise %13,7 bulunmuştur. Kaplan-Meier sağkalım eğrisi 11,1mM glukoz konsantrasyonunun kritik bir sınır olduğunu ortaya koymuştur. (Ma ve diğerleri, 2015).

Bizim çalışmamızda ADA ve IDF kriterleri dikkate alınarak insan nöroblastoma SH-SY5Y hücre hattı 150 mg/dL (8,3mM), 200 mg/dL (11,1 mM) ve 250 mg/dL (13,9 mM) glukozu maruz bırakılmış ve hücre canlılığını gösteren total metabolik aktivitenin özellikle ikinci 24 saatte artan glukoz konsantrasyonu ile orantılı olarak %41,93’e kadar düştüğü görülmüştür. Yüksek glukoz konsantrasyonu ile meydana gelen hücresel stresin patogenezinde aşırı mitokondrial serbest radikal oluşumu ve buna bağlı p38 MAPK aktivasyonunun önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir (Cao ve diğerleri, 2012). Total metabolik aktivite/hücre canlılığını gösteren MTT yönteminde, tetrazolium boya redüksiyonu sitozolik kompartmanda yer alan NADPH-bağımlı oksido-redüktazlar ile

meydana gelir. Bundan dolayı hücre canlılık oranları $[NADPH^+-NADP^+]$ - $[GSSG-GSH]$ 'ye bağlı hücresel metabolik aktiviteyi gösterir ve hücre membranlarında redoks kapasitesini kontrol eden bir yöntemdir (Berridge, Herst ve Tan, 2005; Berridge ve Tan, 1993). Memeli hücreleri oksidatif stresle karşı karşıya olduğundan sitozolik NADH'den diğer elektron alan moleküllere elektron geçişi, hücresel redoks kontrolünü sağlar (Berridge ve Tan, 2000). Ortamdaki canlı hücrelerin hücre başına ürettikleri redoks-aktif moleküllerin düzeyi, oksidatif stresin kontrolü ve hücre canlılığının bir ölçüsüdür. Russo ve diğerlerinin (2012) çalışmasında, SH-SY5Y hücreleri sabit yüksek glukoz konsantrasyonuna maruz bırakıldığında MTT ile ifade edilen hücre mitokondrial aktivitesinin önce orta derecede azaldığı, ikinci 24 saatta ise belirgin biçimde azaldığı gösterilmiştir (Russo, Higgins, Werther ve Cameron, 2012).

Glikolitik aktivitenin sadece glikoliz yönünde uyarılmasının nöronlar için sitotoksik olduğu bilinmektedir (Almeida, Almeida, Bolanos ve Moncada, 2001). Fizyolojik koşullarda mevcut glikozun %80-90'ı glikolitik yolda metabolize edilirken, %10-20'si anti-oksidan kapasiteyi destekleyen PPP'nda kullanılır (Abdul-Ghani ve DeFronzo, 2010; Wamelink, Struys ve Jakobs, 2008). Ancak, yüksek glukoz konsantrasyonlarında daha fazla glukoz, glikolitik yolağa girer, daha fazla piruvat, asetil-koenzimA (asetil-CoA) ve "redükte NADH", NADH üretilir. NADH bir elektron taşıyıcısıdır. Yüksek glukoz varlığında NADH'in aşırı artışı, mitokondrial elektron transport zincirinde "mitokondrial kompleks-1; NADH-ubiquinone oxidoreductase"dan elektron kaçışına yol açar ve serbest radikal üretimi başlar (Thomas, Keeney ve Bennett, 2012; Keeney, Xie, Capaldi ve Bennett, 2006). Oksidatif strese bağlı olarak GSH ve mitokondrial kompleks-1'in aktivitesinde azalma mitokondrial disfonksiyona sebep olur. (Bharath ve Andersen, 2005). Bizim çalışmamızda glukoz maruziyetle ilk 24 saatta yüksek glukozla nöronda NMDA reseptör uyarısı sonucu meydana gelen ve oksidatif stresin temel sebebi olan NO ile hücre canlılığı değerleri karşılaştırıldığında bazı $[(NO_3+NO_2)]/Cc$ sonuçları çelişkili gözükmemektedir. Ancak, yüksek glukoz maruziyetinin $[(NADPH^+-NADP^+)-(GSSG-GSH)]$ sisteminde meydana getirdiği oksidatif stresin şiddeti $Q=[(NO_3+NO_2)]/Cc-MTT/Cc$ oranı ile yani ortamda hücre başına üretilen NO'nin hücre başına düşen metabolik aktivitede payı hesaplandığında, hücre canlılığının tüm glukoz konsantrasyonlarında oksidatif stresle istatistiksel bakımdan anlamlı negatif korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir. Yüksek glukoz maruz kalan her

hücrenin glikolitik yolaktaki metabolik aktivitesi kadar serbest radikal meydana gelmekte ve bununla orantılı bir antioksidan kapasite kaybedilmektedir. $Q = [(NO_3 + NO_2) / Cc - MTT / Cc]$ oranı ile ortaya çıkan oksidatif stres şiddetinin, hücre yaşamını belirleyici bir faktör olduğu görülmektedir. Bizim çalışmamızda hücre canlılığında azalma, oksidatif stresin şiddeti ve mitokondrial fonksiyon kaybında artma ile birlikte.

Elde ettiğimiz sonuçlar, SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde yüksek konsantrasyonda glukoz ile sürekli NMDA reseptör uyarısı sonucu meydana gelen cevabın uyarı süresi ile doğru orantılı ve bifazik olduğunu, oksidatif stresin şiddeti ile total mitokondrial metabolik aktivitenin ise ters orantılı olduğunu göstermektedir. Glukoz uyarısını izleyen ilk 24 saat içinde SH-SY5Y hücrelerinin antioksidan kapasitesi %109,9 artan NO kaynaklı serbest radikalleri karşılayarak oksidatif stresi %17 düşürür. İkinci 24 saatte yüksek glukoz uyarısının devam etmesi ile bunu karşılaması gereken antioksidan kapasitenin yeteri kadar rejenere edilememesi, NO'de %149,3 artış, oksidatif strese ise %89,7 artışla sonuçlanır. İlk 24 saatte oksidatif stresin düşmesi ile kontrollara göre %19,3 artan total mitokondrial metabolik aktivite/hücre canlılığı ikinci 24 saatte oksidatif stresin %89,7 şiddetlenmesi ile ilk 24 saata göre %53,95 düşer. Nöronlarda yüksek glukoz konsantrasyonunun mitokondrial membran depolarizasyonu, ROS'nin birikmesi, GSH düzeyinin azalması ve apoptoza sebep olduğu gösterilmiştir (Berent-Spillsen ve Russell, 2007).

Bizim çalışmamızda olduğu gibi diğer bazı çalışmalarda NMDA reseptör uyarısına süperoksit radikal üretimi cevabının bifazik olduğu gösterilmiştir (Dugan ve diğerleri, 1995; Reynolds ve Hastings, 1995; Sengpiel, Preis, Krieglstein ve Prehn, 1998). NMDA reseptör uyarısını takiben, önce serbest radikal üretiminde artma olur. Oksidatif streste bu erken artış hücrelerdeki mevcut antioksidan kapasite ile karşılanmaya çalışılır. Daha sonra uyarının süresinin uzaması ile nöronda Ca^{2+} yüklenmesinin devam etmesi, mitokondrial depolarizasyon, sitokrom c serbestleşmesi ve mitokondrial solunum zinciri aracılığı ile serbest radikal üretimini hızlandırır. Nitekim Peng ve diğerleri (1998) dopaminerjik nöronlarda uzun süreli ve aşırı NMDA reseptör aktivasyonundan sonra mitokondrial Ca^{2+} yüklenmesinde sürekliliğin zamanla doğru orantılı olarak mitokondrial disfonksiyona, mitokondrial depolarizasyona ve sitokrom c serbestleşmesine yol açtığını

göstermişlerdir (Peng ve Greenamyre, 1998; Greenamyre, MacKenzie, Peng ve Stephans, 1999).

Bizim çalışmamızda yüksek konsantrasyonda glukoz bulunan ortama insülin ilavesi SH-SY5Y hücrelerinin total metabolik aktivitesini ve canlı hücre oranını hem kontrollara hem de sadece glukoz maruz bulunan hücrelere nazaran azalttığı tespit edilmiştir. Santral sinir sisteminde insülin reseptörlerinin nöron hücreleri tarafından eksprese edilmesine rağmen, nöronların glukoz transportu ve kullanımı bakımından insülin bağımsız olduğu kabul edilmektedir (Schuh ve diğerleri, 2011). Ancak, nöronlar insüline bağımlı olmamalarına rağmen insüline yanıt verirler (Xu ve diğerleri, 2004; Toth ve diğerleri, 2006). İnsülin-bağımlı dokularda olduğu gibi nöronlarda da insülin direnci gelişebilmekte ve mitokondrial biyogenezis bozulmaktadır (Kim, McLean, Philip ve Feldman, 2011). Bizim çalışmamızda oksidatif stres ilk 24 saatte %41, ikinci 24 saatte ise %209 artmış, buna karşın hücre canlılığı birinci 24 saatte ortalama %29,5 ve ikinci 24 saatte ise ortalama %58,26 azalmıştır. Yüksek glukoz 40 μ U/ml insülin ilavesi ortamda sadece glukoz varlığına oranla ilk 24 saatte NO üretimini 1,4 kat, GLUT3 membran füzyonunu %22,2 azaltmıştır. Glukoz+insülin uyarısının ikinci 24 saatte uzaması ise hem NO üretimini hem de GLUT3 membran füzyonunu yaklaşık 2,5 kat azaltmıştır. Bu bulgular ortama insülin ilavesi ile nöron içine glukoz transportunda azalma olduğunu göstermektedir. De la Monte ve diğerlerinin (2012) bulgularından farklı olarak SH-SY5Y hücrelerinde membran depolarizasyonunun azalması ile GLUT3'ün membran translokasyonunun azalması ve bunu izleyen glukoz transportunda ve kullanımında azalmaya bağlı mitokondrial oksidatif strese artmanın, insüline direnç gelişmesinin sonucu olduğu düşünülmektedir (De la Monte, 2012). İnsülinle uyarılan NO üretiminin inhibe edilmesinin insülin direncine sebep olduğu gösterilmiştir (Bergandi ve diğerleri, 2003). Bizim çalışmamızda ilk 24 saatte NO azalması %30,4, ikinci 24 saatte %60,5'dir. Santral sinir sisteminde insülin direnci, periferik dokularda olduğu gibi nöron tarafından klasik glukoz tutulumunu etkilemez, ancak membran depolarizasyonu ile uyarılan glukoz tutulumunu engeller (Talbot ve diğerleri, 2012). Uemura ve ark. insülinin, GLUT3'ün nöron hücre membranına füzyonunda herhangi bir rolü olmadığını, ancak nöron hücre membranının depolarizasyonuna yol açarak nöron içine glukoz girmesinde etkili olduğunu göstermişlerdir (Uemura ve Greenlee, 2006).

Yüksek glukoza maruz kalan SH-SY5Y hücrelerinde ilk 24 saatteki total metabolik aktivite/hücre canlılığı, glukoza maruziyetin devam etmesiyle ikinci 24 saatte %53,9 azalır. Ortama insülin ilave edildiğinde ilk 24 saatteki azalma %29,5, ikinci 24 saatte ise %58,26'dır. Ortamda glukoza maruziyet süresinin uzamasıyla oksidatif stres %117,6 artmış, ortama insülin ilavesi ile oksidatif stres ilk 24 saatte %41, ikinci 24 saatte ise %209 artmıştır. Nörodejeneratif hastalıklarda dopaminerjik nöronların hem yüksek glukoz konsantrasyonuna maruziyeti, hem de insülin direncine bağlı oksidatif stresin artması mitokondrial disfonksiyona ve apoptoza sebep olmaktadır (Mattson ve diğerleri, 1999). Nitekim yüksek glukozla ikinci 24 saatte apoptoz oranı %45'den yüksek glukoz+insülinle %77'ye çıkmıştır. Kim ve diğerleri (2011) nöronlarda 25mM glukozla 20nM insülin konsantrasyonunun 48 saat içinde protein kinaz B (Akt)'nin insülinle fosforilasyonunu azalttığını insülin direncine sebep olduğunu göstermişlerdir (Kim ve diğerleri, 2011). Son ve diğerleri (2012) ortama 5 nM-1 μ M arasında farklı dozlarda insülin ilave etmişler ve yüksek dozda insülinin bizim çalışmamızda olduğu gibi 48 saat içinde SH-SY5Y hücrelerinde insülin direnci meydana getirdiğini tespit etmişlerdir (Son ve diğerleri, 2012).

Nöronlara glukoz transportu ve metabolik aktivite insülininden bağımsızdır. İnsülin kan-beyin bariyerini özgün bir transport sistemi ile geçer ve birçok metabolik olmayan işlevleri vardır (Banks ve diğerleri, 2012). Banks ve diğerlerine göre insülin transport sisteminin ortalama saturasyonu 0,5–0,6 μ l/g-dakika olup, birçok çalışmada 0,2 - 1,7 μ l/g-dakika arasında değiştiği ileri sürülmektedir. Bu değişiklikler, NO düzeyi gibi faktörlerle doğal bağışıklık sisteminin aktivasyonuna bağlanmıştır (Banks ve diğerleri, 2008). Ancak serum insülin düzeyi çok yükseldiğinde santral sinir sisteminde de insülin düzeyi yükselir. Birçok çalışmada santral sinir sisteminde insülininin, serum insülininin serum glukozu üzerinde gösterdiği etkilerin tersine bir etki gösterdiği gözlenmiştir (Schwartz, Figlewicz, Baskin, Woods ve Porte, 1992). Periferik insülin direnci meydana geldiğinde kan insülin düzeyinde görülen yükselme, santral sinir sisteminde de insülin düzeyinin artmasına sebep olur ve nöronlarda serbest radikal üretimine katkıda bulunur. GLUT1 glukozun kan-beyin bariyerini geçmesinde etkilidir. GLUT3 ise primer olarak nöronlar tarafından eksprese edilir ve nöron içine glukoz transportunda membran depolarizasyonu ile birlikte sinerjistik etki gösterir (Watson ve Pessin, 2001). GLUT3'ün membran füzyonu ve glukoz transportu insülininden bağımsızdır (Uemura ve Greenlee, 2006). Bizim çalışmamızda ortama yüksek

konsantrasyonda glukoz ilavesi ile ilk 24 saatte kontrollara göre ortalama GLUT3'de istatistiksel olarak önemli bir artma olmuştur. İkinci 24 saatte bu artış yaklaşık 2 katına çıkmıştır. Yüksek glukoz konsantrasyonu ile uyarılan NMDA reseptör aracılı NO artışı, cGMP/cGK sinyal iletim yolağını uyararak GLUT3'ün plazma membranına translokasyonunu kolaylaştırır. Membran GLUT3 füzyonundaki artış ise, glukoz transportunu hızlandırır. Sinaptik NMDA reseptör uyarısı nNOS'ın bifazik fosforilasyonuna sebep olarak nöron içinde NO üretimini sağlar. Sonuç olarak; nNOS fosforilasyonu üzerinden NMDA reseptörlerinin sinaptik stimülasyonu NO-aracılı bir yolakla GLUT3'ün membran füzyonunu uyararak glukozun hücre içine girişini hızlandırır (Ferreira, Burnett, ve Rameau, 2011). Bizim çalışmamızda da gösterildiği gibi glukozla kronik NMDA uyarısı GLUT3 düzeyini yükseltir (Maher, Davies-Hill, Lysko, Henneberry ve Simpson, 1991). Yüksek glukoz bulunan ortamda SH-SY5Y hücrelerinin ürettikleri NO'nin kontrollara göre hem ilk, hem de ikinci 24 saatte artması, beraberinde oksidatif stresin de artmasına sebep olur. Buna karşılık total metabolik aktivite ve hücre canlılığının %54,87'ye düşmesi, hücreye giren yüksek konsantrasyonda glukozun glikolitik yolda metabolize edildiğinin, PPP'na yeteri kadar giremediğinden antioksidan kapasitenin rejenere edilemediğinin göstergesidir.

Yüksek glukoz bulunan ortamda SH-SY5Y dopaminerjik hücrelerin ürettiği NO ve GLUT3 miktarları, maruziyet süresi ikinci 24 saate uzayınca istatistiksel bakımdan önemli artma göstermektedir. Oksidatif stresin %117,6 artmasına rağmen GLUT3'ün 2 kat artması, GLUT3'ün membran translokasyonunun ve füzyonunun oksidatif stresten etkilenmediğini ve NO-aracılı bir mekanizma ile gerçekleştiğini düşündürmektedir.

Ortama insülin ilavesi ile ölçülen GLUT3, sadece yüksek glukoz bulunan ortamdaki hücrelerin ürettiği GLUT3 değerlerine göre hem ilk hem de ikinci 24 saatte istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana getirmiştir ($p < 0,05$). Bu sırada oksidatif stres artmıştır. İnsülin nöronlarda peroksit üretim ve serbestleşmesine sebep olarak oksidatif stresi artırır (Storozhevyykh, Senilova, Persiyantseva, Pinelis ve Pomytkin, 2007; Pomytkin ve Kolesova, 2002). Bu bulgular öncelikle insülinin GLUT3 üzerinde doğrudan etkisinin olmadığını ortaya koymaktadır. İkinci olarak, GLUT3'ün hücre lizatlarında ölçüldüğü dikkate alınırsa, SH-SY5Y hücrelerinde yüksek glukozla ilk 24 saatte kontrollara göre %50, ikinci 24 saatte

%80 artan GLUT3 miktarının glukoz+insülinle önemli oranda azaldığını ve bu azalmanın NO sentezi ile doğrudan ilişkili olduğunu göstermektedir.

Ortama glukoz+KynA ilave edildiğinde ikinci 24 saatta, ilk 24 saata göre SH-SY5Y hücrelerinin GLUT3 ve NO sentezinde artma buna karşılık oksidatif streste bifazik azalma meydana gelmiştir. Yüksek glukoz+KynA'e maruz kalan hücrelerde, sadece yüksek glukozu maruz kalanlara nazaran ilk 24 saatta GLUT3 %55,5 azalırken NO %47,3 azalmış, ikinci 24 saatta ise GLUT3 %33 azalırken NO %61,1 azalmıştır. Bu bulgular ortama KynA ilave edildiğinde, SH-SY5Y hücreleri içine glukoz transportunun ilk 24 saatta kontrol altına alındığını ve böylece glikoliz-aracılı oksidatif stresin azaltıldığını ortaya koymaktadır. İkinci 24 saatta GLUT3 ekspresyonu birinci 24 saata göre 3 kat artmasına rağmen oksidatif stresin %11,9 azalması ve hücre canlılığının kontrollerin düzeyine gelmesi, nöron içine giren glukozun antioksidan kapasitenin rejenerasyonunda kullanıldığını düşündürmektedir. NMDA reseptör GluN2B blokajı yapan KynA, glukoz transportu ve oksidatif stresi kontrol altına alarak total mitokondrial metabolik aktiviteyi ve hücre canlılığını korumaktadır.

NMDA reseptör aktivasyonu esnasında ROS'nin kaynağı postsinaptik NADPH-oksidazdır. NO, NMDA reseptörü ile ROS rejenerasyonu arasında kritik bir köprüdür (Girouard ve diğerleri, 2009). Ortamdaki yüksek konsantrasyondaki glukoz ve 40µU/ml insüline NMDA reseptör blokajı yapan KynA ilavesi, bir redoks paradoks olarak insülinle artan oksidatif stresin (Goldstein, Mahadev ve Wu, 2005) %84,3 azalmasına sebep olur. Glukoz+insülin'e KynA ilavesi ile ilk 24 saatta NO üretiminde %11,5 olan azalma görülmesine rağmen, bu miktar glukoz+KynA bulunan ortamda hücrelerin ürettiği NO ile karşılaştırıldığında %16,8 oranında yüksektir. İkinci 24 saatta ise glukoz+insülinle %60,5 olan NO azalması, KynA ilave edilince çok az gerilemiştir. Sonuçta KynA, insülinle meydana gelen oksidatif stresi önlediği gibi SH-SY5Y hücrelerde GLUT3'ün membran füzyonunu %28,5 artırır. Yüksek glukoz+insülinle ilk 24 saatta MTT=%85,2±1,18 olan ortalama total metabolik aktivite, ikinci 24 saatta %22,95±1,04'e kadar azalmıştır. Ortama KynA ilavesi ile ilk 24 saatta %104,8'e çıkmış, ikinci 24 saatta ise %89,3 artarak 103,9±6,49 olmuştur. KynA, ikinci hücre siklusunda yüksek glukoz+insülinle sadece yüksek glukozu göre %209 artan oksidatif stresi %260,3 azaltarak 0,36±0,01'e düşürmüştür. Ortama KynA ilavesi ile insülin direncinin

oksidatif stres, mitokondrial disfonksiyon ve glukoz transportunda azalma gibi bulguları tamamen ortadan kalkmıştır (Bkz Çizelge 4.2., Çizelge 4.8., Çizelge 4.15., Çizelge 4.17.).

Yüksek glukozla bağlı aşırı miktarda süperoksitler, peroksinitritler ve hidroksil radikalleri gibi ROS'nin mitokondride birikmesi nöronda antioksidan kapasiteyi azaltır. Aşırı NADPH oksidasyonu, nöronal depolarizasyon ve apoptozla sonuçlanır (Malkov ve diğerleri, 2014; Greene, Stevens, Obrosova ve Feldman, 1999). KynA, glukotoksisiteyi aşırı reaktif oksijen radikali oluşumu ve mitokondrial membranin hiperpolarizasyonunu izleyen depolarizasyonu inhibe ederek önler (Russell ve diğerleri, 2002). Nitekim diyabette hipergliseminin oksidatif stresle birlikte olduğu ve mitokondrial membran hiperpolarizasyonunu izleyen depolarizasyonla nöronal apoptoz meydana geldiği gösterilmiştir (Vincent, Brownlee ve Russell, 2002). Bizim çalışmamızda KynA, hem yüksek glukozla bağlı, hem de yüksek glukoz+insüline bağlı oksidatif stresi başarılı bir biçimde inhibe ederek, total mitokondrial metabolik aktiviteyi ve hücre canlılığını kontrollerin düzeyine çıkarmış, insülin direncini önlemiştir (Bkz Çizelge 4.2., Çizelge 4.8., Çizelge 4.15., Çizelge 4.17.).

NMDA reseptörü üzerinden nNOS'un aktivasyonu ile NO sentezinde artmaya sebep olur. Nöronlar sadece kendi ürettikleri NO'ı kullanabilirler (Girouard ve diğerleri, 2009). nNOS kaynaklı NO, NMDA reseptör aracılı ROS'nin üretiminde mutlak bir gereksinim olmasına rağmen, bir antioksidan olarak da serbest oksijen radikalleri ile reaksiyona girer ve antioksidan kapasite içinde yer alır (Pacher, Beckman ve Liaudet, 2007).

Yapılan çalışmalar, aşırı üretilen NO'le meydana gelen toksisitenin süperoksit anyonları ile peroksinitrit oluşumuna bağlı olduğunu göstermiştir (Lipton ve Rosenberg, 1994). Önce akut dönemde NO ve Ca^{2+} iyonlarının birikimine bağlı mitokondrial disfonksiyon ortaya çıkar, sonra süperoksitlerin tek başına veya NO ile birlikte peroksinitrit meydana getirmesinden sonra ROS ve RNS kaynaklı nörotoksisite görülür (Brorson ve Zhang, 1997; Hughes, 2008). Primer antioksidan kapasiteyi oluşturan GSH nöronlarda ROS/RNS'ne bağlı oksidatif stresi önleyen en önemli bileşiktir. GSH'un azalması nöronal hücreleri NO toksisitesine duyarlı hale getirir (Aquilano, Baldelli, Cardaci, Rotilio ve Ciriolo, 2011). Ancak nöronda GSH düzeyinin artması için önce nNOS ekspresyonunun ve NO üretiminin

gerekli olduğu gösterilmiştir. Ancak bundan sonra NO toksisitesi tamponlanabilmektedir (Baldelli, Aquilano, Rotilio ve Ciriolo, 2008). Hücrel ve mitokondrial GSH seviyesinde akut azalma, NO-aracılı bir mekanizma ile mitokondrial kompleks-1'in azalmasına sebep olur (Chinta ve Andersen, 2006). Nitekim nöron ölümüne sebep olan mitokondrial kompleks-1 inhibisyonunda primer sebebin GSH azalmasını takiben NO üretiminde artma olduğu anlaşılmıştır (Hsu, Srinivas, Kumar, Subramanian ve Andersen, 2005). Nöronlarda süperoksitler, aşırı NMDA uyarısı sonucu fazladan üretilen NO ile reaksiyona girerek, ROS ve peroksinitritleri meydana getirirler. Bunlar da proteinlerin, lipidlerin ve DNA'nın oksidasyonuna yol açar (Sabens Liedhegner, Gao ve Mieyal, 2012). Bizim çalışmamızda kullanılan ve yüksek glukozla meydana gelen oksidatif stres sonucu NADPH'ye bağlı hücrel total metabolik aktiviteyi gösteren MTT redoks kontrol yönteminde, ortamdaki canlı hücreler tarafından üretilen NO'in meydana getirdiği oksidatif stresin şiddeti, NO'in canlı hücrelerde $[NADPH+NADP^+]-[GSSG-GSH]$ döngüsünün fonksiyonu olan MTT/Cc'ye oranı ile belirlenmiştir.

SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleri nNOS(+) nöron hücreleri olup NMDA reseptör uyarısı ile nNOS eksprese ederler ve NO üretirler (Lin, Wu, Wei ve Shen, 2014). Dopaminerjik hücre kültürlerinde bazal endojen nNOS ekspresyonu toksik etkilere karşı antioksidan ve koruyucu iken aşırı eksprese edildiğinde hızla serbest radikal meydana gelmesine ve hücre ölümüne yol açar (Brzozowski, Alcantara, Iravani, Rose ve Jenner, 2011). nNOS ekspresyonu, NMDA reseptör uyarısı ve nörotoksisite arasında önemli bir bağlantı meydana getirir ve nöron hücre kültürlerinde nörotoksisite, nNOS inhibitörleri ile büyük ölçüde azaltılabilmektedir (Dawson ve Dawson, 1996). Düşük nNOS aktivitesiyle meydana gelen düşük konsantrasyonlarda NO'in peroksit-aracılı hücre hasarını engellediği dikkate alınarak (Wen, Perez, Green, Sarkar ve Simpkins, 2004) bizim çalışmamızda öncelikle yüksek glukoz konsantrasyonu ile devam eden NMDA reseptör uyarısı ve nNOS aktivasyonu karşısında nöron hasarını en az düzeye indirmek için ortama ilave edilecek nonspesifik bir nNOS inhibitörü olan L-NAME'in optimal dozu 25µM olarak belirlenmiştir.

Ortamdaki yüksek glukozla 25µM L-NAME ilave edildiğinde, sadece yüksek glukozla maruz bulunan hücrelere göre ilk 24 saatte NO üretiminde %33,4 azalma olmasına rağmen oksidatif stres %91 artmış, hücre canlılığı ise %21,6 azalmıştır. Ancak ikinci 24 saatte

ortama sadece glukoz ilave edilen SH-SY5Y hücreleri ile glukoz+L-NAME ilave edilen hücreler karşılaştırıldığında; L-NAME ilavesi ile NO sentezi %57,2 düşerken GLUT3 düzeyi %55,5, oksidatif stresin şiddeti ise %37,8 azalmıştır. L-NAME ile ikinci hücre siklusunda oksidatif stresin azalması total metabolik aktivitede %79,9 artış meydana getirmiştir. Bu bulgular, nöron içine glukoz transportunda azalma ile NO sentezi ve oksidatif stresin azaldığını ve hücre canlılığının ters orantılı olarak arttığını ortaya koymaktadır.

NO düzeyinin azalmasına rağmen artan oksidatif stres NO toksisitesinin en önemli antioksidanı olan GSH'in rejenere edilemediğini ve nöronal hücrelerin endojen NO sentezine karşı duyarlılığını artırdığını göstermektedir. Aquilano ve diğerleri (2011) de bizim çalışmamız da olduğu gibi, ilk 24 saatte ortamda L-NAME olmasına rağmen NO düzeyinde yükselme tesbit etmişler ancak, bu yükselmenin sebebi olabilecek düzeyde bir nNOS ekspresyonu bulamadıklarını bildirmişlerdir (Aquilano ve diğerleri, 2011). Sadece glukoz bulunan ortamdaki GLUT3 düzeyinin L-NAME ilavesi ile azalmasının, nöron içine glukoz transportunun azalması ve nNOS inhibisyonu ile birlikte NMDA reseptör aktivitesinde azalma meydana geldiğini düşündürmektedir.

İlk 24 saatte glukoz+insülinle meydana gelen NO birikimi ortama L-NAME ilave edilmesi ile daha da yükselmiştir. NO birikimindeki bu artış GLUT3 düzeyindeki artışla uyumlu olup, öncelikle glukozla bağlı oksidatif stresin antioksidan kapasiteyi tüketmesi sonucu yeterli NO tamponlaması yapılamadığını, ikinci olarak da ortamda biriken NO'nun ilk hücre siklusunda nNOS aktivitesinde artma ile ilgisi olmadığını ortaya koymaktadır. Paradoks olarak gözüken bu durum, ortamda bulunan NO'nun ilk 24 saatte yani birinci hücre siklusunda hücre canlılığını fazla etkilemediğini göstermektedir.

Bulgularımız L-NAME ile nNOS blokajının ancak ikinci 24 saatte etkili olduğunu göstermiştir. Bu bulgu Aquilano ve diğerlerinin (2011) bulgularını desteklemektedir (Aquilano ve diğerleri, 2011). Bizim çalışmamızda L-NAME ile ikinci 24 saatte NO miktarı %57,2 azalırken oksidatif stresin şiddeti de bununla uyumlu olarak %37,8 azalmış (Girouard ve diğerleri, 2009), GLUT3 ise %55,5 oranında düşmüştür. Ortama glukoz+L-NAME+insülin ilave edildiğinde ilk 24 saate göre ikinci 24 saatte NO'de %49,6 azalma olurken, GLUT3'de %11,1 azalma meydana gelmiştir. Bu bulgular SH-SY5Y hücrelerinde

yüksek glukoz uyarısı ile meydana gelen NMDA reseptör aktivasyonu aracılı nNOS aktivasyonunun L-NAME ile azaltılmasının nöron içine glukoz transportunu da azalttığını göstermektedir. GLUT3 nöronlarda glukoz transportunu kolaylaştıran bir taşıyıcıdır. Ancak nöronal aktivitenin GLUT3 ile nöron içine glukoz taşınmasında nasıl etkili olduğu bilinmemektedir. Sinaptik aktivite membrana GLUT3 translokasyonunu artırarak intranöronal glukoz transportunun artmasını sağlar. Bu etkinin NMDA reseptör blokajı veya nNOS inhibisyonu ile bloke edildiği, NMDA reseptör uyarısı ile arttığı bilinmektedir (Ferreira ve diğerleri, 2011). NMDA reseptör-aracılı NO sentezinin KynA etkisi ile tüm glukoz konsantrasyonlarında, ortamda sadece glukoz bulunan SH-SY5Y hücre kültürlerine nazaran ikinci 24 saatte GLUT3 düzeyini ortalama %33 azalttığı gösterilmiştir ($p<0,05$). KynA ile elde edilen hem ilk 24 saatteki GLUT3 değerleri, hem de ikinci 24 saatteki GLUT3 değerleri istatistiksel bakımdan farklı bulunmuştur.

Bu bulgular, yüksek glukoz konsantrasyonunda GLUT3 düzeylerinin insülin bağımsız olduğunu ancak glukoz+insülin kombinasyonunda artan oksidatif stresin şiddetinden etkilendiğini düşündürmektedir. Aslında nöron dejenerasyonunun GLUT3 düzeyini azalttığı ileri sürülmekle birlikte erişkin nöronlarda metabolik aktivite ile GLUT3 ekspresyonunun ilişkili olup olmadığı tartışmalıdır. Ortamda 1-2 mM gibi düşük konsantrasyonlarda glukoz bulunduğunda GLUT3 nöron transport sisteminin glukozu yüksek afinite göstermesi ve enerji açığını kapatmaya çalışması önemlidir. Nöronal farklılaşma ve düşük glukoz düzeyi GLUT3 ekspresyon kapasitesini de artırır (Maher, Vannucci ve Simpson, 1994). GLUT3, aynı zamanda nöronlarda yüksek enerji gereksinimi olduğu zaman ekspresyonu artan bir glukoz taşıyıcısı olduğundan, özellikle düşük glukoz konsantrasyonlarında nöronlarda glukoz kullanımı GLUT3 ekspresyonunu etkiler (Simpson ve diğerleri, 2008). GLUT3'ün, hem glukozu afinitesi GLUT1, 2, 4'den daha fazla hem de GLUT1 ve 4'den beş kat daha fazla transport kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Bu özellikleri nedeniyle sinaptik terminal membranlardaki GLUT3 özellikle nöronal glukoz transportunda önemlidir. Çünkü serum glukoz konsantrasyonu 5-6 mM iken nöron çevresindeki glukoz konsantrasyonu sadece 1-2 mM gibi düşük bir düzeydedir (Simpson ve diğerleri, 2008; Leino, Gerhart, Van Bueren, McCall ve Drewes, 1997).

Bizim çalışmamızda ortama ilave edilen glukoz konsantrasyonları 8,3 mM-13,9 mM gibi oldukça yüksek düzeylerde olmasına ve kullanılan SH-SY5Y hücrelerinin nöronal farklılaşma göstermeyen hücreler olmasına rağmen ikinci 24 saatta ortamdaki glukoz konsantrasyonu ve NO düzeyinde kontrollara göre %149,3 artma ile birlikte GLUT3 de %80 gibi oldukça yüksek düzeye çıkmıştır. Bu nedenlerle Simpson ve diğerlerinin (2007) çalışmasında olduğu gibi (Simpson, Carruthers ve Vannucci, 2007), bizim çalışmamızda da SH-SY5Y hücrelerinde GLUT3'ün glukoz transport kapasitesini artıran sistemin, insülinin bağımsız ve NO düzeylerine duyarlı olduğunu düşünmekteyiz. Yüksek konsantrasyonda NO, nöronlarda sitokrom c oksidaz aktivitesini inhibe ederek mitokondrial enerji üretimini azaltır. AMP düzeyinde artma, glikolitik yolağın düzenleyicisi olan 6-fosfofrukto-1-kinaz ile birlikte GLUT3'ü aktive eder. Nöron NO ve peroksinitritlere son derece duyarlıdır. Bu uyarıya rağmen nöronlar, peroksinitritlerle mitokondrial inhibisyonun sona ermesiyle glikolitik aktivitelerini artıramazlarsa enerji yoksurluğu ile ölürler (Bolaños, Heales, Land ve Clark, 1995). Bizim çalışmamızda yüksek glukoz konsantrasyonları ile karşı karşıya bulunan SH-SY5Y hücre lisatlarında ölçülen GLUT3 değerleri, bu hücrelerin ortamdaki glukoz konsantrasyonunda artma ile birlikte GLUT3 ürettiklerini göstermektedir. Ortama 40µU/ml insülin ilavesi ile GLUT3 %61'e kadar düşmüştür. Bu bulgu, GLUT3'ün membran füzyonunun insülinin bağımsız olduğunu ortaya koymaktadır. Aslında GLUT3'ün nöron plazma membranına translokasyonunun membran hiperpolarizasyonu ile beraber olduğu ve GLUT3 ekspresyonunun olmamasının, hiperpolarizasyonu önlediği ve nöron ölümü ile sonuçlandığı gösterilmiştir (Weisová, Concannon, Devocelle, Prehn ve Ward, 2009). Glukoz+insülin'e maruz kalan hücrelerde GLUT3 %61 azalırken hücre canlılık oranı %58,2 azalarak $22,95 \pm 1,04$ 'e düşmüştür. Nöronda insülin reseptör otofosforilasyonu için mitokondride insülin-aracılı peroksit üretimine gerek vardır. Nöronda peroksit üretiminin engellenmesi, hem insülinle uyarılan peroksit serbestleşmesini hem de insülin reseptörünün insülinle otofosforilasyonunu inhibe etmektedir (Storozhevskiy ve diğerleri, 2007; Pomytkin ve diğerleri, 2002). Bizim çalışmamızda da ortama glukoz+insülin ilavesinin oksidatif stresi artırdığı gösterilmiştir. Mitokondrial ROS üretiminin inhibisyonu, insülinle indüklenen peroksit serbestleşmesini ve insülin reseptör otofosforilasyonunu engeller. Ancak fonksiyonel mitokondri, bir insülin-duyarlı peroksit kaynağıdır ve insülin reseptör aktivasyonunu destekler. İnsülin direncinin gelişmesinde asıl önemli faktörün

mitokondrial disfonksiyon olduğu gösterilmiştir (Pomytkin, 2012; Chance, Sies ve Boveris, 1979).

Canabal ve ark. 2,5 mM glukoz + 5 nM insülinle NO üretiminin %40 artarken sadece 5 mM glukozla %1,3 arttığını göstermişlerdir. Ortama memeli rapamisin hedefi (“mamalian target of rapamycin”, mTOR) inhibitörü veya AMPK aktivatörü ilave edilmesi, ortamda yüksek glukozun varlığında insüline cevap olarak NO üretimini artırmıştır. Canabal ve diğerlerinin (2007) çalışmasında yüksek glukoz konsantrasyonunun, mTOR’u aktive etmek sureti ile insülinle uyarılan NO üretimini bloke ettiği anlaşılmıştır (Canabal ve diğerleri, 2007). Bu mekanizma ile insülin-aracılı NO sinyal iletiminin durduğu ve insülin-aracılı NO üretiminin azalmasının insülin direncine sebep olduğu ileri sürülmektedir. Bizim çalışmamızda da glukoz+insülin ile ikinci 24 saatta NO %60,5 azalırken, oksidatif stres %209 artmıştır. Ortamda yüksek konsantrasyonda glukoz varlığı, bir enerji sensörü olan AMPK’nın inhibisyonu ile mTOR aktivitesini artırmaktadır (Harrington, Findlay ve Lamb, 2005; Tzatsos ve Kandror, 2006). mTOR aktivasyonu, insülin reseptör alt ünitesinin fosforilasyonunu önleyerek PI3K’ı aktive eder (Tzatsos ve Kandror, 2006). mTOR inhibe edilmeden insülin direncinin önlenemediği ileri sürülmektedir (Ueno ve diğerleri, 2005). Bizim çalışmamızda, mTOR aktivitesine bakılmadı ancak ortama sadece yüksek glukoz ilave edilmesi ile elde edilen ortalama NO düzeyi, ortama glukoz+insülin ilavesi ile ilk 24 saatta %30,4 azalmış, ikinci 24 saatta ise ortalama NO düzeyindeki bu azalma %60,5 olmuştur. Bu bulgular Canabal ve diğerlerinin (2007) bulgularını desteklemektedir.

Hidroksil ve peroksinitrit gibi radikallerin üretiminde artma ile meydana gelen NO aracılı dopaminerjik nöron hasarı sitokrom oksidaz, mitokondrial kompleks- 1’e ek olarak, GAPDH inhibisyonu; DNA hasarı, poli(ADP-riboz) sentaz, lipid peroksidasyon ve protein oksidasyonunun aktive olması ile birliktedir (Ebadi ve Sharma, 2003). GAPDH, SH-SY5Y hücrelerinde yaygın olarak bulunan klasik bir glikolitik enzimdir (Nakajima ve diğerleri, 2009). Aşırı NADH^+ oluşumu, mitokondrial süperoksitlerin aşırı üretimine ve daha fazla ROS ve RNS meydana gelmesine sebep olur. Özellikle NO, başta sitoplazmik proteinler olmak üzere plazma ve ekstrasellüler proteinlerle etkileşime girerek sitoplazmik bir protein olan GAPDH’nin aktif merkezindeki redoks-duyarlı sistein (Cys)-149 ve 152 moleküllerini okside etmek sureti ile GAPDH’ı inaktive eder (Rivera-Nieves, Thompson,

Levine ve Moss, 1999; Mohr, Stamler, Brüne, 1994). nNOS'un uyarılması ve NO sentezinde artma GAPDH'nin S-nitrozilasyonuna sebep olarak, enzimin nükleer translokasyonunu sağlar. Burada nükleer proteinlerin yıkılması sitotoksikite ve apoptozla sonuçlanır (Hara, Cascio ve Sawa, 2006). Sonuçta glikolizis ve "Krebs" siklusu ile glukoz metabolize edilemez ve gliseraldehit-3-fosfat (G3P) birikir. GAPDH'nin inaktive olması ile yüksek glukoz konsantrasyonuna yanıt olarak geç dönemde poliol yolağı aktive olur (Tang, Martin ve Hwa, 2012). Hücre membranları redoks sistemi, redoks dengeyi sağlayabilmek için $NAD^+/NADH$ oranını yüksek düzeyde tutmaya çalışır (Merker, Bongard, Kettenhofen, Okamoto ve Dawson, 2002). Ortama 50 mM glukoz ilave edildiğinde poliol yolağında glukoz, aldoz redüktazın katalitik etkisi altında NADPH ile birleşmekte ve sorbitol ile $NADP^+$ meydana gelmektedir. Sorbitol ve NAD, sorbitol dehidrogenazın etkisi ile d-fruktoz, NADH ve H^+ olur. Sonuçta $[NADP^+/NADPH]$ oranı artar (Travis, Morrison, Clements, Winegrad ve Oski, 1971). Aslında poliol yolağı kendi başına bir oksidatif stres kaynağıdır. Poliol yolağında aldoz redüktaz, $NADP^+$ -aracılı bir reaksiyonla glukozu sorbitole redükte eder ve ROS birikimi meydana gelir (Tang ve diğerleri, 2012). Poliol yolağında NADPH'nin iki basamaklı bir reaksiyonla NADH'ye dönüşmesi, NADH ile NAD^+ arasında redoks dengesizlik meydana getirir. NADH içeriğinin artmasına bağlı olarak $NAD^+/NADH$ oranı azalır ve redüktif stres gelişir. Nöronal ölüm, hücresel NAD^+ düzeyine bağlıdır. NAD^+ düzeyinde düşme glikolizisde ve ATP sentezinde yetersizlik sonucudur (Liu, Pitta ve Mattson, 2008). Poliol yolağının ilk basamağında NADPH'nin harcanmasına bağlı olarak okside glutatyon, GSH rejenerasyonu azalır. Buna paralel olarak nöron antioksidan kapasitesi azalır ve ROS artması ile de oksidatif hasar meydana getirir. Aslında oksidatif stres esnasında glikolizis inhibe edilerek, glukoz antioksidan PPP yolağında kullanılır ve glutatyon disülfidinin redükte edilmesi için gerekli NADPH üretilir. Sonuçta antioksidan kapasitesi son derece sınırlı olan nöronda enerji üretimi yerine antioksidan PPP yolağında GSH rejenerasyonu olur (Bolaños ve Almeida, 2010). Düşük düzeyde NO, nöronda glikolizis ve PPP yolağında glukoz kullanımı arasında dengenin kurulması ve antioksidan kapasitenin artırılmasında rol oynar (Bolaños, Delgado-Esteban, Herrero-Mendez, Fernandez-Fernandez ve Almeida, 2008).

NO'nin nöronlarda oksidatif hücre hasarına katkısı ayrıntılı olarak bilinmektedir. NMDA reseptör aktivasyonu ile ortaya çıkan nNOS aktivasyonu, peroksinitritlerle MPTP'ların

açılması veya poli-ADP-riboz polimeraz aktivasyonuna bağlı olarak toksik etki meydana getirir (Brown, 2010). nNOS'un mitokondrial hasar meydana getirerek nöronal apoptoz veya nöronal nekroza sebep olmasında, NO'nin peroksinitrit, NO₂, N₂O₃ ve nitrozotiyol gibi birçok reaktif maddeye dönüşmesinin rolü büyüktür (Brown ve Bal-Price, 2003). Diğer taraftan NO ve S-nitrozoglutasyon (GSNO), antioksidan özellikleri nedeni ile dopaminerjik nöronları, hidroksil radikallerinin meydana getirdiği oksidatif stresten başlıca 3 mekanizma ile korur; 1. Fenton reaksiyonunu yani demirle uyarılan hidroksil radikal oluşumunu inhibe ederek, 2. Lipid peroksidasyonu inhibe ederek, 3. GSH'un antioksidan etkisini artırarak, oksidatif stresi önler (Chiueh ve Rauhala, 1999). [GSH-GS-GSNO/NO+GSSG-GSH] yolağı nöronun antioksidatif direnç sisteminde son derece önemlidir (Chiueh, 1999). Peroksinitritlerin oksidatif etkisi GSNO ile tam olarak, GSH ile ise kısmen önlenir (Rauhala, Lin ve Chiueh, 1998). Ayrıca, nNOS ile meydana getirilen düşük konsantrasyonlarda NO, antioksidan etki göstererek peroksit-aracılı hücre hasarını da engeller (Wen, Perez, Green, Sarkar ve Simpkins, 2004). Bizim çalışmamızda ilk 24 saatte yüksek glukozla üretilen NO miktarı yüksek olmasına rağmen oksidatif stres şiddeti düşük (ortalama Q/Glukoz=0,34±0,03) ve ortalama hücre canlılığı yüksektir (%119±5,6). İlk 24 saatte ortamda bulunan NO ve GSH antioksidan özelliği nedeni ile glukozla meydana gelen oksidatif hasara karşı, doğrudan nöron koruyucu etki gösterir ve bu süreçte mevcut GLUT3 düzeyi ile nöron içine glukoz transportu ve glikolizis ile SH-SY5Y hücrelerinin antioksidan kapasitesi tüketilir (Fernández-Tomé, Lizasoain, Leza, Lorenzo ve Moro, 1999). Ancak ikinci 24 saatte nNOS'un da aktive olması ile NO üretimi artar ve oksidatif stres de yaklaşık 2 kat artar. NO'nin 1,4 kat artması ile GLUT3 2 kat artar. Buna karşılık total metabolik aktivite ve hücre canlılığı 2 kat azalır. Yüksek glukozla NMDA reseptör uyarısı ikinci 24 saatte aşırı NO üretimi ve RNS oluşumunu hızlandırarak mitokondrial hasara ve nöronal apoptoza sebep olur (Nomura, 2004). İkinci 24 saatte üretilen NO ve ortalama oksidatif stres anlamlı biçimde artarken, hücre canlılığı düşmüştür. Nöron içi antioksidan kapasitenin tüketilmesi ile meydana gelen GSH düzeyi değişikliklerinin, NO'nin nörotrofik etkisinin nörotoksik hale gelmesine yol açarak aşırı serbest radikal oluşumu ile birlikte apoptoza yol açtığı daha önce gösterilmiştir (Canals, Casarejos, De Bernardo, Rodríguez-Martín ve Mena, 2001). Buna karşılık düşük konsantrasyonlarda NO'nin ise mitokondrial depolarizasyona yol açarak mitokondrial Ca²⁺ tutulumunu ve ATP üretimini azalttığı ileri sürülmektedir (Keelan, Vergun ve Duchon, 1999).

Nöronal NOS(-) farelerin insüline dirençli olduğu görülmüştür (Shankar, Wu, Shen, Zhu ve Baron, 2000). Yüksek glukoz varlığında meydana gelen yüksek konsantrasyonda NO, mitokondrial $[NADPH^+-NADP^+]$ – $[GSSG-GSH]$ döngüsüne bağlı serbest radikal üretiminde rol oynayarak oksidatif stresi artırır. Ortamdaki glukozu insülin ilave edildiğinde NO'nin meydana getirdiği oksidatif stres, L-NAME ilavesi ile %81 azalmıştır. $NADPH^+$ 'ye bağlı total mitokondrial metabolik aktivite, oksidatif stresle ters orantılı bir değişim göstermektedir. İlk 24 saatte ortamda sadece glukoz olduğunda meydana gelen oksidatif stres, insülin ilavesi ile %41 artarken total metabolik aktivite %29,5 azalmıştır. Glukoz+insüline maruz bulunan hücrelerde meydana gelen oksidatif stres, ortamda glukoz+insülin'e L-NAME ilave edildiğinde görülen oksidatif stresle karşılaştırıldığında ilk 24 saatte sadece %10,4 azalmıştır. Buna karşılık total metabolik aktivite %15,49 artmıştır. Oksidatif streste ölçülen %14,6 fark, ilk hücre siklusu sırasında ortamda bulunan NO kaynaklı radikallerin, nNOS'tan bağımsız olduğunu göstermektedir.

Bizim çalışmamızda ortama glukoz+insülin+L-NAME ilave edildiğinde, hem ilk ve ikinci 24 saatte MTT ile ölçülen total mitokondrial metabolik aktiviteler arasında hem de birinci ve ikinci hücre siklusu ile kontrol grubu hücrelerinin total metabolik aktiviteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır.

Ortama glukoz+insülin'e L-NAME ilave edildiğinde ikinci 24 saatte NO sentezinde azalma %21,8 olarak bulunmuştur. Bu sırada glukoz+insülin+L-NAME'e maruz bulunan hücrelerin ilk 24 saatte ürettikleri NO miktarı ikinci 24 saatte %49,6 oranında düşmüştür. Bu bulgular, Glukoz+insülin bulunan ortamda 25 μ M L-NAME'in ancak ikinci 24 saatte SH-SY5Y hücrelerinde önemli ölçüde nNOS inhibisyonu yaptığını göstermektedir. Ortamda glukoz+insülin varken oksidatif stres ilk 24 saatte ortama sadece yüksek glukoz ilave edilen hücelere göre %41, ikinci 24 saatte ise %209 artmıştır. Aynı ortama L-NAME ilave edilmesiyle oksidatif stres ortamda glukoz+insülin bulunan hücelere göre ilk 24 saatte daha az artmış, ikinci 24 saatte ise sadece yüksek glukozu göre %259 azaltarak $2,29 \pm 0,08$ 'e yükselen oksidatif stresi $0,37 \pm 0,01$ 'e düşürmüştür. Bu durum ikinci 24 saatte L-NAME ile nNOS inhibisyonunun meydana gelmesinden kaynaklanmaktadır. Lin ve diğerleri bizim çalışmamızda olduğu gibi, NMDA reseptör uyarısı ile meydana gelen NO'nin nNOS kaynaklı olduğunu göstermişlerdir (Lin ve diğerleri 2014). Yüksek glukoz uyarısı ile SH-SY5Y

hücreleri tarafından üretilen NMDA reseptör aracılı NO ancak ikinci 24 saatte büyük ölçüde doğrudan nNOS aktivitesine bağlıdır. Aşırı NO üretiminin nonspesifik nNOS inhibitörü L-NAME ile azaltılması total metabolik aktiviteyi ve hücre canlılığını ($MTT = 99,29 \pm 4,34$), hem sadece yüksek glukoz maruz bulunan ($MTT = 54,87 \pm 3,35$), hem de yüksek glukoz+insüline maruz bulunan ($MTT = 22,95 \pm 1,04$) hücrelere nazaran büyük oranda artırmaktadır. Bu bulgular, SH-SY5Y hücrelerinin yüksek glukoz maruziyeti sonucu NMDA reseptör aktivasyonu ile meydana gelen NO ve ROS/RNS üretiminin aynı sinyal iletim yolağında yer aldıklarını ortaya koymaktadır. Ortamda GSH'un tüketilmesi ile artan oksidatif stres, erken evrede başlayan glikolizisin inhibe edilerek nitrozatif strese karşı PPP yolağında GSH'un yeniden rejenere edilmesini sağlar (Bolaños ve Almeida, 2010). Nitekim Aquilano ve diğerlerine (2011) göre hücre kültürü ortamına GSH düzeyini azaltan bütiyonin sülfoksimin ilave ettikten sonra NO ölçümleri ile nNOS aktivitesi analizlerini yapmışlar ve GSH azalmasının bazal düzeyde nNOS ile önemli miktarda NO birikimine sebep olduğunu göstermişlerdir (Aquilano ve diğerleri, 2011).

Hem glukoz+insülin bulunan ortamla, glukoz+insülin+L-NAME bulunan ortam arasında, hem de glukoz+L-NAME ile glukoz+insülin+L-NAME bulunan ortam arasında SH-SY5Y hücrelerinin GLUT3 ekspresyonları bakımından istatistiksel bakımdan bir fark yoktur. Bu bulgular NO sentezi baskılandığında insülinin, yüksek glukoz konsantrasyonu ile meydana gelen oksidatif strese ve NO üretimine bir katkısının olmadığını ve NO ile GLUT3 arasındaki regülasyonunun bozulduğunu göstermektedir.

Aslında NMDA reseptör aracılı NO artışı, cGMP/cGK sinyal iletim yolağını uyararak GLUT3'ün plazma membranına translokasyonunu kolaylaştırır. Membran GLUT3 miktarındaki bu artış, glukoz transportunu hızlandırır. Sinaptik NMDA reseptör uyarısı nNOS'ın bifazik fosforilasyonuna sebep olur ve nöron içinde NO üretimini sağlar. nNOS fosforilasyonu üzerinden NMDA reseptörlerinin sinaptik stimülasyonu NO-aracılı bir yolla GLUT3'ün membran ekspresyonunu uyarır ve glukozun hücre içine girişini hızlandırır (Ferreira ve diğerleri, 2011). Bizim çalışmamızda elde edilen bulgulara göre, yüksek glukoz konsantrasyonuna bağlı NMDA reseptör aktivasyonunun sebep olduğu NO-aracılı GLUT3 membran translokasyonu, nöron içine glukoz girmesinde önemli bir

mekanizmadır. Ancak nNOS inhibisyonu NO'nun, GLUT3'ün membran füzyonu üzerindeki kontrolünü azaltmaktadır.

NMDA reseptörleri hem sinaptik hem de ekstrasinaptik yerleşim gösterirler (Harris ve Pettit, 2007; Thomas, Miller ve Westbrook, 2006). Sinaptik NMDA reseptör aktivitesi nöron yaşamının sürdürülmesi için önemlidir. Ekstrasinaptik NMDA reseptör aktivasyonu ise daha çok nöron hasarına sebep olur (Zhang ve diğerleri, 2007). Nöron hasarına sebep olan uyarının derecesi sinaptik ve ekstrasinaptik NMDA reseptörlerinin aktivasyon süresine ve büyüklüğüne bağlıdır (Zhou, Hollern, Liao, Andrechek ve Wang, 2013). Tek başına veya sinaptik NMDA reseptör aktivasyonunun varlığında, ekstrasinaptik NMDA reseptör aktivasyonu ile nöron içine aşırı Ca^{2+} girişi, mitokondrial disfonksiyon ve hücre ölümü ile sonuçlanır (Hardingham ve diğerleri, 2002). Fonksiyonel NMDA reseptörleri; GluN1, GluN2A-D, GluN3A-B gibi farklı alt ünitelerden meydana gelmiş bir tetramerdir (Al-Hallaq ve diğerleri, 2007). Esansiyel bir amino asit olan triptofanın, kinürenin yolağında metabolize olması ile diğer nörotoksik metabolitlerin yanında meydana gelen KynA, NMDA reseptörlerini bloke eden tek endojen bileşiktir ve NMDA reseptörünün kompetitif antagonistidir (Bkz Şekil 5.1.) (Stone, 2000; Luccini ve diğerleri (2007) NMDA reseptörlerinde glutamaterjik uyarının submikromolar konsantrasyonda (0.01-1 μ M) KynA ile etkin biçimde antagonize edildiğini göstermişlerdir (Luccini ve diğerleri, 2007). NMDA reseptör-aracılı oksidatif stres mitokondrial disfonksiyona sebep olmaktadır. Spesifik NMDA reseptör antagonisti KynA, aynı zamanda α 7nAChR reseptör ve AMPA reseptörlere de bağlanmaktadır (Sas ve diğerleri, 2007). KynA'nın, α 7nAChR inhibisyonu yapma dozunun ortalama 7 μ M olduğu gösterilmiştir. GABAerjik etkiyi azaltma dozu ise 20-200 μ M olarak bildirilmektedir (Albuquerque ve Schwarcz, 2013). Bazı araştırmacılar KynA'nın yüksek milimolar konsantrasyonlarda bile α 7nAChR üzerinde inhibitör etkisi olduğunu gösterememişlerdir (Mok ve diğerleri, 2009; Dobelis ve diğerleri, 2012.). Aslında SH-SY5Y hücrelerinin erişkin kolinerjik fenotipi, retinoik asit ile diferansiye olmuş hücrelerdir. Bunlar yüksek miktarda kolin asetil transferaz eksprese ederler (Påhlman ve diğerleri, 1984; Adem, Mattsson, Nordberg ve Påhlman, 1987). Ayrıca diferansiye SH-SY5Y hücrelerinin antioksidan kapasitesi de yüksektir (Schneider ve diğerleri, 2011). İnsanlarda 30 mM'a kadar yüksek konsantrasyonda glukoz varlığında santral sinir sistemi KynA sentezinin baskılanmadığı ileri sürülmektedir. Aşırı glukoz, ROS üretimini artırarak

mitokondrial oksidatif fosforilasyonu engeller. Aşırı miktarda serbest oksijen radikali üretimi, non-enzimatik protein glikasyonuna, kaspaz aktivasyonuna ve intranöronal enerji metabolizmasının bozulmasına sebep olarak glikotoksisiteye bağlı nörotoksisitenin gelişmesi ile sonuçlanır (Brownlee, 2001; Russell ve diğerleri, 2002). KynA iyonotropik glutamat reseptörlerini bloke edebilen bilinen tek endojen bileşiktir (Stone, 2000). Diğer nöron reseptörleri dikkate alındığında sadece NMDA reseptörlerinin, nanomolar konsantrasyonda KynA ile inhibe edildiği bilinmektedir (Stone, 2000; Luccini ve diğerleri, 2007). Bizim çalışmamızda yüksek glukoz konsantrasyonu ile nöron hasarı ve apoptoz dikkate alınarak daha çok ekstrasinaptik NMDA reseptör-GluN2B alt ünite blokajı yaptığı düşünülen KynA'nın, 30nM NMDA reseptör inhibisyon dozu seçilmiştir (Zádori ve diğerleri, 2014).

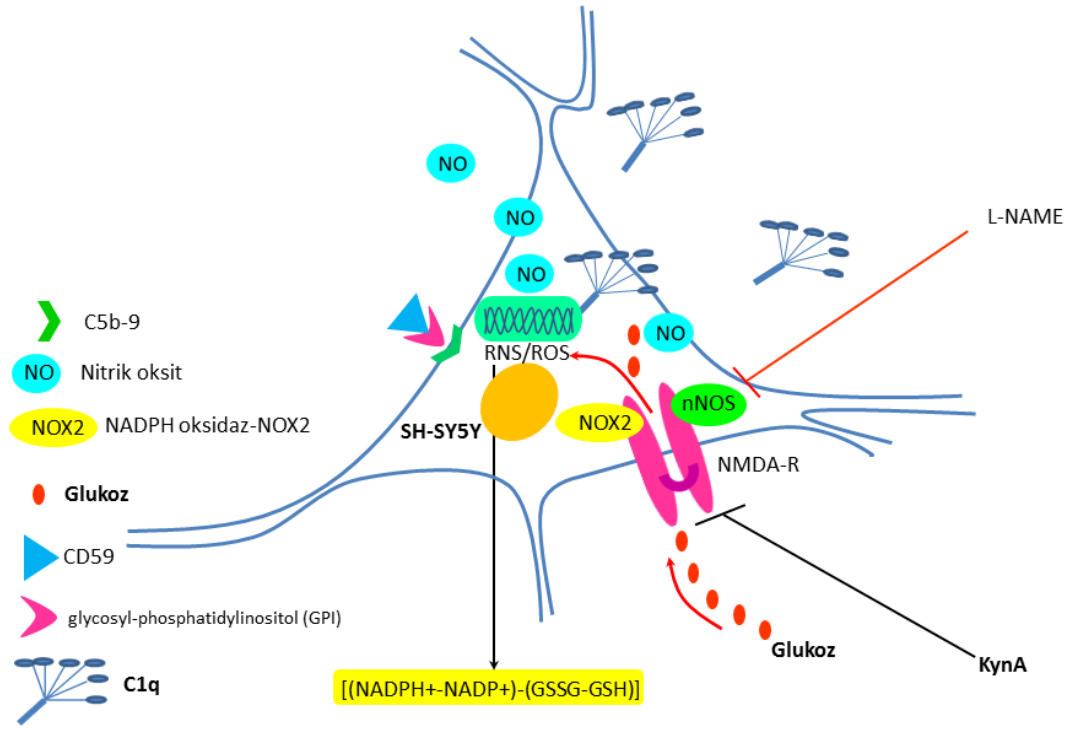
SH-SY5Y hücrelerinin bir siklus geçirdikten sonra ikinci 24 saatta 150 mg/dl, 200 mg/dl, 250 mg/dl glukoz konsantrasyonları ile $41,93 \pm 3,9$ 'a kadar düşen, ortama glukoz+40 μ U/ml insülin ilavesiyle ise $22,95 \pm 1,04$ 'e kadar düşen canlılık oranları 30 nM KynA ilavesi ile kontrol hücrelerinin düzeyine çıkmıştır. KynA, sadece yüksek glukoz bulunan ortamda kontrollara oranla ikinci 24 saatta %149,3 artan NO düzeyini %61,1 azaltarak, %89,7 artan oksidatif stresin şiddetini %50 oranında baskılamıştır. Oksidatif stresin şiddeti sadece glukoz ilave edilen ortama göre KynA'le ilk 24 saatta %23,5 artmışken ikinci 24 saatta %50 azalmıştır. Birinci 24 saattaki %23,5 artışın ilk hücre siklusunda NMDA reseptör blokajı tamamlanmadan glikolizise bağlı ve ortamdan kaynaklanan serbest radikaller nedeni ile ortaya çıktığı düşünülmektedir (Bkz Çizelge 4.2., Çizelge 4.3., Çizelge 4.8.).

Yüksek glukozla ikinci 24 saatta kontrollara göre GLUT3/Cc artışı %80 olup, nöron içine glukoz transportu SH-SY5Y hücrelerinin ikinci siklusunda KynA etkisi ile NMDA reseptör blokajı sonucu GLUT3 ekspresyonu %33 azalmıştır. KynA ilave edildiğinde total metabolik aktivite ikinci 24 saatta %77,3 artar. KynA ile bir taraftan GLUT3 ekspresyonunun azaltılması, diğer taraftan ekstrasinaptik NMDA reseptör blokajı ile aşırı NO sentezinin %61,1 inhibe edilmesi, nöron içine aşırı glukoz transportunu ve serbest radikal üreten glikolitik yolağın hızını azaltır. Glukoz+KynA ile ikinci 24 saatta birinci 24 saata nazaran GLUT3 artışı %150 olmasına rağmen oksidatif stres ve NO sentezi azalmaktadır. Sadece yüksek glukoz ilave edilen ortamda NMDA reseptör blokajı yokken ikinci 24 saatta birinci

24 saata nazaran GLUT3 %100 artar, NO sentezi %42,6 artar ve oksidatif stres %117,6 artar. Bu bulgular KynA'le NMDA reseptör blokajının, nöron içine alınan glukozun antioksidan kapasitenin rejenere edilmesinde kullanılarak oksidatif stresi engellediğini göstermektedir.

Ortama KynA ilavesi ile ilk 24 saatta hücre başına düşen ortalama total metabolik aktivite $MTT/Cc=1,48\pm0,05$ %/hücre sayısı, ikinci 24 saatta ölçülen $MTT/Cc=1,76\pm0,05$ %/hücre sayısıdır ($p<0.05$). Hücre başına düşen metabolik aktivite ile glukoz transportu uyumludur. Ancak ilk 24 saatta metabolik aktivitenin düşük olması sonucu $[NADPH^+-NADP^+]$ - $[GSSG-GSH]$ döngüsü ile glukozla tüketilen antioksidan kapasitenin yeteri kadar rejenere edilemediğini göstermektedir. Peroksinitritlerin oksidatif etkisini önlemesi beklenen GSNO, GSH (Rauhala ve diğerleri, 1998) ve nNOS aktivitesi ile sentezlenmesi beklenen NO, (Wen ve diğerleri, 2004) hem ilk 24 saatta nNOS aktivitesinin yeterli olmaması, hem de nöron başına düşen metabolik aktivitenin düşük olması nedeniyle yeteri kadar rejenere olamamaktadır. Sonuçta ilk 24 saattaki oksidatif stres yüksek glukozla maruz nöronlara nazaran daha fazladır. Ancak ikinci 24 saatta KynA ilavesi oksidatif streste birinci 24 saata nazaran %73,5 azalma meydana getirmektedir.

İkinci 24 saatta kontrol grubuna göre yüksek glukozla ortalama NO miktarında %149,3 artış, aşırı NMDA uyarısı ve buna bağlı nNOS aktivitesinde artma ile meydana gelmekte ve oksidatif stres %89,7 artmaktadır. Ortama KynA ilave edildiğinde hücrelerde ekstrasinaptik NMDA reseptör uyarısı bloke olur ve NO miktarı ortamda sadece glukoz bulunan hücrelere göre %61,1 azalır. Oksidatif stresin şiddeti ise %50 düşer. Hücre canlılığında artış %77,3'tür. Bu değer yüksek glukoz konsantrasyonu ile ikinci 24 saatta total metabolik aktivitenin kontrollara göre %45 azaldığı dikkate alınırsa, ortama KynA ilavesinin, SH-SY5Y hücrelerinin mitokondrial aktivitesini normal düzeye getirdiği söylenebilir. KynA, yüksek glukoz konsantrasyonuna maruz kalan dopaminerjik SH-SY5Y hücrelerinde, NMDA reseptör-GluN2B blokajı ile nNOS aktivitesini azaltır ve oksidatif stresi nöron membranındaki ekstrasinaptik reseptör seviyesinde engelleyerek mitokondrial disfonksiyonu azaltmaktadır (Bkz Şekil 5.1.).



Şekil 5.1. SH-SY5Y dopaminerjik nöron hücresinde yüksek glukoz maruziyet ile meydana gelen mitokondrial oksidatif stresin KynA ve L-NAME ile kontrolü (Kompleman 1q: C1q, Kompleman bileşenleri: C5b-9, Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz: NOX2, nNOS: nöronal nitrik oksit sentaz, N ω -nitro-L-arginin metil ester: L-NAME, NO: nitrik oksit, reaktif nitrojen radikalleri: RNS, reaktif oksijen radikalleri: ROS, kompleman düzenleyici protein “complement regulatory protein 59”: CD59, N-metil-d-aspartat reseptörü: NMDA-R, Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat: NADP⁺, indirgenmiş Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat: NADPH, okside glutatyon: GSSG, redükte glutatyon: GSH, Kinürenik asit: KynA)

İkinci 24 saatte glukoz+insülin ilave edilen ortamda oksidatif stresin şiddeti sadece glukoz bulunan ortamdaki hücrelere nazaran artmış ve KynA ilavesi ile ortalama total metabolik aktivite $22,95 \pm 1,04$ 'ten $103,9 \pm 6,49$ 'a yükselmiştir. Buna karşılık oksidatif stresin şiddeti azalmıştır. Glukoz+insülin bulunan ortama KynA ilavesi GLUT3 düzeyini ikinci 24 saatte artırırken, total mitokondrial metabolik aktivitenin normal glukoz konsantrasyonu bulunan ortamdaki hücrelerle aynı düzeye gelmesini sağlamıştır. Bu bulgular, yüksek glukoz toksisitesinin NMDA reseptör-GluN2B aracılı bir mekanizma ile meydana geldiğini göstermektedir (Bkz Şekil 2.2.). Ayrıca bu çalışmada NMDA reseptör-GluN2B'nin 30nM KynA ile blokajının, yüksek glukoz konsantrasyonunun ekstrasinaptik NMDA reseptör- ve

yüksek glukoz ve nNOS-aracılı oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir. Ancak Glukoz+ insülin'e KynA ilavesi GLUT3 miktarının ilk ve ikinci 24 saatlar arasındaki farkını %28,6 artırırken, bu iki grup arasında hem ilk hem de ikinci 24 saatta NO düzeyinde azalmanın aynı düzeyde olması, 30nM KynA'le nöron içine giren glukozun glikolizisten daha çok pentoz fosfat yolağında antioksidan kapasitenin rejenerasyonu için kullanıldığını ve oksidatif stresin %260,3 inhibe edildiğini göstermektedir.

Diyabet 21.yüzyılda halk sağlığını tehdit eden en büyük sorunlardan biridir. Bulgularımız yüksek glukozla bağlı dopaminerjik nöron hasarının azaltılmasında, triptofan metabolizmasının kinürenin yolağında endojen olarak meydana gelen NMDA reseptörünün kompetitif antagonisti ve toksisitesi az bir bileşik olan KynA'in dikkate alınması gereken seçenekler içinde olduğunu ortaya koymaktadır.

Kompleman düzenleyici protein CD59, C1q ile aynı lokalizasyonda bulunan C5b-9'un hücre membranında ekspresyonunu inhibe ederek nöron hasarını engeller. Mortalite riski taşıyan bir komplikasyon olan diyabetik ketoasidoziste nöronlarda CD59 ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir (Hoffman, Cudrici, Zafranskaia ve Rus, 2006). Kompleman aktivasyonu ve membran C1q-CD59 sistemi nöron canlılığı veya hasarında önemli rol oynar (Rus, Cudrici, David ve Niculescu, 2006). Adaptif bağışıklık elementlerinin santral sinir sistemine girişi kan-beyin bariyeri tarafından engellendiğinden özellikle nörodejeneratif olaylarda kompleman biyosentez ve aktivasyonu nöronlar için son derece önemlidir (Francis, Van Beek, Canova, Neal ve Gasque, 2003).

C1q klasik kompleman yolağının ilk komponenti olduğu gibi, apoptotik hücrelerin tanınması ve fagosite edilmesinde de önemlidir. C1q erken apoptotik hücrelerden daha geç apoptotik hücrelere bağlanır (Fraser, Laust, Nelson ve Tenner, 2009). C1q bulunmayan nöron mitokondrilerinin, C1q eksprese edenlere nazaran son derece az miktarda ROS ürettikleri gösterilmiştir. C1q ile mitokondrial oksidatif stresin düzenlenme mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, C1q'nun, mitokondrial kaynaklı oksidatif streste önemli bir aracı olduğu düşünülmektedir (Bkz Şekil 5.1.) (Ten ve diğerleri, 2010).

C1q, C1r ve C1s olmak üzere 3 glikoproteinden meydana gelen C1 ile IgG kompleksi arasındaki bağlanma yeri C1q-IgG'nin Fc bölgesinde bulunur (Marqués ve diğerleri, 1993; Reid, 1989). Nöronlar, beyinde astrosit ve mikroglialarla birlikte, önemli bir yerel kompleman kaynağıdır. İnsan nöroblastoma hücre hatları ise insan nöronlarının kompleman biyosentezinin araştırılmasında yaygın bir model olarak kullanılmaktadır (Thomas, Gasque, Vaudry, Gonzalez ve Fontaine, 2000). Yapılan çalışmalar SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinin C1-inhibitör, C1q, C5, C6, C7 ve C9 ile C4, C9 ve C1q aktivatör proteinlerini eksprese ettikleri gösterilmiştir (Thomas ve diğerleri, 2000). Ancak SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde yüksek glukoz maruziyetinde, C1q ve kompleman yolağının oksidatif stresle ilişkisi konusunda bir veriye ulaşılamamıştır.

Bizim çalışmamızda öncelikle IDF ölçütlerine göre yüksek glukoz maruz bulunan SH-SY5Y hücrelerinde NMDA reseptörü ve nNOS aktivasyonu ile meydana gelen oksidatif stres koşulları tartışılmıştır.

Çalışmamızın sonraki bölümünde SH-SY5Y hücre hattı tarafından üretilen NO, oksidatif stres, C1q ve kompleman düzenleyici protein CD59'un total metabolik aktivite ve hücre canlılığına etkisi araştırılmıştır.

Nöronlar tarafından C1q sentezinin uyarılması nöron hasarına erken bir cevaptır. Nöronal C1q üretiminin hücre canlılığını nasıl etkilediği bilinmemektedir. Nöronlar C1q'yu sentez ve sekrete ederler, daha sonraki aşamada ölü hücrelerin fagositozu ve kompleman aktivasyonu dışında ortamdaki C1q ile canlı nöronlar arasındaki etkileşim mekanizması açık değildir (Fan ve Tenner, 2005). Bizim çalışmamızda ortamda hücre başına sentez edilen C1q düzeyi ölçülmüş ve yüksek glukoz konsantrasyonuna maruz kalan SH-SY5Y dopaminerjik hücrelerde C1q ile oksidatif stres, NO sentezi ve total mitokondrial aktivite-hücre canlılığı arasındaki ilişki tartışılmıştır.

Ortama yüksek konsantrasyonda glukoz ilave edildiğinde ilk 24 saatte total metabolik aktivite ve hücre canlılığında kontrollara ve ikinci 24 saate göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana gelmiştir ($p<0,05$). Bu sırada C1q ve NO değerleri uyumlu biçimde kontrollara göre artarken ($p<0,05$), oksidatif stresin azaldığı gözlenmiştir.

$[(NO_3+NO_2)/Cc]/C1q/Med/Cc$ oranlarının ilk ve ikinci 24 saatlarda istatistiksel olarak farklı olmaması C1q ve NO'nun doğru orantılı olarak değiştiğini göstermektedir. Nitekim SH-SY5Y hücreleri tarafından sentezlenen C1q düzeyi ilk 24 saata göre, ikinci 24 saatta 1,5 kat artarken NO sentezi 1,35 kat artmıştır. Buna karşılık total mitokondrial metabolik aktivite/hücre canlılığı ikinci 24 saatta ilk 24 saata göre 2,2 kat azalır ($p<0,05$). Hücre canlılığı ile ters orantılı olarak, oksidatif stres ise 2,2 kat artmıştır. Ortama yüksek konsantrasyonda glukoz ilave edilmesi C1q ve NO düzeyini birlikte artırırken, hücre canlılığı oksidatif stresle ters orantılı olarak azalır. C1q, NO serbestleşmesini ve ROS'nin üretimini artırmaktadır. Farber ve diğerleri (2009) C1q'nun Ca^{2+} sinyal iletimi ile ilişkili reseptörleri aktive ettiğini ileri sürmüşlerdir (Farber ve diğerleri, 2009). C1q eksikliği bulunan deneklerde nöron kaybının daha yavaş olduğu ve C1q'nun nöron hasarını artırıcı etkisi bulunduğu anlaşılmıştır (Fonseca, Zhou, Botto ve Tenner, 2004). C1q ve NO, oksidatif stresten önce artar. Benoit ve diğerleri (2013) santral sinir sisteminde tehlike sinyali karşısında C1q sentezinin diğer kompleman komponentleri ile koordine olmadığını ve hepsinden daha önce artmaya başladığını göstermişlerdir (Benoit ve diğerleri, 2013).

Ortama sadece glukoz ilavesi ile ilk 24 saatta ölçülen ortalama C1q ve NO düzeyleri, ortama glukoz+KynA ilave edildikten sonra istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir ($p<0,05$). Ortama glukoz+ 30nM KynA ilave edildikten sonra ikinci 24 saatta SH-SY5Y hücrelerinin C1q ve NO düzeyleri ortamda sadece glukozla maruz bulunan hücrelere göre 2,5 kat azalmıştır ($p<0,05$). SH-SY5Y hücrelerinin NO üretimlerinin C1q düzeylerindeki değişikliklerle birlikte aynı oranda değişim göstermesi; NO düzeylerinin C1q ile doğrudan ilişkili olduğunu ve NO konsantrasyonundaki değişiklikleri kompleman sistemine yansıdığını ortaya koymaktadır. Sadece yüksek glukozla maruz kalan dopaminerjik nöronlarda ikinci 24 saatta canlılık oranı, ortama KynA ilave edildikten sonraki ikinci 24 saatta %77,45 artmıştır. Bu sırada C1q, %60 azalmıştır. Bu bulgularımız Ten ve diğerleri (2010), ile Fonseca ve diğerlerinin (2004) sonuçlarını desteklemektedir (Ten ve diğerleri, 2010; Fonseca ve diğerleri, 2004). Tüm glukoz konsantrasyonlarında C1q düzeylerinin, kontrol grubunda, ortama sadece yüksek konsantrasyonda glukoz ve glukoz+KynA ilave edilen hücrelerde ikinci 24 saatta eşzamanlı NO miktarlarındaki artışla doğru orantılı olarak arttığı tespit edilmiştir. Ortama glukoz+insülin, glukoz+insülin+KynA ve glukoz+insülin+L-NAME ilave edilen hücrelerde NO miktarlarındaki azalma ile doğru

orantılı olarak azalır. En fazla azalma, ortama glukoz+insülin+L-NAME ilave edilen grupta görülmüştür ($p<0.05$). Sadece glukoz+L-NAME grubunda bu algoritm bozulmuş, ikinci 24 saatta NO sentezi baskılandığından, C1q düzeylerindeki artış, NO ile ters orantılıdır.

1. Kontrol grubundaki SH-SY5Y hücrelerinde C1q sentezi ikinci 24 saatta, ilk 24 saata göre NO (%20) ile doğru orantılı, oksidatif stresle ters orantılı artar (%15,9 artar).
2. Ortama yüksek konsantrasyonda glukoz ilavesi ile C1q düzeyi ikinci 24 saatta, ilk 24 saata göre NO sentezi (%42,6) ve oksidatif stresle ile doğru orantılı artar (%46 artar).
3. Ortama yüksek konsantrasyonda glukoz+40 μ U/ml insülin ilave edildiğinde, C1q düzeyi ikinci 24 saatta, ilk 24 saata göre NO sentezi (%19,1) ile doğru orantılı ve oksidatif stresle ters orantılı olarak azalır (%19,8 azalır).
4. Ortama yüksek konsantrasyonda glukoz, 40 μ U/ml insülin ilave edilmesi ile ikinci 24 saatta belirgin insülin direnci meydana gelir ve oksidatif stres %209 artar. Bu sırada sadece glukoz maruz kalan nöronlara nazaran, SH-SY5Y hücrelerinin C1q sentezi %63,6 azalır, NO sentezi ise %58,2 azalır.
5. Ortama yüksek konsantrasyonda glukoz+30nM KynA ilave edildiğinde, C1q düzeyi ikinci 24 saatta, ilk 24 saata göre NO sentezi (%5,23) ile doğru orantılı, oksidatif stresle ters orantılı olarak artar (%14,4 artar).
6. Ortama yüksek konsantrasyonda glukoz+25 μ M L-NAME ilave edildiğinde, C1q düzeyi ikinci 24 saatta, ilk 24 saata göre hem NO sentezi (%7,9) ile hem de oksidatif stresle ters orantılı olarak artar (%19,4 artar).
7. Ortama yüksek konsantrasyonda glukoz+30 nM KynA+40 μ U/ml insülin ilave edildiğinde, C1q düzeyi ikinci 24 saatta, ilk 24 saata göre NO sentezi (%10,3) ve oksidatif stresle ile doğru orantılı olarak azalır (%9,84 azalır).
8. Ortama yüksek konsantrasyonda glukoz+25 μ M L-NAME +40 μ U/ml insülin ilave edildiğinde, C1q düzeyi ikinci 24 saatta, ilk 24 saata göre NO sentezi (%49,6) ve oksidatif stresle ile doğru orantılı olarak azalır (%42,8 azalır) (Bkz Çizelge 4.4., Çizelge 4.14., Çizelge 4.15., Çizelge 4.16., Çizelge 4.17.).

KynA, oksidatif stresi ve hücre canlılığını kontrol eder. Ortamda yüksek glukoz+KynA bulunan SH-SY5Y hücrelerinde, sadece yüksek glukoz maruz bulunanlara göre hem C1q, hem de NO sentezinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana gelir ($p<0,05$).

NMDA reseptör blokajı veya nNOS blokajı ile birlikte ortama insülin ilavesi ilk 24 saata nazaran ikinci 24 saatta NO sentezini azaltmaktadır. L-NAME ile hem C1q, hem de NO sentezinde meydana gelen azalma daha belirgindir ($p<0,05$). Glukoz+L-NAME ile NO'de %7,9 azalma olurken C1q %19,4 artar. Yüksek glukozla meydana gelen NMDA reseptör-aracılı uyarı, klasik kompleman yolağında öncelikle C1q düzeylerini, sonra da NO sentezini etkilemektedir. Esasen nöronlarda C1q'nun uyarılması ile hangi reseptörün ilgili olduğu bilinmemektedir (Fan ve Tenner, 2005). Yüksek glukoz konsantrasyonu ile uyarılan mitokondrial oksidatif stresin KynA'le anlamlı biçimde azaltılması ve C1q düzeylerinin, NO değerlerinden önce artması ve sonra NO ile birlikte düşmesi ($p<0,05$), SH-SY5Y insan dopaminerjik hücre hattında glukotoksisitenin, NMDA reseptör üzerinden klasik kompleman yolağını ve MAC oluşumunu etkilediğini düşündürmektedir.

Aslında klasik kompleman yolağının aktivasyonu, klasik yolağın tanımlama molekülü olan C1q'nun immün kompleks gibi bir hedefe bağlanması ile başlamaktadır (Bkz Şekil 5.1.). C1q'nun santral sinir sisteminde mikroglia aktivasyonunda da güvenilir bir belirteç olduğu ve mikroglia kaynaklı NO salınımını ve oksidatif stresi uyardığı bildirilmektedir (Färber ve diğerleri, 2009). Ancak C1q'nun nöronlarda sentez, sekresyon, reseptörleri ve fonksiyonu konusundaki bilgiler son derece kısıtlıdır. Ten ve diğerleri (2010) C1q'nun, nöron hücresinde terminal kompleman aktivasyonundan daha önce mitokondrial oksidatif strete etkili olduğunu göstermişlerdir (Ten ve diğerleri, 2010).

Bizim çalışmamızda ortama glukoz+KynA ilavesi ile ortaya çıkan C1q-NO ilişkisinin kanıtlanması için ortama yüksek glukoz+L-NAME ilave edilerek SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde ikinci 24 saatta C1q, oksidatif stres ve NO düzeyleri incelenmiştir. Yüksek glukoz konsantrasyonuna maruz bulunan SH-SY5Y hücrelerinde L-NAME ile ikinci 24 saatta C1q %66,2 azalırken, NO sentezi %57,2 azalır ve oksidatif strete %37,8 azalma meydana gelir. L-NAME ile ikinci 24 saatta C1q'da azalmanın NO ve oksidatif streteki azalma ile pozitif korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir.

Klasik kompleman yolak aktivasyonu immünoglobulinin Fc bölgesine kompleman kaskadının ilk faktörü olan C1q'nun bağlanması ile başlar. Proteolitik olayların başlaması ile C5'i C5b ve C5a parçalayan konvertaz aktivasyonu olur. Daha sonra C5b-8 kompleks

meydana gelir ve buna C9'un bağlanması ile C5b-9, MAC oluşur. Bu komplekste C9 sayısı arttıkça por genişlikleri artar ve kontrol edilemeyen iyon girişi ile hücreler şişer ve lizise gider. Endojen kompleman inhibitörleri kompleman sisteminin aktivitesini sınırlayarak kompleman-aracılı nöron hasarını önler (Shen ve diğerleri, 1997). SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinin MAC oluşumu için gerekli proteinleri sentezlediği gösterilmiştir. CD59 eksikliği olduğunda nöronların kompleman-aracılı sitotoksositeye duyarlılığı artar (Shen ve diğerleri, 1998). Bizim çalışmamızda, kontrol, ortamda yüksek glukoz, yüksek glukoz+insülin, yüksek glukoz+KynA, yüksek glukoz+insülin+KynA ve yüksek glukoz+L-NAME'e maruz bulunan SH-SY5Y hücrelerinde CD59 sentezi ikinci 24 saatta ilk 24 saata oranla artmıştır. Yani SH-SY5Y hücreleri yüksek glukoz uyarısına CD59 cevabı vermektedir. CD59, bir terminal kompleman yolak inhibitörü olup plazma membranında MAC'in oluştuğu yere bağlanarak terminal hücre hasarını önler (Zhang, Yu, Bajwa, Morrison ve Tomlinson, 1999). Ortama yüksek glukoz+insülin+L-NAME ilave edildiğinde SH-SY5Y hücrelerinin ortalama C1q sentez düzeyi ikinci 24 saatta sadece yüksek glukoz maruz kalan nöronlara göre %68,6 azalırken, CD59 düzeyi %69 azalmıştır. Oksidatif strese %50 azalmaya karşı total mitokondrial metabolik aktivitede artış %80,9'dur (Bkz Çizelge 4.15., Çizelge 4.17.). Aslında nöronlarda CD59 ekspresyonunun düşük düzeyde olması nedeniyle kompleman aktivasyonunu kontrol kapasitesi sınırlıdır (Singh Rao, Neal, Rushmere, Morgan ve Gasque, 1999). Bu durum nöronları, kompleman aktivasyonu ile MAC-aracılı hasara duyarlı hale getirir (Singh Rao, Neal, Rushmere, Morgan ve Gasque, 2000). Yüksek glukoz+insülin+L-NAME'e maruz bulunan hücrelerde ilk ve ikinci 24 saat içinde CD59, C1q ve NO düzeyleri, oksidatif stresle birlikte azalmıştır. Oksidatif stresin %2,7 azalmasına rağmen yüksek glukoz+insülin+KynA grubundaki hücrelerde CD59 üretimi yüksekliğini muhafaza eder. Ancak yüksek glukoz+insülin+L-NAME ve yüksek glukoz+insülin+KynA grupları arasında SH-SY5Y hücrelerinin canlılık oranlarında hem ilk 24 saatta hem de ikinci 24 saatta istatistiksel bakımından bir fark yoktur.

Oksidatif stresin şiddetinin en yüksek olduğu, yüksek glukoz ve yüksek glukoz+40µU/ml insüline maruz bulunan SH-SY5Y hücrelerinde oksidatif stresin şiddetinin CD59 ve C1q düzeylerini etkilediği gözlenmiştir. Ortamda sadece yüksek glukoz maruz bulunan hücrelerin ilk ve ikinci 24 saatta ürettikleri NO, C1q ve CD59 düzeyleri diğer gruplardaki hücrelerin ilk ve ikinci 24 saatta ürettikleri NO, C1q ve CD59 düzeyleri ile

karşılaştırıldığında yüksek glukozun NMDA reseptör uyarısının kompleman sistemine yansıdığı görülmektedir. Elde edilen sonuçlar C1q-CD59 ilişkisinin NO ekspresyonu üzerinden karşılıklı bir denge içinde olduğunu ortaya koymaktadır. Bizim çalışmamızda kompleman düzenleyici protein CD59 cevabının ve kompleman aktivatörü C1q değişikliklerinin, NMDA reseptör uyarısı ile üretilen NO'le ilişkili olduğu gösterilmiştir. SH-SY5Y hücrelerinin CD59 cevabı, kompleman aracılı sitotoksositeye duyarlılığı kontrol etmektedir (Bkz Çizelge 4.11., Çizelge 4.12., Çizelge 4.15., Çizelge 4.17.).

Glukoz+insüline maruz bulunan hücreler, sadece yüksek glukozu maruz bulunan SH-SY5Y hücreleri ile karşılaştırıldığında, oksidatif stres ikinci 24 saatte %209 artmıştır. Total metabolik aktivitenin ve hücre canlılığının %58,2 azalmasına karşın CD59 %67, C1q %63,6 düşmüştür. Glukoz+KynA'e maruz bulunan hücrelerde ikinci 24 saatte oksidatif stresin sadece glukozu maruz kalanlara göre %50 azalmasına karşın total metabolik aktivite ve hücre canlılığı %77,4 artmıştır. NO'nin %61,1 azalması sonucu, NO'le bağlantılı olarak CD59 %55,5, C1q ise %60 azalmıştır. Ortama glukoz+L-NAME ilavesi ile ikinci 24 saatte oksidatif stres %37,8 azalmış, total metabolik aktivite ve hücre canlılığı %79,9 artarken, CD59 ve C1q %62,2 azalmıştır. CD59 ve C1q daki azalma NO üretimindeki azalma ile uyumludur.

İnsan hücreleri normal koşullarda birçok membran-ilişkili kompleman inhibitörleri ile kompleman aktivasyonunun sonuçlarından korunur (Liszewski, Farries, Lublin, Rooney ve Atkinson, 1996). Bunlardan CD59, bir terminal kompleman yolak inhibitörü olup plazma membranında MAC'in olduğu yere bağlanarak terminal hücre hasarını önler (Zhang ve diğerleri, 1999). Hücrenin kendi membranında kompleman aktivasyonunu CD59'la etkin biçimde sınırlaması hücre dış yüzeyine CD59'u bağlayan glikozil fosfatidil inozitolün fokal MAC oluşumu bulunan bölgeye membran lipid tabakası arasında lateral hareketle ulaşması ile mümkün olur (Qin ve diğerleri, 2009).

CD59'un diyabette kompleman düzenleyici fonsiyonunun azaldığı gösterilmiştir. Bu durum, CD59 molekülünün glikasyonu sonucu fonksiyonel olarak inaktif glikolize CD59 meydana gelmesinden kaynaklanır (Acosta ve diğerleri, 2000; Davies, Harris ve Morgan, 2005). CD59, kompleman sisteminin aktivasyonundan sonra nöronu otolog hücre hasarından korur (Stahel, Morganti-Kossmann ve Kossmann, 1998; Singhrao ve diğerleri,

1999). Nöronal CD59 ekspresyonunun düşük düzeyde olması nedeniyle kompleman aktivasyonunun kontrol kapasitesi sınırlıdır (Singhrao ve diğerleri, 1999). Bu durum nöronları, kompleman aktivasyonu ve MAC-aracılı hasara duyarlı hale getirir (Singhrao ve diğerleri, 2000; Mead, Singhrao, Neal, Lassmann ve Morgan, 2002; Cole, Hughes, Gasque ve Morgan, 2006). SH-SY5Y hücrelerinde CD59'un eksprese edilebilmesi, nöronun hasardan korunmasında bu proteinin kompleman aktivasyonunu düzenlemesinin etkili olduğunu göstermektedir (Vedeler ve diğerleri, 1994). Yüksek glukoz maruziyet, nöronları kompleman aktivasyonu ve MAC oluşumuna daha duyarlı hale getirmektedir (Accardo-Palumbo ve diğerleri, 2000). CD59 sadece MAC oluşumunu engellemekle kalmaz aynı zamanda yeniden meydana gelecek MAC'leri de bloke eder (Farkas ve diğerleri, 2002). CD59'un glukoz maruziyeti giderek aktivitesini azaltır (Acosta ve diğerleri, 2000). SH-SY5Y dopaminerjik hücrelerin yüksek glukoz konsantrasyonu karşısında oksidatif stresin şiddeti ikinci 24 saatte, ilk 24 saate göre %117,6 artmış, CD59'da %136,6, C1q'da ise %46 artış meydana gelmiştir. Oksidatif stresteki artışın, C1q ve CD59 düzeylerini ciddi biçimde etkilemesinin yanında hücrelerin ortalama total metabolik aktivitesi $119,16 \pm 5,2$ 'den %54,8'e düşmüştür. CD59 düzeyindeki artmanın hücre canlılığını etkilemediği gözlenmiştir. Ortama insülin ilavesi ikinci 24 saatte ilk 24 saate göre, oksidatif stresin şiddetini %377 artırdığında, CD59 ve C1q'da daha fazla artış beklenirken; CD59'daki artış %8,3'e düşmüş, C1q düzeyi ise ilk 24 saatteki değerin %19,8 altına düşmüştür. Bu sonuçlar, insülin direncine bağlı aşırı oksidatif stresin protein glikasyonuna sebep olarak CD59 ve C1q azalttığını göstermektedir. Bu grupta ortalama total mitokondrial metabolik aktivite/hücre canlılığı ilk 24 saatteki düzeyinden 3,7 kat azalarak $22,95 \pm 1,04$ 'e düşmüştür. Yani insülin direncinin önemli bulgularından biri olan belirgin mitokondrial disfonksiyon ortaya çıkmıştır. Glukoz+KynA'e maruz bulunan hücrelerde oksidatif stresin ilk 24 saatteki değerin %11,9 altına düşmesi, CD59 ve C1q değerlerini kontrol grubu değerlerine yaklaştırmıştır (Bkz Çizelge 4.4., Çizelge 4.14., Çizelge 4.16.).

NMDA reseptör-aracılı mitokondrial oksidatif stres, C1q(+) nöronlarda terminal klasik kompleman yolağını aktive eder, ancak MAC oluşumunu inhibe eden CD59 oksidatif stresin şiddeti ile orantılı biçimde artarak nöron koruyucu etki meydana getirir. İnsan nöroblastoma hücreleri yüksek glukoz konsantrasyonu karşısında MAC oluşumu için tüm gerekli proteinleri sentezler (Thomas ve diğerleri, 2000), ancak CD59'da artma, MAC

oluşumunu engeller ve nöronu oksidatif strese karşı korur. SH-SY5Y hücreleri tarafından üretilen optimal konsantrasyonda NO'nun, CD59'un nöron koruyucu fonksiyonu üzerinde etkisi olup olmadığını ve NO ile kompleman aktivasyonu arasında doğrudan bir ilişki bulunup bulunmadığını saptamak için ortama L-NAME ilave edildi. İlk 24 saatte ortalama $Q(\text{Glukoz}+\text{L-NAME})=0,65\pm0,03$, $\text{CD59}=0,109\pm0,001$ ng/ml/hücre sayısı ve $\text{C1q}=0,0129\pm0,0002$ ng/ml/hücre sayısı'dır. Yüksek glukoz konsantrasyonu ile yapılan çalışmalar bizim çalışmamızda da olduğu gibi L-NAME'in ancak ikinci 24 saatte inhibitör etkisinin olduğunu göstermiştir. Nitekim 25µM L-NAME ile ikinci 24 saatte, birinci 24 saate nazaran oksidatif stresin şiddeti %27,7 azalırken, CD59 %22,9, C1q ise %19,4 artmıştır. Yani oksidatif stres CD59 ve C1q'yu azaltmakta, oksidatif stres azalınca CD59 ve C1q yükselmektedir (Bkz Çizelge 4.4., Çizelge 4.14., Çizelge 4.16.).

Ortamda sadece glukoz bulunan SH-SY5Y hücrelerinin ikinci 24 saatteki değerleri ile Glukoz+L-NAME'e maruz bulunan hücrelerin değerleri karşılaştırıldığında; oksidatif stresin şiddetinin L-NAME ilave edilen grupta %37,8 azalması ile CD59'un %62,2, C1q'nun ise %66,2 azaldığı görülmüştür. Buna karşılık hücre canlılığı % 79,9 artmıştır (Bkz Çizelge 4.15., Çizelge 4.17.). Bu sonuçlar glukozla NMDA reseptör-aracılı olarak meydana gelen RNS'ne dayalı oksidatif streste SH-SY5Y hücreleri tarafından eksprese edilen C1q'nun doğrudan katkısı olduğunu düşündürmektedir (Färber ve diğerleri, 2009).

Yüksek glukoz konsantrasyonuna maruz kalan SH-SY5Y hücrelerinde ilk 24 saate nazaran ikinci 24 saatte NO %42,6, oksidatif stres ise %117,6 artmıştır. Oksidatif stresin yüksek olduğu ortamda C1q'daki %46 artmaya karşı, CD59'da %136,6 artma görülmesi, hücre canlılığında ilk 24 saate göre ikinci 24 saatte %53,9 azalmanın sonucudur. Buna bağlı olarak C1q'nun ortamdaki oksidatif stresin sensörü olarak davrandığı, CD59 düzeylerindeki değişikliğin ise canlı hücreler tarafından sağlandığı düşünülmektedir. Nitekim, ortama glukoz+insülin ilave edildiğinde ikinci 24 saatte ilk 24 saate göre oksidatif stres %377 artarken NO ilk 24 saatteki değerinin %19,1 altına düşmüştür. Böyle yüksek seviyede ve NO azalmasına sebep olan oksidatif stres karşısında protein glikasyonu başlamış ve C1q ve CD59 büyük ölçüde azalmıştır. Ortama glukoz+KynA ilave edildiğinde ikinci 24 saatte oksidatif stresin şiddeti ilk 24 saate göre azalırken CD59 ve C1q

düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı artma meydana gelmiştir (Bkz Çizelge 4.4., Çizelge 4.14., Çizelge 4.16).

Ortama glukoz+L-NAME ilave edildiğinde ikinci 24 saatte oksidatif stresin şiddeti ilk 24 saata göre %27,7 azalırken NO %8,3 azalma göstermiş, buna karşılık CD59'da %22,9, C1q'da ise %19,4 artma meydana gelmiştir. Bu sonuç, L-NAME ile nNOS inhibisyonuna bağlı NO sentezinde azalmaya bağlanmıştır. Ortama glukozu KynA veya L-NAME ilavesi ile ortaya çıkan bifazik oksidatif stres cevabı C1q ve CD59'da yine bifazik fakat ters orantılı bir değişiklik meydana getirmektedir.

Ortama glukoz+KynA veya Glukoz+L-NAME ile birlikte insülin ilave edildiğinde ikinci 24 saat ilk 24 saatla karşılaştırıldığında önce artan, sonra azalan bifazik oksidatif stres cevabı gözlenmiştir. Oksidatif stres 5 kat azalırken C1q ve NO yaklaşık 4,5 kat azalmaktadır (Bkz Çizelge 4.4., Çizelge 4.14., Çizelge 4.16.).

Sonuç olarak; ortamda yüksek konsantrasyonda glukoz bulunduğunda C1q düzeyi, NO sentezi ve oksidatif stresin artması ile birlikte artmaktadır. Yüksek glukoz bulunan ortama 30nM KynA ilave edildiğinde oksidatif stresin azalması ile birlikte SH-SY5Y nöronların C1q sentezi, yüksek glukozu maruz kalan nöronlara nazaran ilk 24 saatte %49, ikinci 24 saatte %60 azalmıştır. Bu esnada CD59 düzeyi, yüksek glukozu maruz kalan nöronlara nazaran KynA'le ilk 24 saatte %45,3 azalmakta, ikinci 24 saatte azalma ise %55,5'i bulmaktadır.

Glukoz+40µU/ml insüline maruz kalan dopaminerjik nöronlarda insülin direnci gelişir ve oksidatif stres 3 kat artar. Ortama KynA ilavesi nöronlardaki oksidatif stresi normal düzeylere indirirken azalmış olan CD59 düzeyi artar, C1q ise kontrollerle aynı düzeye gelir. Hücre canlılık oranları ise %22,9'dan %103,9'a çıkar. KynA, Trp'ın metabolize edildiği Kyn yolağının temel ürünlerinden biri olup nöron koruyucudur. KynA'nın bu etkisi nanomolar konsantrasyonlarda NMDA reseptör antagonisti olmasına bağlanmaktadır (Klein ve diğerleri, 2013). Bu çalışmada elde edilen bulgular, yüksek glukozun nörotoksik etkisinin NMDA reseptör-aracılı olduğunu ve KynA'nın NMDA reseptör bloke edici etkisinin yüksek glukozu bağlı dopaminerjik nöron hasarını önemli oranda engellediğini göstermektedir. KynA, glukoz toksisitesinde klasik kompleman aktivasyon yolağının primer komponenti

olan C1q düzeyini %60'a kadar azalttığı gibi kompleman düzenleyici protein CD59 ile C1q etkileşimini de olumlu yönde etkilemektedir. Mortalite riski taşıyan bir komplikasyon olan diyabetik ketoasidoziste nöronlarda CD59 ekspresyonunun azaldığı (Hoffman ve diğerleri, 2006) dikkate alınırsa, nöronların yüksek glukoz maruziyeti esnasında KynA'nın C1q düzeyini azaltması ve CD59 miktarını normal düzeyde korumasının dopaminerjik nöron hasarının önlenmesinde önemli olduğunu düşündürmektedir. Literatürde KynA-C1q ve CD59 ilişkisi bakımından bir bilgiye ulaşılamamıştır.

RNS'nin meydana getirdiği oksidatif stresin NMDA reseptörünün blokajı ya da nNOS'un L-NAME ile inhibisyonu ile azaltılmasının, hem mitokondrial disfonksiyon hem de kompleman aktivasyonu bakımından çok farklı olmadığı düşünülmektedir. Ancak, yüksek glukoz konsantrasyonuna maruz kalan nöronlarda oksidatif stresin KynA ile azaltılması birinci hücre siklusunda başlarken, L-NAME ancak ikinci hücre siklusunda etkili olabilmektedir. İnsülin direncine bağlı oksidatif stres ilk 24 saatte KynA'le %22,9 azalır, L-NAME ile %10,4 azalır. İnsülin direncinin önemli bir komponenti olan mitokondrial disfonksiyon ilk 24 saatte KynA'le %23, L-NAME ile %15,4 düzeltilirken, ikinci 24 saatte KynA'nın mitokondrial disfonksiyonu düzeltme oranı %352,7, L-NAME'in %332,6 olarak bulunmuştur. Bu bulgular, yüksek glukoz konsantrasyonuna maruz nöronlarda KynA'nın önemli koruyucu özellikleri olduğunu ortaya koymaktadır.

Ancak bu çalışmanın sonuçları, KynA'nın yüksek glukozla bağlı dopaminerjik nöron hasarının önlenmesinde hem kompleman-aracılı, hem de NMDA reseptör-aracılı bifazik dual bir mekanizma ile etkili olduğunu göstermiştir. Bu mekanizmanın yüksek glukozla birlikte gelişen ilerleyici nöron hasarında gündeme gelebilmesi için KynA ve analoglarının in-vivo etkisini araştıran daha ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yüksek glukoz konsantrasyonuna maruz kalan SH-SY5Y dopaminerjik nöronlarda ikinci hücre döngüsünde hücre canlılığında azalma, oksidatif stres ve mitokondrial fonksiyon kaybında artma ile birlikte dir. Ortamdaki hücreler tarafından üretilen NO'in meydana getirdiğı oksidatif stresin şiddetini, hücre başına üretilen NO'in hücrelerde [NADPH+-NADP+]-[GSSG-GSH] döngüsünün fonksiyonu olan MTT/Cc'ye oranı belirler. Yüksek konsantrasyonda glukoz ortalama GLUT3 düzeyini kontrollara oranla 2 kat artırır. Yüksek glukoz konsantrasyonuna bağı NMDA reseptör aktivasyonu sonucu NO sentezinde meydana gelen %149,3 artış ve NO-aracılı GLUT3 membran translokasyonu nöron içine glukoz transportunda önemli bir mekanizmadır. Tek başına oksidatif stresin orta derecede artması, GLUT3'ün membran translokasyonunu etkilememektedir. Yüksek glukoz maruz bulunan dopaminerjik hücrelerde GLUT3 düzeyinin artması ile nöron içine glukoz transportunun ve glikolizisin hızlanması SH-SY5Y hücrelerinde antioksidan kapasiteyi tüketir. Oksidatif stres artarken total metabolik aktivite ve hücre canlılık oranları azalır. Yüksek konsantrasyonda glukoz bulunan ortama 40 µU/ml insülin ilavesi, SH-SY5Y hücrelerinde NO sentezini %60,5 azaltırken, membran depolarizasyonu yaparak, GLUT3'ün membran translokasyonu ve füzyonunu %61 oranında azaltır. Nöron içine glukoz transportunun azalması ile antioksidan kapasite rejenere edilemez ve mitokondrial oksidatif stres %209 artar. Mitokondrial metabolik aktivite %58,2 azalır ve insülin direnci meydana gelir. Yüksek glukoz+insülin'e KynA ilave edildiğinde mitokondrial oksidatif stres ilk 24 saatte %32,2, ikinci 24 saatte %260,3 azalır, buna karşılık hücre canlılığı ilk 24 saatte %17,5 artar, ikinci 24 saatte ise %22,95±1,04'ten 103,9±6,49'a çıkarak %147,5 artar. Ortama KynA ilavesi ile insülin direnci ve dopaminerjik nöron hasarı ortadan kalkar. Yüksek glukoz konsantrasyonu ile NMDA reseptörü aktive olduğunda NO ve ROS/RNS üretimi aynı sinyal iletim yolağını kullanır. Ortama KynA ilave edilmesi ile meydana gelen NMDA reseptör blokajı NO üretimini azaltırken aynı lokalizasyondan kaynaklanan oksidatif stresi engeller. Yüksek konsantrasyonda glukoz bulunan ortama NMDA reseptör GluN2B blokajı yapan 30nM KynA ilavesi, GLUT3 düzeyi aracılığı ile glukoz transportu ve oksidatif stresi kontrol altına alarak total mitokondrial metabolik aktiviteyi ve hücre canlılığını normal düzeye getirir. KynA, yüksek glukoz konsantrasyonuna maruz kalan dopaminerjik SH-SY5Y hücrelerinde, NMDA reseptör-GluN2B blokajı ile nNOS aktivitesini azaltır ve

oksidatif stresi nöron membranındaki ekstrasinaptik reseptör seviyesinde engelleyerek mitokondrial disfonksiyonu azaltır. KynA'le NMDA reseptör blokajı, nöron içine aşırı glukoz girişini engeller ve NO üretimini %61,1 azalırken, alınan glukozun bir bölümü antioksidan kapasitenin rejenerasyonunda kullanılır ve oksidatif stres engellenir. Ortama yüksek konsantrasyonda glukoz ilave edilmesi C1q ve NO düzeyini birlikte artırır. C1q, NO serbestleşmesini ve ROS'nin üretimini artırarak nöron hasarına yol açar. Total mitokondrial metabolik aktivite-hücre canlılığı oksidatif stresle ters orantılı olarak azalır. Glukozla NMDA reseptör-aracılı olarak meydana gelen RNS'ne dayalı oksidatif streste, SH-SY5Y hücreleri tarafından eksprese edilen C1q'nun doğrudan katkısı olduğu düşünülmektedir. NO konsantrasyonundaki değişiklikler kompleman sistemine yansır. Yüksek glukoz konsantrasyonu ile uyarılan mitokondrial oksidatif stresin KynA'le anlamlı biçimde azaltılması ve C1q düzeylerinin, NO değerlerinden önce artması ve sonra NO ile birlikte düşmesi, SH-SY5Y insan dopaminerjik hücre hattında glukotoksisitenin, NMDA reseptörü üzerinden klasik kompleman yolağını ve MAC oluşumunu etkilediğini düşündürmektedir. Yüksek glukoz uyarısı ile SH-SY5Y hücrelerinde CD59 sentezini artır. C1q-CD59 ilişkisi NO ekspresyonu üzerinden karşılıklı bir denge içindedir. C1q'nun oksidatif streste bir sensör olabileceği düşünülmektedir. CD59 düzeyleri NO düzeyi ve oksidatif stresin şiddetine göre değişmektedir. Yüksek konsantrasyonda glukoz bulunan ortama 40µU/ml insülin ilavesi ile meydana gelen insülin direnci ve aşırı oksidatif stres protein glikasyonuna sebep olarak CD59 ve C1q düzeylerini azaltır. Ortalama total metabolik aktivite ve hücre canlılığı ise ilk 24 saattaki düzeyine nazaran 3,7 kat azalır. Yüksek glukoz konsantrasyonuna maruz bulunan SH-SY5Y hücrelerinde ortama L-NAME ilavesi ikinci hücre siklusunda NO sentezinde %57,2 azalma meydana getirirken C1q sentezi %66,2, oksidatif stres ise %37,8 azalır. C1q'da azalma, NO ve oksidatif stresteki azalma ile pozitif korelasyon gösterir. Ortama glukozla KynA veya L-NAME ilavesi ile gözlenen bifazik oksidatif stres cevabı C1q ve CD59'da yine bifazik fakat ters orantılı bir değişiklik meydana getirir. Ancak bu çalışmanın sonuçları, KynA'in yüksek glukozla bağlı dopaminerjik nöron hasarının önlenmesinde hem kompleman-aracılı, hem de NMDA reseptör-aracılı bifazik dual bir mekanizma ile etkili olduğunu göstermiştir. Bu mekanizmanın yüksek glukozla birlikte gelişen ilerleyici nöron hasarındaki etkilerinin incelenmesi için KynA ve analoglarının *in vivo* etkisini araştıran daha ileri çalışmalar planlanarak yeni terapötik yaklaşımları araştırılabilir.

KAYNAKLAR

- Abdul-Ghani, M.A., and DeFronzo, R.A. (2010). Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle. *Journal of Biomedical Biotechnology*, 2010, 476279.
- Abi-Saab, W.M., Maggs, D.G., Jones, T., Jacob, R., Srihari, V., Thompson, J., Kerr, D., Leone, P., Krystal, J.H., Spencer, D.D., During, M.J., and Sherwin, R.S. (2002). Striking differences in glucose and lactate levels between brain extracellular fluid and plasma in conscious human subjects: Effects of hyperglycemia and hypoglycemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 22 (3), 271–279.
- Accardo-Palumbo, A., Triolo, G., Colonna-Romano, G., Potestio, M., Carbone, M., Ferrante, A., Giardina, E., Caimi, G., and Triolo, G. (2000). Glucose-induced loss of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane regulators of complement activation (CD59, CD55) by in vitro cultured human umbilical vein endothelial cells. *Diabetologia*, 43(8), 1039-1047.
- Acosta, J., Hettinga, J., Flückiger, R., Krumrei, N., Goldfine, A., Angarita, L., and Halperin, J. (2000). Molecular basis for a link between complement and the vascular complications of diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 97(10), 5450-5455.
- Adem, A., Mattsson, M.E., Nordberg, A., and Pålman, S. (1987). Muscarinic receptors in human SH-SY5Y neuroblastoma cell line: regulation by phorbol ester and retinoic acid-induced differentiation. *Brain Research*, 430: (2), 235-242.
- Albuquerque, E.X., and Schwarcz, R. (2013). Kynurenic acid as an antagonist of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors in the brain: facts and challenges. *Biochemical Pharmacology*. 85(8), 1027-1032.
- Al-Hallaq, R.A., Conrads, T.P., Veenstra, T.D. and Wenthold, R.J. (2007). NMDA diheteromeric receptor populations and associated proteins in rat hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 27(31), 8334–8343.
- Allen, D.W., Schroeder, W.A., and Balog, J. (1958). Observations on the chromatographic heterogeneity of normal adult and fetal human hemoglobin. *Journal of the American Chemical Society*. 80, 1628–1634.
- Almeida, A., Almeida, J., Bolanos, J.P., and Moncada, S. (2001). Different responses of astrocytes and neurons to nitric oxide: the role of glycolytically-generated ATP in astrocyte protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 98 (26), 15294–15299.
- Alqahtani, N., Khan, W.A., Alhumaidi, M.H., and Ahmed, Y.A. (2013). Use of Glycated Hemoglobin in the Diagnosis of Diabetes Mellitus and Pre-diabetes and Role of

- Fasting Plasma Glucose, Oral Glucose Tolerance Test. *International Journal of Preventive Medicine*. 4(9), 1025-1029.
- Antonelli, T., Ferraro, L., Fuxe, K., Finetti, S., Fournier, J., Tanganelli, S., De Mattei, M., and Tomasini, M.C. (2004). Neurotensin enhances endogenous extracellular glutamate levels in primary cultures of rat cortical neurons: involvement of neurotensin receptor in NMDA induced excitotoxicity. *Cerebral Cortex*. 14(4), 466-473.
- Aquilano, K., Baldelli, S., Cardaci, S., Rotilio, G., and Ciriolo, M.R. (2011). Nitric oxide is the primary mediator of cytotoxicity induced by GSH depletion in neuronal cells. *Journal of Cell Science*. 124(Pt 7), 1043-1054.
- Aquilano, K., Filomeni, G., Baldelli, S., Piccirillo, S., De Martino, A., Rotilio, G., and Ciriolo, M.R. (2007). Neuronal nitric oxide synthase protects neuroblastoma cells from oxidative stress mediated by garlic derivatives. *Journal of Neurochemistry*. 101(5), 1327-1337.
- Araki, E., and Nishikawa, T. (2010). Oxidative stress: A cause and therapeutic target of diabetic complications. *Journal of Diabetes Investigation*. 1(3), 90-96.
- Artinian, L., Zhong, L., Yang, H., and Rehder, V. (2012). Nitric oxide as intracellular modulator: internal production of NO increases neuronal excitability via modulation of several ionic conductances. *The European Journal of Neuroscience*. 36(10), 3333-3343.
- Arundine, M., and Tymianski, M. (2003). Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* 34(4-5), 325-337.
- Ayala, G.X., and Tapia, R. (2008). HSP70 expression protects against hippocampal neurodegeneration induced by endogenous glutamate in vivo. *Neuropharmacology*. 55(8), 1383-1390.
- Baines, C.P. (2009). The molecular composition of the mitochondrial permeability transition pore. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 46(6), 850-857.
- Bak, L.K., Schousboe, A., and Waagepetersen, H.S. (2006). The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *Journal of Neurochemistry*. 98(3), 641-653.
- Baldelli, S., Aquilano, K., Rotilio, G., and Ciriolo M.R. (2008). Glutathione and copper, zinc superoxide dismutase are modulated by overexpression of neuronal nitric oxide synthase. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 40(11), 2660-2670.
- Banks, W.A., Dohgu, S., Nakaoke, R., Lynch, J.L., Fleegal-DeMotta, M.A., Erickson, M.A., and Vo, T.Q. (2008). Nitric oxide isoenzymes regulate LPS-enhanced insulin transport across the blood-brain barrier. *Endocrinology*. 149 (4), 1514-1523.

- Banks, W.A., Owen, J.B., and Erickson, M.A. (2012). Insulin in the brain: there and back again. *Pharmacology and Therapeutics*. 136 (1), 82-93.
- Bengtson, C.P., Dick, O., and Bading, H. (2008) A quantitative method to assess extrasynaptic NMDA receptor function in the protective effect of synaptic activity against neurotoxicity. *BMC Neuroscience* 9: 11.
- Benoit, M.E., Hernandez, M.X., Dinh, M.L., Benavente, F., Vasquez, O., and Tenner, A.J. (2013) C1q-induced LRP1B and GPR6 proteins expressed early in Alzheimer disease mouse models, are essential for the C1q-mediated protection against amyloid- β neurotoxicity. *The Journal of Biological Chemistry*. 288(1), 654-665.
- Bensa, J.C., Reboul, A., and Colomb, M.G. (1983). Biosynthesis in vitro of complement subcomponents C1q, C1s and C1 inhibitor by resting and stimulated human monocytes. *The Biochemical Journal*. 216(2), 385–392.
- Berent-Spilson, A., and Russell, J.W. (2007). Metabotropic glutamate receptor 3 protects neurons from glucose-induced oxidative injury by increasing intracellular glutathione concentration. *Journal of Neurochemistry*. 101(2), 342-354.
- Bergandi, L., Silvagno, F., Russo, I., Riganti, C., Anfossi, G., Aldieri, E., Ghigo, D., Trovati, M., and Bosia, A. (2003). Insulin stimulates glucose transport via nitric oxide/cyclic GMP pathway in human vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 23(12), 2215-2221.
- Berridge, M.V., and Tan, A.S. (1993). Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archives Biochemistry Biophysics*. 303(2), 474-482.
- Berridge, M.V., and Tan, A.S. (2000). Cell-surface NAD(P)H-oxidase: relationship to trans-plasma membrane NADH-oxidoreductase and a potential source of circulating NADH-oxidase. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2 (2), 277-288.
- Berridge, M.V., Herst, P.M., and Tan, A.S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*. 11, 127-152.
- Bharath, S., and Andersen, J.K. (2005). Glutathione depletion in a midbrain-derived immortalized dopaminergic cell line results in limited tyrosine nitration of mitochondrial complex I subunits: implications for Parkinson's disease. *Antioxidants and Redox Signaling*. 7 (7-8), 900-910.
- Blanpied, T.A., Boeckman, F.A., Aizenman, E., and Johnson, J.W. (1997). Trapping channel block of NMDA-activated responses by amantadine and memantine. *Journal of Neurophysiology*. 77(1), 309–323.

- Bobak, D.A., Gaither, T.A., Frank, M.M., and Tenner, A.J. (1987). Modulation of FcR function by complement: subcomponent C1q enhances the phagocytosis of IgG-opsonized targets by human monocytes and culture-derived macrophages. *Journal of Immunology*. 138(4), 1150–1156.
- Bolaños, J.P., Almeida, A., and Moncada, S. (2010). Glycolysis: a bioenergetic or a survival pathway? *Trends in Biochemical Sciences*. 35(3), 145-149.
- Bolaños, J.P., and Almeida, A. (2010). The pentose-phosphate pathway in neuronal survival against nitrosative stress. *IUBMB Life*. 62(1), 14-18.
- Bolaños, J.P., Delgado-Esteban, M., Herrero-Mendez, A., Fernandez-Fernandez, S., and Almeida, A. (2008). Regulation of glycolysis and pentose-phosphate pathway by nitric oxide: impact on neuronal survival. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1777(7-8), 789-793.
- Bolaños, J.P., Heales, S.J., Land, J.M., and Clark, J.B. (1995). Effect of peroxynitrite on the mitochondrial respiratory chain: differential susceptibility of neurones and astrocytes in primary culture. *Journal of Neurochemistry*. 64(5), 1965-1972.
- Bonde, C., Norberg, J., Noer, H., and Zimmer, J. (2005). Ionotropic glutamate receptors and glutamate transporters are involved in necrotic neuronal cell death induced by oxygen-glucose deprivation of hippocampal slice cultures. *Neuroscience*. 136(3), 779-794.
- Braidy, N., Grant, R., Adams, S., Brew, B.J., and Guillemin, G.J. (2009). Mechanism for quinolinic acid cytotoxicity in human astrocytes and neurons. *Neurotoxicity Research*. 16(1), 77-86.
- Bredt, D.S., Hwang, P.M., Glatt, C.E., Lowenstein, C., Reed, R.R., and Snyder, S.H. (1991). Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*. 351(6329), 714–718.
- Brenman, J.E., Chao, D.S., Gee, S.H., McGee, A.W., Craven, S.E., Santillano, D.R., Wu, Z., Huang, F., Xia, H., and Peters, M.F. (1996). Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell*. 84(5), 757–767.
- Brodsky-Doyle, B., Leonard, K.R., and Reid, K.B. (1976). Circular-dichroism and electron-microscopy studies of human subcomponent C1q before and after limited proteolysis by pepsin. *The Biochemical Journal*. 159(2), 279–286.
- Brothwell, S.L., Barber, J.L., Monaghan, D.T., Jane, D.E., Gibb, A.J., and Jones, S. (2008). NR2B- and NR2D-containing synaptic NMDA receptors in developing rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurones. *Journal of Physiology*. 586(3), 739–750.

- Brown, G.C. (2010). Nitric oxide and neuronal death. *Nitric Oxide*. 23(3), 153-165.
- Brown, G.C., and Bal-Price, A. (2003). Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide, glutamate, and mitochondria. *Molecular Neurobiology*. 27(3), 325-355.
- Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 414(6865), 813-820.
- Brownlee, M., Cerami, A., and Vlassara, H. (1988). Advanced glycosylation end products and the biochemical basis of diabetic complications. *The New England Journal of Medicine*. 318(20), 1315–1321.
- Brzozowski, M.J., Alcantara, S.L., Iravani, M.M., Rose, S., and Jenner, P. (2011). The effect of nNOS inhibitors on toxin-induced cell death in dopaminergic cell lines depends on the extent of enzyme expression. *Brain Research*. 1404: 21-30.
- Butterfield, D.A., and Pocernich, C.B. (2003). The glutamatergic system and Alzheimer's disease: therapeutic implications. *CNS Drugs*. 17(9), 641-652.
- Calcott, M.A., and Muller-Eberhard, H.J. (1972). C1q protein of human complement. *Biochemistry*. 11(18), 3443–3450.
- Callaghan, B.C., Little, A.A., Feldman, E.L., and Hughes, R.A. (2012). Enhanced glucose control for preventing and treating diabetic neuropathy. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 6, CD007543.
- Canabal, D.D., Potian, J.G., Duran, R.G., McArdle, J.J., and Routh, V.H. (2007). Hyperglycemia impairs glucose and insulin regulation of nitric oxide production in glucose-inhibited neurons in the ventromedial hypothalamus. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative Comparative Physiology*. 293(2), R592-R600.
- Canals, S., Casarejos, M.J., de Bernardo, S., Rodríguez-Martín, E., and Mena, M. (2001). Glutathione depletion switches nitric oxide neurotrophic effects to cell death in midbrain cultures: implications for Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*. 79(6), 1183-1195.
- Cao, J., Viholainen, J.I., Dart, C., Warwick, H.K., Leyland, M.L., and Courtney, M.J. (2005). The PSD95-nNOS interface: a target for inhibition of excitotoxic p38 stress-activated protein kinase activation and cell death. *The Journal of Cell Biology*. 168(1), 117–126.
- Cao, M., Jiang, J., Du, Y., and Yan, P. (2012). Mitochondria-targeted antioxidant attenuates high glucose-induced P38 MAPK pathway activation in human neuroblastoma cells. *Molecular Medicine Reports*. 5(4), 929-934.
- Cardoso, S., Correia, S.C., Santos, R.X., Carvalho, C., Candeias, E., Duarte, A.I., Plácido, A.I., Santos, M.S., and Moreira, P.I. (2013). Hyperglycemia, hypoglycemia and dementia:

- role of mitochondria and uncoupling proteins. *Current Molecular Medicine*. 13(4), 586-601.
- Castellano, G., Woltman, A.M., Nauta, A.J., Roos, A., Trouw, L.A., Seelen, M.A., Schena, F.P., Daha, M.R., and van Kooten, C. (2004). Maturation of dendritic cells abrogates C1q production in vivo and in vitro. *Blood*. 103(10), 3813–3820.
- Ceriello, A., Ihnat, M.A., and Thorpe, J.E. (2009). Clinical review 2: The “metabolic memory”: Is more than just tight glucose control necessary to prevent diabetic complications? *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 94(2), 410–415.
- Chance, B., Sies, H., and Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Review*. 59(3), 527-605.
- Cheah, J.H., Kim, S.F., Hester, L.D., Clancy, K.W., Patterson, S.E. 3rd., Papadopoulos, V., and Snyder, S.H. (2006). NMDA receptor-nitric oxide transmission mediates neuronal iron homeostasis via the GTPase Dexas1. *Neuron*. 51(4), 431–440.
- Chen, H.S., and Lipton, S.A. (2006). The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *Journal of Neurochemistry*. 97(6), 1611-1626.
- Chen, J., Qin, J., Liu, X., Han, Y., Yang, Z., Chang, X., and Ji, X. (2008). Nitric oxide-mediated neuronal apoptosis in rats with recurrent febrile seizures through endoplasmic reticulum stress pathway. *Neuroscience Letters*. 443(3), 134-139.
- Chilelli, N.C., Burlina, S., and Lapolla, A. (2013). AGEs, rather than hyperglycemia, are responsible for microvascular complications in diabetes: a "glycoxidation-centric" point of view. *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 23(10), 913-919.
- Chinta, S.J., and Andersen, J.K. (2006). Reversible inhibition of mitochondrial complex I activity following chronic dopaminergic glutathione depletion in vitro: implications for Parkinson's disease. *Free Radicals Biology and Medicine*. 41(9), 1442-1448.
- Chiueh, C.C. (1999). Neuroprotective properties of nitric oxide. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 890, 301-311.
- Chiueh, C.C., and Rauhala, P. (1999). The redox pathway of S-nitrosoglutathione, glutathione and nitric oxide in cell to neuron communications. *Free Radical Research*. 31(6), 641-650.
- Chmiel-Perzyńska, I., Perzyński, A., Wielosz, M., and Urbańska, E.M. (2007). Hyperglycemia enhances the inhibitory effect of mitochondrial toxins and D,L-homocysteine on the brain production of kynurenic acid. *Pharmacological Reports*. 59(3), 268-273.

- Choi, D.W. (1987). Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *The Journal of Neuroscience*. 7(2), 369-379.
- Choi, D.W. (2005). Neurodegeneration: cellular defences destroyed. *Nature*. 433(7027), 696–698.
- Choi, D.W., Koh, J.Y., and Peters, S. (1988). Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. *The Journal of Neuroscience*. 8(1), 185–196.
- Choi, D.W., Maulucci-Gedde, M., and Kriegstein, A.R. (1987). Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *The Journal of Neuroscience*. 7(2), 357-368.
- Choi, Y.B., Tenneti, L., Le, D.A., Ortiz, J., Bai, G., Chen, H.S., and Lipton, S.A. (2000) Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosylation. *Nature Neuroscience*. 3(1), 15–21.
- Chowdhury, A.R., Ghosh, I., and Datta, K. (2008). Excessive reactive oxygen species induces apoptosis in fibroblasts: Role of mitochondrially ac-cumulated hyaluronic acid binding protein 1 (HABP1/p32/gC1qR). *Experimental Cell Research*. 314(3), 651-667.
- Colagiuri, S., Cull, C.A., and Holman, R.R., UKPDS Group. (2002). Are lower fasting plasma glucose levels at diagnosis of type 2 diabetes associated with improved outcomes?: U.K. prospective diabetes study 61. *Diabetes Care*. 25(8), 1410-1417.
- Cole, D.S., Hughes, T.R., Gasque, P., and Morgan, B.P. (2006). Complement regulator loss on apoptotic neuronal cells causes increased complement activation and promotes both phagocytosis and cell lysis. *Molecular Immunology*. 43(12), 1953-1964.
- Courtney, M.J., Li, L.L., and Lai, Y.Y. (2014). Mechanisms of NOS1AP action on NMDA receptor-nNOS signaling. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 8, 252.
- Davies, C.S., Harris, C.L., and Morgan, B.P. (2005). Glycation of CD59 impairs complement regulation on erythrocytes from diabetic subjects. *Immunology*. 114(2), 280-286.
- Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (1996). Nitric oxide actions in neurochemistry. *Neurochemistry International*. 29(2), 97-110.
- Dawson, V.L., Dawson, T.M., London, E.D., Bredt, D.S., and Snyder, S.H. (1991) Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 88(14), 6368-6371.
- de Arriba, S.G., Krügel, U., Regenthal, R., Vissiennon, Z., Verdaguer, E., Lewerenz, A., García-Jordá, E., Pallas, M., Camins, A., Münch, G., Nieber, K., and Allgaier, C. (2006). Carbonyl stress and NMDA receptor activation contribute to methylglyoxal neurotoxicity. *Free Radicals Biology and Medicine*. 40(5), 779-790.

- de la Monte, S.M. (2012). Therapeutic targets of brain insulin resistance in sporadic Alzheimer's disease. *Frontiers in Bioscience (Elite Ed)*. 4: 1582-1605.
- Degenhardt, T.P., Thorpe, S.R., and Baynes, J.W. (1998). Chemical modification of proteins by methylglyoxal. *Cellular and Molecular Biology*. 44(7), 1139–1145.
- Dillon, S.P., D'Souza, A., Kurien, B.T., and Scofield, R.H. (2009). Systemic lupus erythematosus and C1q: a quantitative ELISA for determining C1q levels in serum. *Biotechnology Journal*. 4(8), 1210–1214.
- Dixon, J.B., Zimmet, P., Alberti, K.G., and Rubino, F. (2011). Bariatric surgery: an IDF statement for obese Type 2 diabetes. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia Metabologia*. 55(6), 367-382.
- Dobelis, P., Staley, K., and Cooper, D. (2012). Lack of modulation of nicotinic acetylcholine alpha-7 receptor currents by kynurenic acid in adult hippocampal interneurons. *PLoS ONE*. 7:e, 41108.
- Dodson, M., Liang, Q., Johnson, M.S., Redmann, M., Fineberg, N., Darley-USmar, V.M., and Zhang, J. (2013). Inhibition of glycolysis attenuates 4-hydroxynonenal-dependent autophagy and exacerbates apoptosis in differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Autophagy*. 9(12), 1996-2008.
- Drouet, C., and Reboul, A. (1989). Biosynthesis of C1r and C1s sub-components. *Behring Institute Mitteilungen*. 84, 80-88.
- Du, H., Guo, L., Fang, F., Chen, D., Sosunov, A.A., McKhann, G.M., Yan, Y., Wang, C., Zhang, H., Molkentin, J.D., Gunn-Moore, F.J., Vonsattel, J.P., Arancio, O., Chen, J.X., and Yan, S.D. (2008). Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease. *Nature Medicine*. 14(10), 1097–1105.
- Dugan, L.L., Sensi, S.L., Canzoniero, L.M., Handran, S.D., Rothman, S.M., Lin, T.S., Goldberg, M.P., and Choi, D.W. (1995). Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. *The Journal of Neuroscience*. 15(10), 6377-6388.
- Ebadi, M., and Sharma, S.K. (2003). Peroxynitrite and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Antioxidants and Redox Signaling*. 5(3), 319-335.
- Eggleton, P., Reid, K.B., and Tenner, A.J. (1998). C1q--how many functions? How many receptors? *Trends in Cell Biology*. 8(11), 428-431.
- Elrod, J.W., and Molkentin, J.D. (2013). Physiologic functions of cyclophilin D and the mitochondrial permeability transition pore. *Circulation Journal*. 77(5), 1111-1122.

- Fan, R., and Tenner, A.J. (2005). Differential regulation of Abeta42-induced neuronal C1q synthesis and microglial activation. *Journal of Neuroinflammation*. 2(1), 1.
- Fang, M., Jaffrey, S.R., Sawa, A., Ye, K., Luo, X., and Snyder, S.H. (2000). Dexras1: a G protein specifically coupled to neuronal nitric oxide synthase via CAPON. *Neuron* 28 (1), 183–193.
- Färber, K., Cheung, G., Mitchell, D., Wallis, R., Weihe, E., Schwaeble, W., and Kettenmann, H. (2009). C1q, the recognition subcomponent of the classical pathway of complement, drives microglial activation. *Journal of Neuroscience Research*. Feb 15;87(3):644-52.
- Farkas, I., Baranyi, L., Ishikawa, Y., Okada, N., Bohata, C., Budai, D., Fukuda, A., Imai, M., and Okada, H. (2002). CD59 blocks not only the insertion of C9 into MAC but inhibits ion channel formation by homologous C5b-8 as well as C5b-9. *Journal of Physiology*. 539(Pt 2), 537-545.
- Fernández-Tomé, P., Lizasoain, I., Leza, J.C., Lorenzo, P., and Moro, M.A. (1999). Neuroprotective effects of DETA-NONOate, a nitric oxide donor, on hydrogen peroxide-induced neurotoxicity in cortical neurones. *Neuropharmacology*. 38(9), 1307-1315.
- Ferreira, J.M., Burnett, A.L., and Rameau, G.A. (2011). Activity-dependent regulation of surface glucose transporter-3. *Journal of Neuroscience*. 31(6), 1991-1999.
- Fonseca, M.I., Zhou, J., Botto, M., and Tenner, A.J. (2004). Absence of C1q leads to less neuropathology in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*. 24:6457–6465.
- Forder, J.P., and Tymianski, M. (2009). Postsynaptic mechanisms of excitotoxicity: involvement of postsynaptic density proteins, radicals, and oxidant molecules. *Neuroscience* 158(1), 293–300.
- Francis, K., van Beek, J., Canova, C., Neal, J.W., and Gasque, P. (2003). Innate immunity and brain inflammation: the key role of complement. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 5(15), 1-19.
- Fraser, D.A., Laust, A.K., Nelson, E.L., and Tenner, A.J. (2009). C1q differentially modulates phagocytosis and cytokine responses during ingestion of apoptotic cells by human monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Journal of Immunology*. 183(10), 6175-6185.
- Gammeltoft, S., Staun-Olsen, P., Ottesen, B., and Fahrenkrug, J. (1984). Insulin receptors in rat brain cortex. Kinetic evidence for a receptor subtype in the central nervous system. *Peptides*. 5(5), 937-944.

- Garthwaite, J. (2008). Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *The European Journal of Neuroscience*. 27(11), 2783–2802.
- Garthwaite, J., Charles, S.L., and Chess-Williams, R. (1988). Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature*. 336(6197), 385-388.
- Gasque, P., Thomas, A., Fontaine, M., and Morgan, B.P. (1996). Complement activation on human neuroblastoma cell lines in vitro: route of activation and expression of functional complement regulatory proteins. *Journal of Neuroimmunology*. 66(1-2), 29-40.
- Ghebrehiwet, B., Lim, B.L., Kumar, R., Feng, X., and Peerschke, E.I. (2001). gC1q-R/p33, a member of a new class of multifunctional and multicompartmental cellular proteins, is involved in inflammation and infection. *Immunological Reviews*. 180: 65–77.
- Ghosh, P., Sahoo, R., Vaidya, A., Cantel, S., Kavishwar, A., Goldfine, A., Herring, N., Bry, L., Chorev, M., and Halperin, J.A. (2013). A specific and sensitive assay for blood levels of glycated CD59: a novel biomarker for diabetes. *American Journal of Hematology*. 88(8), 670-676.
- Ghosh, P., Vaidya, A., Sahoo, R., Goldfine, A., Herring, N., Bry, L., Chorev, M., and Halperin, J.A. (2014). Glycation of the complement regulatory protein CD59 is a novel biomarker for glucose handling in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 99(6), E999-E1006.
- Giardino, I., Edelstein, D., and Brownlee, M. (1996). BCL-2 expression or antioxidants prevent hyperglycemia-induced formation of intracellular advanced glycation endproducts in bovine endothelial cells. *The Journal of Clinical Investigation*; 97(6), 1422–1428.
- Girouard, H., Wang, G., Gallo, E.F., Anrather, J., Zhou, P., Pickel, V.M., and Iadecola, C. (2009). NMDA receptor activation increases free radical production through nitric oxide and NOX2. *Journal of Neuroscience*. 29(8), 2545-2552.
- Giugliano, D., Ceriello, A., and Paolisso, G. (1996). Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care*; 19(3), 257–267.
- Goldstein, B.J., Mahadev, K., and Wu, X. (2005). Redox paradox: insulin action is facilitated by insulin-stimulated reactive oxygen species with multiple potential signaling targets. *Diabetes*. 54(2), 311-321.
- Graham, E.J., and Adler, F.R. (2014). Long-term models of oxidative stress and mitochondrial damage in insulin resistance progression. *Journal of Theoretical Biology*. 7; 340, 238-350.

- Grant, M.K., Cuadra, A.E., and El-Fakahany, E.E. (2002). Endogenous expression of nNOS protein in several neuronal cell lines. *Life Science*. 71(7), 813-817.
- Greenamyre, J.T., MacKenzie, G., Peng, T.I., and Stephans, S.E. (1999). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochemical Society Symposium*. 66, 85-97.
- Greene, D.A., Stevens, M.J., Obrosova, I., and Feldman, E.L. (1999). Glucose-induced oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. *European Journal of Pharmacology*. 375, 217-223.
- Guha, M., Bai, W., Nadler, J.L., and Natarajan, R. (2000). Molecular mechanisms of tumor necrosis factor alpha gene expression in monocytic cells via hyperglycemia-induced oxidant stress-dependent and -independent pathways. *The Journal of Biological Chemistry*. 275(23), 17728-17739.
- Gulati, P., Lemerrier, C., Guc, D., Lappin, D., and Whaley, K. (1993). Regulation of the synthesis of C1 subcomponents and C1-inhibitor. *Behring Institute Mitteilungen*. 93, 196-203.
- Hafizi Abu Bakar, M., Kian Kai, C., Wan Hassan, W.N., Sarmidi, M.R., Yaakob, H., and Zaman Huri, H. (2014). Mitochondrial dysfunction as a central event for mechanisms underlying insulin resistance: the roles of long chain fatty acids. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. doi: 10.1002/dmrr.2601.
- Halestrap, A.P. (2009). What is the mitochondrial permeability transition pore? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 46(6), 821-831.
- Halperin, J.A., Taratuska, A., Rynkiewicz, M., and Nicholson-Weller, A. (1993). Transient changes in erythrocyte membrane permeability are induced by sublytic amounts of the complement membrane attack complex (C5b-9). *Blood*. 81(1), 200-205.
- Han, H.J., and Park, S.H. (2011). High glucose stimulates glutamate uptakes in pancreatic β -cells. *Laboratory Animal Research*. 27(4), 327-331.
- Hara, M.R., Cascio, M.B., and Sawa, A. (2006). GAPDH as a sensor of NO stress. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1762(5), 502-509.
- Harada, R., Okada, N., Fujita, T., and Okada, H. (1990). Purification of 1F5 antigen that prevents complement attack on homologous cell membranes. *Journal of Immunology*. 144(5), 1823-18182.
- Hardie, D.G. (2007). AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*. 8(10), 774-785.
- Hardingham, G.E. (2009). Coupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events. *Biochemical Society Transactions*. 37(Pt 6), 1147-1160.

- Hardingham, G.E., and Bading, H. (2010). Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nature Reviews. Neuroscience*. 11(10), 682-696.
- Hardingham, G.E., Arnold, F.J., and Bading, H. (2001). Nuclear calcium signaling controls CREB-mediated gene expression triggered by synaptic activity. *Nature Neuroscience*. 4(3), 261–267.
- Hardingham, G.E., Fukunaga, Y., and Bading, H. (2002). Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nature Neuroscience*. 5: 405–414.
- Harrington, L.S., Findlay, G.M., and Lamb, R.F. (2005). Restraining PI3K: mTOR signalling goes back to the membrane. *Trends in Biochemical Sciences*. 30(1), 35-42.
- Harris, A.Z., and Pettit, D.L. (2007). Extrasynaptic and synaptic NMDA receptors form stable and uniform pools in rat hippocampal slices. *Journal of Physiology*. 584(Pt 2), 509-519.
- Herlein, J.A., Fink, B.D., and Sivitz, W.I. (2010). Superoxide production by mitochondria of insulin-sensitive tissues: mechanistic differences and effect of early diabetes. *Metabolism*. 59(2), 247-257.
- Hess, D.T., Matsumoto, A., Kim, S.O., Marshall, H.E., and Stamler, J.S (2005) Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*. 6(2), 150-166.
- Heyes, M.P., Saito, K., Crowley, J.S., Davis, L.E., Demitrack, M.A., Der, M., Dilling, L.A., Elia, J., Kruesi, M.J., Lackner, A. (1992). Quinolinic acid and kynurenine pathway metabolism in inflammatory and non-inflammatory neurological disease. *Brain*. 115(Pt 5), 1249-1273.
- Hillian, A.D., McMullen, M.R., Sebastian, B.M., Roychowdhury, S., Kashyap, S.R., Schauer, P.R., Kirwan, J.P., Feldstein, A.E., and Nagy, L.E. (2013). Mice lacking C1q are protected from high fat diet-induced hepatic insulin resistance and impaired glucose homeostasis. *The Journal of Biological Chemistry*. 288(31), 22565-22575.
- Hoffman, W.H., Cudrici, C.D., Zafranskaia, E., and Rus, H. (2006). Complement activation in diabetic ketoacidosis brains. *Experimental Molecular Pathology*. 80(3), 283-288.
- Hosszu, K.K., Santiago-Schwarz, F., Peerschke, E.I., and Ghebrehiwet, B. (2010). Evidence that a C1q/C1qR system regulates monocyte-derived dendritic cell differentiation at the interface of innate and acquired immunity. *Innate Immunity*. 16(2), 115–127.
- Hsu, M., Srinivas, B., Kumar, J., Subramanian, R., and Andersen, J. (2005). Glutathione depletion resulting in selective mitochondrial complex I inhibition in dopaminergic

- cells is via an NO-mediated pathway not involving peroxynitrite: implications for Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*. 92(5), 1091-1103.
- Hsu, Y.Y., Tseng, Y.T., and Lo, Y.C. (2013). Berberine, a natural antidiabetes drug, attenuates glucose neurotoxicity and promotes Nrf2-related neurite outgrowth. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 272(3), 787-796.
- Hughes-Jones, N.C. (1977). Functional affinity constants of the reaction between ¹²⁵I-labelled C1q and C1q binders and their use in the measurement of plasma C1q concentrations. *Immunology* 32(2), 191-198.
- Hunt, J.V., Smith, C.C., and Wolff, S.P. (1990). Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes*. 39(11), 1420-1424.
- Igbavboa, U., and Pfeiffer, D.R. (1991). Regulation of reverse uniport activity in mitochondria by extramitochondrial divalent cations. Dependence on a soluble intermembrane space component. *The Journal of Biological Chemistry*. 266(7), 4283-4287.
- Ikemoto, A., Bole, D.G., and Ueda, T. (2003). Glycolysis and glutamate accumulation into synaptic vesicles. Role of glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and 3-phosphoglycerate kinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 278(8), 5929-5940.
- Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovská, V., Turski, L., and Olney, J.W. (1999). Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science*. 283(5398), 70-74.
- Iltis, I., Koski, D.M., Eberly, L.E., Nelson, C.D., Deelchand, D.K., Valette, J., Ugurbil, K., Lim, K.O., and Henry, P.G. (2009). Neurochemical changes in the rat prefrontal cortex following acute phencyclidine treatment: an in vivo localized 1H MRS study. *NMR in Biomedicine*. 22(7), 737-744.
- Inoguchi, T., Li, P., Umeda, F., Yu, H.Y., Kakimoto, M., Imamura, M., Aoki, T., Etoh, T., Hashimoto, T., Naruse, M., Sano, H., Utsumi, H., and Nawata H. (2000). High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*. 49(11), 1939-1945.
- Ivanov, A., Pellegrino, C., Rama, S., Dumalska, I., Salyha, Y., Ben-Ari, Y., and Medina, I. (2006) Opposing role of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in regulation of the extracellular signal-regulated kinases (ERK) activity in cultured rat hippocampal neurons. *The Journal of Physiology*. 572(Pt 3), 789-798.
- Jack, M., and Wright, D. (2012). Role of advanced glycation endproducts and glyoxalase I in diabetic peripheral sensory neuropathy. *Translational Research*. 159(5), 355-365.

- Jaffrey, S.R., Snowman, A.M., Eliasson, M. J., Cohen, N.A., and Snyder, S.H. (1998). CAPON: a protein associated with neuronal nitric oxide synthase that regulates its interactions with PSD95. *Neuron* 20, 115–124.
- Ji, R.R., Gereau, R.W. 4th., Malcangio, M., and Strichartz, G.R. (2009). MAP kinase and pain. *Brain Research Reviews*. 60(1), 135-148.
- Jimenez-Feltstrom, J., Lundquist, I., and Salehi, A. (2005). Glucose stimulates the expression and activities of nitric oxide synthases in incubated rat islets: an effect counteracted by GLP-1 through the cyclic AMP/PKA pathway. *Cell and Tissue Research*. 319(2), 221-230.
- Kalia, L.V., Kalia, S.K., and Salter, M.W. (2008). NMDA receptors in clinical neurology: excitatory times ahead. *The Lancet Neurology*. 7(8), 742-755.
- Kartha, G.K., Moshal, K.S., Sen, U., Joshua, I.G., Tyagi, N., Steed, M.M., and Tyagi, S.C. (2008). Renal mitochondrial damage and protein modification in type-2 diabetes. *Acta Diabetologica*. 45(2), 75-81.
- Kaul, M., and Loos, M. (2001). Expression of membrane C1q in human monocyte-derived macrophages is developmentally regulated and enhanced by interferon-gamma. *FEBS Letters*. 500(1-2), 91-98.
- Kayano, T., Fukumoto, H., Eddy, R.L., Fan, Y. S., Byers, M.G., Shows, T.B., and Bell, G. I. (1988). Evidence for a family of human glucose transporter-like proteins. Sequence and gene localization of a protein expressed in fetal skeletal muscle and other tissues. *The Journal of Biological Chemistry*. 263(30), 15245-15248.
- Keelan, J., Vergun, O., and Duchen, M.R. (1999). Excitotoxic mitochondrial depolarisation requires both calcium and nitric oxide in rat hippocampal neurons. *Journal of Physiology*. 520 Pt 3, 797-813.
- Keeney, P.M., Xie, J., Capaldi, R.A., and Bennett, J.P. Jr. (2006). Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. *Journal of Neuroscience*. 26(19), 5256-5264.
- Kern, A., and Behl, C. (2009). The unsolved relationship of brain aging and late-onset Alzheimer disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1790(10), 1124–1132.
- Keynes, R.G., Duport, S., and Garthwaite, J. (2004). Hippocampal neurons in organotypic slice culture are highly resistant to damage by endogenous and exogenous nitric oxide. *The European Journal of Neuroscience*. 19(5), 1163-1173.
- Kim, B., McLean, L.L., Philip, S.S., and Feldman, E.L. (2011). Hyperinsulinemia induces insulin resistance in dorsal root ganglion neurons. *Endocrinology*. 152(10), 3638-3647.

- Kirichok, Y., Krapivinsky, G., and Clapham, D.E. (2004). The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature*. 427(6972), 360-364.
- Klein, C., Patte-Mensah, C., Taleb, O., Bourguignon, J.J., Schmitt, M., Bihel, F., Maitre, M., and Mensah-Nyagan, A.G. (2013). The neuroprotector kynurenic acid increases neuronal cell survival through neprilysin induction. *Neuropharmacology*. 70: 254-260.
- Knowles, R.G., and Moncada, S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochemical Journal*. 298(Pt 2), 249-258.
- Kopf, D., and Frölich, L. (2009). Risk of incident Alzheimer's disease in diabetic patients: a systematic review of prospective trials. *Journal of Alzheimer's Disease*. 16(4), 677-685.
- Koshimura, K., Tanaka, J., Murakami, Y., and Kato, Y. (2002). Involvement of nitric oxide in glucose toxicity on differentiated PC12 cells: prevention of glucose toxicity by tetrahydrobiopterin, a cofactor for nitric oxide synthase. *Neuroscience Research*. 43(1), 31-38.
- Kulikov, A.V., Rzhabinova, A.A., Goldshtein, D.V., and Boldyrev, A.A. (2007). Expression of NMDA receptors in multipotent stromal cells of human adipose tissue under conditions of retinoic acid-induced differentiation. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 144(4), 626-629.
- Kuzuya, T., Nakagawa, S., Satoh, J., Kanazawa, Y., Iwamoto, Y., Kobayashi, M., Nanjo, K., Sasaki, A., Seino, Y., Ito, C., Shima, K., Nonaka, K., and Kadowaki, T, Committee of the Japan Diabetes Society on the diagnostic criteria of diabetes mellitus. (2002). Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practise*. 55(1), 65-85.
- Lai, T.W., Zhang, S., and Wang, Y.T. (2014). Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Progress in Neurobiology*. 115, 157–188.
- Lapolla, A., Flamini, R., Dalla Vedova, A., Senesi, A., Reitano, R., Fedele, D., Basso, E., Seraglia, R., and Traldi, P. (2003). Glyoxal and methylglyoxal levels in diabetic patients: quantitative determination by a new GC/MS method. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 41(9), 1166-1173.
- Lapolla, A., Traldi, P., and Fedele, D. (2005). Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins. *Clinical Biochemistry*. 38(2), 103-15.
- Larsen, M.L. (1997). The clinical usefulness of glycated haemoglobin in diabetes care evaluated by use of a medical technology assessment strategy. *Danish Medical Bulletin*. 44(3), 303-315.

- Lee, K., Li, B., Xi, X., Suh, Y., and Martin, R.J. (2005). Role of neuronal energy status in the regulation of adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, orexigenic neuropeptides expression, and feeding behavior. *Endocrinology*. 146: 3–10.
- Leino, R.L., Gerhart, D.Z., van Bueren, A.M., McCall, A.L., and Drewes, L.R. (1997). Ultrastructural localization of GLUT 1 and GLUT 3 glucose transporters in rat brain. *Journal of Neuroscience Research*. 49(5), 617-626.
- Leist-Welsh, P., and Bjornson, A.B. (1982). Immunoglobulin-independent utilization of the classical complement pathway in opsonophagocytosis of *Escherichia coli* by human peripheral leukocytes. *Journal of Immunology*. 128(6), 2643–2651.
- Lepow, I.H., Naff, G.B., Todd, E.W., Pensky, J., and Hinz, C.F. (1963). Chromatographic resolution of the first component of human complement into three activities. *The Journal of Experimental Medicine*. 117, 983-1008.
- Leung, A.W., and Halestrap, A.P. (2008). Recent progress in elucidating the molecular mechanism of the mitochondrial permeability transition pore. *Biochimica Biophysica Acta*. 1777(7-8), 946-52.
- Li, L., Ye, X.P., Lu, A.Z., Zhou, S.Q., Liu, H., Liu, Z.J., Jiang, S., and Xu, S.Y. (2013). Hyperglycemia magnifies bupivacaine-induced cell apoptosis triggered by mitochondria dysfunction and endoplasmic reticulum stress. *Journal of Neuroscience Research*. 91(6), 786-798.
- Li, L., Ye, X.P., Lu, A.Z., Zhou, S.Q., Liu, H., Liu, Z.J., Jiang, S., and Xu, S.Y. (2013). Hyperglycemia magnifies bupivacaine-induced cell apoptosis triggered by mitochondria dysfunction and endoplasmic reticulum stress. *Journal of Neuroscience Research*. 91(6), 786-798.
- Li, L.L., Ginet, V., Liu, X., Vergun, O., Tuittila, M., Mathieu, M., Bonny, C., Puyal, J., Truttmann, A.C., and Courtney, M.J. (2013). The nNOS-p38MAPK pathway is mediated by NOS1AP during neuronal death. *The Journal of Neuroscience*. 33(19), 8185-8201.
- Liddell, J.R., Dringen, R., Crack, P.J., and Robinson, S.R. (2006). Glutathione peroxidase 1 and a high cellular glutathione concentration are essential for effective organic hydroperoxide detoxification in astrocytes. *Glia* 54(8), 873-879.
- Lin, L.H., Taktakishvili, O., and Talman, W.T. (2007). Identification and localization of cell types that express endothelial and neuronal nitric oxide synthase in the rat nucleus tractus solitarius. *Brain Research* 1171: 42–51.
- Lin, S.E., Wu, F.L., Wei, M.F., and Shen, L.J. (2014). Depletion of arginine by recombinant arginine deiminase induces nNOS-activated neurotoxicity in neuroblastoma cells. *Biomed Research International*. 2014: 589424.

- Linard, D., Kandlbinder, A., Degand, H., Morsomme, P., Dietz, K.J., and Knoop, B. (2009). Redox characterization of human cyclophilin D: identification of a new mammalian mitochondrial redox sensor? *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 491(1-2), 39-45.
- Lipton, J.A., Barendse, R.J., Van Domburg, R.T., Schinkel, A.F., Boersma, H., Simoons, M.I., and Akkerhuis, K.M. (2013). Hyperglycemia at admission and during hospital stay are independent risk factors for mortality in high risk cardiac patients admitted to an intensive cardiac care unit. *European Heart Journal Acute Cardiovascular Care*. 2(4), 306-313.
- Lipton, S.A. (2005). The molecular basis of memantine action in Alzheimer's disease and other neurologic disorders: low-affinity, uncompetitive antagonism. *Current Alzheimer Research*. 2(2), 155-65.
- Lipton, S.A. (2006). Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond. *Nature Reviews Drug Discovery*. 5(2), 160-170.
- Lipton, S.A. (2007). Pathologically activated therapeutics for neuroprotection. *Nature Reviews, Neuroscience*. 8(10), 803-808.
- Lipton, S.A., and Rosenberg, P.A. (1994). Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *New England Journal of Medicine*. 330(9), 613-622.
- Lipton, S.A., Choi, Y.B., Pan, Z.H., Lei, S.Z., Chen, H.S., Sucher, N.J., Loscalzo, J., Singel, D.J., and Stamler, J.S. (1993) A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature*. 364(6438), 626-632.
- Liszewski, M.K., Farries, T.C., Lublin, D.M., Rooney, I.A., and Atkinson, J.P. (1996). Control of the complement system. *Advances in Immunology*. 61: 201-83.
- Litsky, M.L., and Pfeiffer, D.R. (1997) Regulation of the mitochondrial Ca²⁺ uniporter by external adenine nucleotides: the uniporter behaves like a gated channel which is regulated by nucleotides and divalent cations. *Biochemistry*. 36(23), 7071-7080.
- Liu, D., Pitta, M., and Mattson, M.P. (2008). Preventing NAD(+) depletion protects neurons against excitotoxicity: bioenergetic effects of mild mitochondrial uncoupling and caloric restriction. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1147: 275-82.
- Low, S.J., and Roland, C.L. (2004) Review of NMDA antagonist-induced neurotoxicity and implications for clinical development. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 42(1), 1-14.

- Lu, J., Le, Y., Kon, O.L., Chan, J., and Lee, S.H. (1996). Biosynthesis of human ficolin, an *Escherichia coli*-binding protein, by monocytes: comparison with the synthesis of two macrophage-specific proteins, C1q and the mannose receptor. *Immunology* 89(2), 289-294.
- Luccini, E., Musante, V., Neri, E., Raiteri, M., and Pittaluga, A. (2007). N-methyl-D-aspartate autoreceptors respond to low and high agonist concentrations by facilitating, respectively, exocytosis and carrier-mediated release of glutamate in rat hippocampus. *Journal of Neuroscience Research*. 85(16), 3657-3665.
- Lynch, N.J., Willis, C.L., Nolan, C.C., Roscher, S., Fowler, M.J., Weihe, E., Ray, D.E., and Schwaebler, W.J. (2004). Microglial activation and increased synthesis of complement component C1q precedes blood-brain barrier dysfunction in rats. *Molecular Immunology*. 40(10), 709-716.
- Ma, J., He, L., Wang, X., Gao, M., Zhao, Y., and Liu, J. (2015). Relationship between admission blood glucose level and prognosis in elderly patients without previously known diabetes who undergo emergency non-cardiac surgery. *Internal and Emergency Medicine*. Jan 24.
- Maher, F., Davies-Hill, T.M., Lysko, P.G., Henneberry, R.C., and Simpson, I.A. (1991). Expression of two glucose transporters, GLUT1 and GLUT3, in cultured cerebellar neurons: Evidence for neuron-specific expression of GLUT3. *Molecular and Cellular Neurosciences*. 2(4), 351-360.
- Maher, F., Vannucci, S.J., and Simpson, I.A. (1994). Glucose transporter proteins in brain. *FASEB Journal*. 8(13), 1003-1011.
- Maher, P.A., and Schubert, D.R. (2009). Metabolic links between diabetes and Alzheimer's disease. *Expert Review Neurotherapeutics*. 9(5), 617-630.
- Malkov, A., Ivanov, A.I., Popova, I., Mukhtarov, M., Gubkina, O., Waseem, T., Bregestovski, P., and Zilberter, Y. (2014). Reactive oxygen species initiate a metabolic collapse in hippocampal slices: potential trigger of cortical spreading depression. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 34(9), 1540-1549.
- Maritim, A.C., Sanders, R.A., and Watkins, J.B.3rd. (2003). Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 17(1), 24-38.
- Marqués, G., Antón, L.C., Barrio, E., Sánchez, A., Ruiz, S., Gavilanes, F., and Vivanco, F. (1993). Arginine residues of the globular regions of human C1q involved in the interaction with immunoglobulin G. *Journal of Biological Chemistry*. 268(14), 10393-10402.

- Martin, T.L., Alquier, T., Asakura, K., Furukawa, N., Preitner, F., and Kahn, B.B. (2006). Diet-induced obesity alters AMP kinase activity in hypothalamus and skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*. 281(28), 18933–18941.
- Mason, G.F., Behar, K.L., Rothman, D.L., and Shulman, R.G. (1992). NMR determination of intracerebral glucose concentration and transport kinetics in rat brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 12(3), 448-55.
- Mattson, M.P., Pedersen, W.A., Duan, W., Culmsee, C., and Camandola, S. (1999). Cellular and molecular mechanisms underlying perturbed energy metabolism and neuronal degeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 893: 154-175.
- Mayer, M.M: (1984). Complement: historical perspective and some current issues. *Complement*. 1(1), 2-26.
- Mayer, T.K., and Freedman, Z.R. (1983). Protein glycosylation in diabetes mellitus: a review of laboratory measurements and of their clinical utility. *Clinica Chimica Acta*. 127(2), 147-84.
- McDonald, J.M., and Davis, J.E. (1979). Glycosylated hemoglobins and diabetes mellitus. *Human Pathology*. 10(3), 279-91.
- McGee, A.M., and Baines, C.P. (2011). Complement 1q-binding protein inhibits the mitochondrial permeability transition pore and protects against oxidative stress-induced death. *Biochemical Journal*. 433(1), 119-125.
- Mead, R.J., Singhrao, S.K., Neal, J.W., Lassmann, H., and Morgan, B.P. (2002). The membrane attack complex of complement causes severe demyelination associated with acute axonal injury. *Journal of Immunology*. 168(1), 458-465.
- Meri, S., Morgan, B.P., Davies, A., Daniels, R.H., Olavesen, M.G., Waldmann, H., and Lachmann, P.J. (1990). Human protectin (CD59), an 18,000-20,000 MW complement lysis restricting factor, inhibits C5b-8 catalysed insertion of C9 into lipid bilayers. *Immunology*. 71(1), 1-9.
- Merker, M.P., Bongard, R.D., Kettenhofen, N.J., Okamoto, Y., and Dawson, C.A. (2002). Intracellular redox status affects transplasma membrane electron transport in pulmonary arterial endothelial cells. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*. 282 (1), L36–43.
- Miranda, K.M., Espey, M.G., and Wink, D.A. (2001). A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*. 5(1), 62-71.
- Mody, I., and MacDonald, J.F. (1995) NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular Ca²⁺ release. *Trends in Pharmacological Sciences*. 16(10), 356-359.

- Moghaddam, B., Adams, B., Verma, A., and Daly, D. (1997). Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *The Journal of Neuroscience*. 17(8), 2921-2927.
- Mohr, S., Stamler, J.S., and Brüne, B. (1994). Mechanism of covalent modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase at its active site thiol by nitric oxide, peroxynitrite and related nitrosating agents. *FEBS Letter*. 348(3), 223-227.
- Mok, M.H., Fricker, A.C., Weil, A., and Kew, J.N. (2009). Electrophysiological characterisation of the actions of kynurenic acid at ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology*. 57: 242–249.
- Monyer, H., Giffard, R.G., Hartley, D.M., Dugan, L.L., Goldberg, M.P., and Choi, D.W. (1992). Oxygen or glucose deprivation-induced neuronal injury in cortical cell cultures is reduced by tetanus toxin. *Neuron*. 8(5), 967–973.
- Moosig, F., Damm, F., Knorr-Spahr, A., Ritgen, M., Zeuner, R.A., Kneba, M., Ernst, M., and Schroder, J.O. (2006). Reduced expression of C1q-mRNA in monocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Clinical and Experimental Immunology*. 146(3), 409–416
- Morgan, B.P. (1999). Regulation of the complement membrane attack pathway. *Critical Reviews in Immunology*. 19(3), 173-198.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65(1-2), 55-63.
- Muller-Eberhard, H.J., and Kunkel, H.G. (1961). Isolation of ather-molabile serum protein which precipitates gamma-globulin aggregates and participates in immune hemolysis. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 106, 291–295.
- Nagamatsu, S., Sawa, H., Inoue, N., Nakamichi, Y., Takeshima, H., and Hoshino, T. (1994). Gene expression of GLUT3 glucose transporter regulated by glucose in vivo in mouse brain and in vitro in neuronal cell cultures from rat embryos. *Biochemical Journal*. 300(Pt 1), 125-131.
- Nagamatsu, S., Sawa, H., Kamada, K., Nakamichi, Y., Yoshimoto, K., and Hoshino, T. (1993). Neuron-specific glucose transporter (NSGT): CNS distribution of GLUT3 rat glucose transporter (RGT3) in rat central neurons. *FEBS Letters*. 334(3), 289-295.
- Nakajima, H., Amano, W., Kubo, T., Fukuhara, A., Ihara, H., Azuma, Y.T., Tajima, H., Inui, T., Sawa, A., and Takeuchi, T. (2009). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase aggregate formation participates in oxidative stress-induced cell death. *Journal of Biological Chemistry*. 284(49), 34331-34341.

- Nakamura, T., Tu, S., Akhtar, M.W., Sunico, C.R., Okamoto, S., and Lipton, S.A. (2013). Aberrant protein S-nitrosylation in neurodegenerative diseases. *Neuron*. 78(4), 596-614.
- Nampoothiri, M., Reddy, N.D., John, J., Kumar, N., Kutty Nampurath G., Rao Chamallamudi, M. (2014). Insulin blocks glutamate-induced neurotoxicity in differentiated SH-SY5Y neuronal cells. *Behavioural Neurology*. 2014:674164.
- Nicholls, D.G. (2004). Mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity studied in primary neuronal cultures. *Current Molecular Medicine*. 4(2), 149-177.
- Nicholls, D.G., and Budd S.L. (2000). Mitochondria and neuronal survival. *Physiological Reviews*. 80(1), 315–360.
- Nicholls, D.G., Johnson-Cadwell, L., Vesce, S., Jekabsons, M., and Yadava, N. (2007). Bioenergetics of mitochondria in cultured neurons and their role in glutamate excitotoxicity. *Journal of Neuroscience Research*. 85(15), 3206-3212.
- Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X.L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M.A., Beebe, D., Oates, P.J., Hammes, H.P., Giordino, I., and Brownlee, M. (2000). Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*. 404(6779), 787-790.
- Nomura, Y. (2004). Neuronal apoptosis and protection: effects of nitric oxide and endoplasmic reticulum-related proteins. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 27(7), 961-963.
- Okamoto, S., Pouladi, M.A., Talantova, M., Yao, D., Xia, P., Ehrnhoefer, D.E., Zaidi, R., Clemente, A., Kaul, M., Graham, R.K., Zhang D., Vincent, Chen, H.S., Tong, G., Hayden, M.R., and Lipton, S.A. (2009). Balance between synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor activity influences inclusions and neurotoxicity of mutant huntingtin. *Nature Medicine*. 15(12), 1407–1413.
- Ola, M.S. (2014). Effect of hyperglycemia on insulin receptor signaling in the cultured retinal Müller glial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 444(2), 264-269.
- Olney, J.W., Labruyere, J., and Price, M.T. (1989). Pathological changes induced in cerebrocortical neurons by phencyclidine and related drugs. *Science*. 244(4910), 1360-1362.
- Ookawara, T., Kawamura, N., Kitagawa, Y., and Taniguchi, N. (1992). Site-specific and random fragmentation of Cu, Zn-superoxide dismutase by glycation reaction. Implication of reactive oxygen species. *The Journal of Biological Chemistry*. 267(26), 18505-18510.

- Ott, A., Stolk, R.P., van Harskamp, F., Pols, H.A., Hofman, A., and Breteler, M.M. (1999). Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. *Neurology*. 53(9), 1937-1942.
- Pacher, P., Beckman, J.S., and Liaudet, L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Review*. 87(1), 315-424.
- Påhlman, S., Ruusala, A.I., Abrahamsson, L., Mattsson, M.E., and Esscher, T. (1984). Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation. *Cell Differentiation*; 14: 135-144.
- Park, H.S., Huh, S.H., Kim, M.S., Kim, D.Y., Gwag, B.J., Cho, S.G., and Choi, E.J. (2006). Neuronal nitric oxide synthase (nNOS) modulates the JNK1 activity through redox mechanism: a cGMP independent pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 346(2), 408-414.
- Park, H.S., Huh, S.H., Kim, M.S., Lee, S.H., and Choi, E.J. (2000). Nitric oxide negatively regulates c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase by means of S-nitrosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 97(26), 14382-14387.
- Park, K.S., Mohapatra, D.P., Misonou, H., and Trimmer, J.S. (2006). Graded regulation of the Kv2.1 potassium channel by variable phosphorylation. *Science*. 313(5789), 976-979.
- Peng, T.I., and Greenamyre, J.T. (1998). Privileged access to mitochondria of calcium influx through N-methyl-D-aspartate receptors. *Molecular Pharmacology*. 53(6), 974-980.
- Philippides, A., Ott, S.R., Husbands, P., Lovick, T.A., and O'Shea, M. (2005). Modeling cooperative volume signaling in a plexus of nitric-oxide-synthase-expressing neurons. *The Journal of Neuroscience*. 25(28), 6520-6532.
- Pierrefiche, O., and Naassila, M. (2014). Endogenous nitric oxide but not exogenous n-donor S-nitroprussiate facilitates NMDA excitation in spontaneous rhythmic neonatal rat brainstem slice. *Brain Research*. 1543: 9-16.
- Piert, M., Koeppe, R.A., Giordani, B., Berent, S., Kuhl, D.E. (1996). Diminished glucose transport and phosphorylation in Alzheimer's disease determined by dynamic FDG-PET. *Journal of Nuclear Medicine*. 37(2), 201-208.
- Pizzo, P., Drago, I., Filadi, R., and Pozzan, T. (2012). Mitochondrial Ca²⁺(+) homeostasis: mechanism, role, and tissue specificities. *Pflügers Archiv*. 464(1), 3-17.
- Pomytkin, I.A. (2012). H₂O₂ Signalling Pathway: A Possible Bridge between Insulin Receptor and Mitochondria. *Current Neuropharmacology*. 10(4), 311-320.

- Pomytkin, I.A., and Kolesova, O.E. (2002). Key role of succinate dehydrogenase in insulin-induced inactivation of protein tyrosine phosphatases. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 133(6), 568-5670.
- Qin, X., Goldfine, A., Krumrei, N., Grubissich, L., Acosta, J., Chorev, M., Hays, A.P., and Halperin, J.A. (2004). Glycation inactivation of the complement regulatory protein CD59: a possible role in the pathogenesis of the vascular complications of human diabetes. *Diabetes*. 53(10), 2653-2661.
- Qin, X., Hu, W., Song, W., Blair, P., Wu, G., Hu, X., Song, Y., Bauer, S., Feelisch, M., Leopold, J.A., Loscalzo, J., and Halperin, J.A. (2009). Balancing role of nitric oxide in complement-mediated activation of platelets from mCd59a and mCd59b double-knockout mice. *American Journal of Hematology*. 84(4), 221-227.
- Rahbar, S. (1968). An abnormal hemoglobin in reed cells of diabetics. *Clinica Chimica Acta*. 22(2), 296-298.
- Ramalingam, M., and Kim, S.J. (2015). Insulin exerts neuroprotective effects via Akt/Bcl-2 signaling pathways in differentiated SH-SY5Y cells. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*. 35(1), 1-7.
- Ramírez-Boo, M., Priego-Capote, F., Hainard, A., Gluck, F., Burkhard, P., and Sanchez, J.C. (2012). Characterization of the glycated human cerebrospinal fluid proteome. *Journal of Proteomics*. 75(15), 4766-4782.
- Randazzo, B.P., Dattwyler, R.J., Kaplan, A.P., and Ghebrehiwet, B. (1985). Synthesis of C1 inhibitor (C1-INa) by a human monocyte-like cell line, U937. *Journal of Immunology*. 135(2), 1313-1319.
- Rathmann, W., Scheidt-Nave, C., Roden, M., and Herder, C. (2013). Type 2 diabetes: prevalence and relevance of genetic and acquired factors for its prediction. *Deutsches Arzteblatt International*. 110(19), 331-337.
- Rauhala, P., Lin, A.M., and Chiueh, C.C. (1998). Neuroprotection by S-nitrosoglutathione of brain dopamine neurons from oxidative stress. *FASEB Journal*. 12(2), 165-173.
- Reid, K.B. (1989). Chemistry and molecular genetics of C1q. Behring Institute Mitteilungen. Jul,(84), 8-19.
- Reid, K.B., and Porter, R.R. (1976). Subunit composition and structure of subcomponent C1q of the first component of human complement. *The Biochemical Journal*. 155(1), 19-23.
- Reid, K.B., Gagnon, J., and Frampton, J. (1982). Completion of the amino acid sequences of the A and B chains of subcomponent C1q of the first component of human complement. *The Biochemical Journal*. 203(3), 559-569.

- Reid, M.B. (1998). Role of nitric oxide in skeletal muscle: synthesis, distribution and functional importance. *Acta Physiologica Scandinavica*, 162(3), 401–409.
- Reynolds, I.J., and Hastings, T.G. (1995). Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation. *Journal of Neuroscience*. 15(5 Pt1), 3318-3327.
- Reynolds, I.J., Malaiyandi, L.M., Coash, M., and Rintoul, G.L. (2004). Mitochondrial traffick-ing in neurons: a key variable in neurodegeneration? *Journal of Bioenergetics Biomembranes*. 36(4), 283–286.
- Rivera-Nieves, J., Thompson, W.C., Levine, R.L., and Moss, J. (1999). Thiols mediate superoxide-dependent NADH modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*. 274(28), 19525-19531.
- Roberg, B.A., Torgner, I.A., and Kvamme, E. (2010). Kinetics of a novel isoform of phosphate activated glutaminase (PAG) in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neurochemical Research*. 35(6), 875-880.
- Rodriguez-Rodriguez, P., Almeida, A., and Bolaños, J.P. (2013). Brain energy metabolism in glutamate-receptor activation and excitotoxicity: role for APC/C-Cdh1 in the balance glycolysis/pentose phosphate pathway. *Neurochemistry International*. 62(5), 750-756.
- Rodriguez-Rodriguez, P., Fernandez, E., Almeida, A., and Bolaños, J.P. (2012). Excitotoxic stimulus stabilizes PFKFB3 causing pentose-phosphate pathway to glycolysis switch and neurodegeneration. *Cell Death and Differentiation*. 19(10), 1582-1589.
- Rolo, A.P., and Palmeira, C.M. (2006). Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 212(2), 167-178.
- Rus, H., Cudrici, C., David, S., and Niculescu, F. (2006). The complement system in central nervous system diseases. *Autoimmunity*. 39(5), 395-402.
- Russell, J.W., Golovoy, D., Vincent, A.M., Mahendru, P., Olzmann, J.A., Mentzer, A., and Feldman, E.L. (2002). High glucose-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurons. *FASEB Journal*. 16(13), 1738-1748.
- Russo, V.C., Higgins, S., Werther, G.A., and Cameron, F.J. (2012). Effects of fluctuating glucose levels on neuronal cells in vitro. *Neurochemical Research*. 37(8), 1768-1782.
- Rye, K.A. (2014). Biomarkers associated with high-density lipoproteins in atherosclerotic kidney disease. *Clinical and Experimental Nephrology*. 18(2), 247-250.

- Sabens-Liedhegner, E.A., Gao, X.H., and Mieyal, J.J. (2012). Mechanisms of altered redox regulation in neurodegenerative diseases--focus on S--glutathionylation. *Antioxidants and Redox Signaling*. 16(6), 543-566.
- Sanders, M.J., Grondin, P.O., Hegarty, B.D., Snowden, M.A., and Carling, D. (2007). Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *The Biochemical Journal*. 403(1), 139-148.
- Sanz-Clemente, A., Nicoll, R.A., and Roche, K.W. (2013). Diversity in NMDA receptor composition: many regulators, many consequences. *The Neuroscientist*. 19(1), 62–75.
- Sas, K., Robotka, H., Toldi, J., Vécsei, L. (2007). Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *Journal of the Neurological Sciences*. 257(1-2), 221-239.
- Sato, T., Iwaki, M., Shimogaito, N., Wu, X., Yamagishi, S., and Takeuchi, M. (2006). TAGE (toxic AGEs) theory in diabetic complications. *Current Molecular Medicine*. 6(3), 351-358.
- Sattler, R., Xiong, Z., Lu, W.Y., Hafner, M., MacDonald, J.F., and Tymianski, M. (1999). Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. *Science*. 284(5421), 1845-1848.
- Savolainen, K.M., Loikkanen, J., Eerikäinen, S., and Naarala, J. (1998). Glutamate-stimulated ROS production in neuronal cultures: interactions with lead and the cholinergic system. *Neurotoxicology*. 19(4-5), 669-674.
- Schinzell, A.C., Takeuchi, O., Huang, Z., Fisher, J.K., Zhou, Z., Rubens, J., Hetz, C., Danial, N.N., Moskowitz, M.A., and Korsmeyer, S.J. (2005). Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 102(34), 12005-12010.
- Schneider, L., Giordano, S., Zelickson, B.R., S Johnson, M., A Benavides G., Ouyang, X., Fineberg, N., Darley-Usmar, V.M., and Zhang, J. (2011). Differentiation of SH-SY5Y cells to a neuronal phenotype changes cellular bioenergetics and the response to oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. 51(11), 2007-2017.
- Schuh, A.F., Rieder, C.M., Rizzi, L., Chaves, M., and Roriz-Cruz, M. (2011). Mechanisms of brain aging regulation by insulin: implications for neurodegeneration in late-onset Alzheimer's disease. *ISRN Neurology*. 2011,306905.
- Schuller, E., and Helary, M. (1983). Determination in the nanogram range of C1q in serum and unconcentrated CSF by electro-immunodiffusion. *Journal of Immunological Methods*. 56(2), 159-165.

- Schwaebble, W., Schafer, M.K., Petry, F., Fink, T., Knebel, D., Weihe, E., and Loos, M. (1995). Follicular dendritic cells, interdigitating cells, and cells of the monocyte-macrophage lineage are the C1q-producing sources in the spleen. Identification of specific cell types by in situ hybridization and immunohistochemical analysis. *Journal of Immunology*. 155(10), 4971-4978.
- Schwartz, J.C. (1995). The role of glycohemoglobin and other proteins in diabetes management. *Diabetes Reviews*. 3(2), 269-87.
- Schwartz, M.W., Figlewicz, D.P., Baskin, D.G., Woods, S.C., and Porte, D. Jr. (1992). Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. *Endocrine Reviews*. 13, 387-414.
- Sengpiel, B., Preis, E., Kriegstein, J., and Prehn, J.H. (1998). NMDA-induced superoxide production and neurotoxicity in cultured rat hippocampal neurons: role of mitochondria. *The European Journal of Neuroscience*. 10(5), 1903-1910.
- Serulle, Y., Zhang, S., Ninan, I., Puzzo, D., McCarthy, M., Khatri, L., Arancio, O., and Ziff, E.B. (2007). A GluR1-cGKII interaction regulates AMPA receptor trafficking. *Neuron*. 56(4), 670-688.
- Shankar, R.R., Wu, Y., Shen, H.Q., Zhu, J.S., and Baron, A.D. (2000). Mice with gene disruption of both endothelial and neuronal nitric oxide synthase exhibit insulin resistance. *Diabetes*. 49(5), 684-687.
- Shaw, J.E., Sicree, R.A., and Zimmet, P.Z. (2010). Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 87(1), 4-14.
- Shen, G.X. (2012). Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and diabetic cardiovascular disorders. *Cardiovascular and Hematological Disorders Drug Targets*. 12(2), 106-112.
- Shen, Y., Halperin, J.A., and Lee, C.M. (1995). Complement-mediated neurotoxicity is regulated by homologous restriction. *Brain Research*. 671(2), 282-292.
- Shen, Y., Halperin, J.A., Benzaquen, L., and Lee, C.M. (1997). Characterization of neuronal cell death induced by complement activation. *Brain Research. Brain Research Protocols*. 1(2), 186-194.
- Shen, Y., Sullivan, T., Lee, C.M., Meri, S., Shiosaki, K., and Lin, C.W. (1998). Induced expression of neuronal membrane attack complex and cell death by Alzheimer's beta-amyloid peptide. *Brain Research*. 796(1-2), 187-197.
- Silver, I.A., and Erecinska, M. (1994). Extracellular glucose concentration in mammalian brain: Continuous monitoring of changes during increased neuronal activity and upon limitation in oxygen supply in normo-, hypo-, and hyperglycemic animals. *Journal of Neuroscience*. 14: 5068-5076.

- Simpson, I.A., Carruthers, A., and Vannucci, S.J. (2007). Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 27(11), 1766-1791.
- Simpson, I.A., Dwyer, D., Malide, D., Moley, K.H., Travis, A., and Vannucci, S.J. (2008). The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*. 295(2), E242-453.
- Sing, R., Barden, A., Mori, T., and Beilin, L. (2001). Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*. 44(2), 129-146.
- Singhrao, S.K., Neal, J.W., Rushmere, N.K., Morgan, B.P., and Gasque, P. (2000). Spontaneous classical pathway activation and deficiency of membrane regulators render human neurons susceptible to complement lysis. *American Journal of Pathology*. 157(3), 905-918.
- Singhrao, S.K., Neal, J.W., Rushmere, N.K., Morgan, B.P., and Gasque, P. (1999). Differential expression of individual complement regulators in the brain and choroid plexus. *Laboratory Investigation*. 79(10), 1247-1259.
- Sinor, J.D., Du, S., Venneti, S., Blitzblau, R.C., Leszkiewicz, D.N., Rosenberg, P.A., and Aizenman, E. (2000). NMDA and glutamate evoke excitotoxicity at distinct cellular locations in rat cortical neurons in vitro. *The Journal of Neuroscience*. 20(23), 8831–8837.
- Sjöberg, A.P., Trouw, L.A., and Blom, A.M. (2009). Complement activation and inhibition: a delicate balance. *Trends in Immunology*. 30(2), 83-90.
- Sjöberg, A.P., Trouw, L.A., McGrath, F.D., Hack, C.E., and Blom, A.M. (2006). Regulation of complement activation by C-reactive protein: targeting of the inhibitory activity of C4b-binding protein. *Journal of Immunology*. 176(12), 7612-7620.
- Sjoholm, A.G., Martensson, U., and Laurell, A.B. (1985). C1 dissociation in serum: estimation of free C1q by electroimmunoassay. *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica*. 93(4), 161-168.
- Soane, L., Rus, H., Niculescu, F., and Shin, M.L. (1999). Inhibition of oligodendrocyte apoptosis by sublytic C5b-9 is associated with enhanced synthesis of bcl-2 and mediated by inhibition of caspase-3 activation. *Journal of Immunology*. 163(11), 6132-6138.
- Son, S.M., Song, H., Byun, J., Park, K.S., Jang, H.C., Park, Y.J., and Mook-Jung, I. (2012). Altered APP processing in insulin-resistant conditions is mediated by autophagosome accumulation via the inhibition of mammalian target of rapamycin pathway. *Diabetes*. 61(12), 3126-3138.

- Sonnen, A.F., and Henneke, P. (2014). Structural biology of the membrane attack complex. *Subcellular Biochemistry*. 80:83-116.
- Soriano, F.X., Martel, M.A., Papadia, S., Vaslin, A., Baxter, P., Rickman C, Forder, J., Tymianski, M., Duncan, R., Aarts, M., Clarke, P., Wyllie, D.J., and Hardingham, G.E. (2008). Specific targeting of pro-death NMDA receptor signals with differing reliance on the NMDAR2B PDZ ligand. *The Journal of Neuroscience*. 28(42), 10696–10710.
- Soriano, F.X., Papadia, S., Hofmann, F., Hardingham, N.R., Bading, H., and Hardingham, G.E. (2006). Preconditioning doses of NMDA promote neuroprotection by enhancing neuronal excitability. *The Journal of Neuroscience*. 26(17), 4509–4518.
- Sorokina, E.G., Reutov, V.P., Senilova, Y.E., Khodorov, B.I., and Pinelis, V.G. (2007). Changes in ATP content in cerebellar granule cells during hyperstimulation of glutamate receptors: possible role of NO and nitrite ions. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 143(4), 442-445.
- Sparagna, G.C., Gunter, K.K., Sheu, S.S., and Gunter, T.E. (1995). Mitochondrial calcium uptake from physiological-type pulses of calcium. A description of the rapid uptake mode. *The Journal of Biological Chemistry*. 270(46), 27510-27515.
- Stahel, P.F., Morganti-Kossmann, M.C., and Kossmann, T. (1998). The role of the complement system in traumatic brain injury. *Brain Research. Brain Research Reviews*. 27(3), 243-256.
- Starkov, A.A. (2010). The molecular identity of the mitochondrial Ca²⁺ sequestration system. *The FEBS Journal*. 277(18), 3652–3663.
- Steenkamp, D.W., Alexanian, S.M., and McDonnell, M.E. (2013). Adult hyperglycemic crisis: a review and perspective. *Current Diabetes Reports*. 13(1), 130-137.
- Stefanelli, M., Martocchia, A., De Marinis, E.A., Falaschi, G.M., Romano, G., Rufo, M., and Falaschi, P. (2014). Treatment of insulin resistance in the neurodegeneration. *Recent Patents on CNS Drug Discovery*. 9(1), 54-63.
- Steinert, J.R., Kopp-Scheinpflug, C., Baker, C., Challiss, R.A., Mistry, R., Haustein, M.D., Griffin, S.J., Tong, H., Graham, B.P., and Forsythe, I.D. (2008). Nitric oxide is a volume transmitter regulating postsynaptic excitability at a glutamatergic synapse. *Neuron*. 60(4), 642–656.
- Stevens, B., Allen, N.J., Vazquez, L.E., Howell, G.R., Christopherson, K.S., Nouri, N., Micheva, K.D., Mehalow, A.K., Huberman, A.D., Stafford, B., Sher, A., Litke, A.M, Lambris, J.D., Smith, S.J., John, S.W., and Barres, B.A. (2007). The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell*. 131(6), 1164–1178.
- Stitt, A.W., Jenkins, A.J., and Cooper, M.E. (2002). Advanced glycation end products and diabetic complications. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 11(9), 1205-1223.

- Stone, T.W. (2000). Development and therapeutic potential of kynurenic acid and kynurenine derivatives for neuroprotection. *Trends in Pharmacological Sciences*. 21(4), 149-154.
- Storozhevyykh, T.P., Senilova, Y.E., Persiyantseva, N.A., Pinelis, V.G, and Pomytkin, I.A. (2007). Mitochondrial respiratory chain is involved in insulin-stimulated hydrogen peroxide production and plays an integral role in insulin receptor autophosphorylation in neurons. *BMC Neuroscience*, 8, 84.
- Suarez, I., Bodega, G., Rubio, M., Felipo, V., and Fernandez B. (2005). Neuronal and inducible nitric oxide synthase expression in the rat cerebellum following portacaval anastomosis. *Brain Research* 1047(2), 205-213.
- Szydlowska, K., and Tymianski, M. (2010). Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium* 47(2), 122-129.
- Takeuchi, M., and Yamagishi, S. (2009). Involvement of toxic AGEs (TAGE) in the pathogenesis of diabetic vascular complications and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 16(4), 845-858.
- Talbot, K., Wang, H.Y., Kazi, H., Han, L.Y., Bakshi, K.P., Stucky, A., Fuino, R.L., Kawaguchi, K.R., Samoyedny, A.J., Wilson, R.S., Arvanitakis, Z., Schneider, J.A., Wolf, B.A., Bennett, D.A., Trojanowski, J.Q., and Arnold, S.E. (2012). Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *The Journal of Clinical Investigation*. 122(4), 1316-1338.
- Tang, W.H., Martin, K.A., and Hwa, J. (2012). Aldose reductase, oxidative stress, and diabetic mellitus. *Frontiers in Pharmacology*. 3: 87.
- Tapia, R. (1996). Release and uptake of glutamate as related to excitotoxicity. *Revista Brasileira de Biologia*. 56 Su 1 Pt 1, 165-174.
- Ten, V.S., Yao, J., Ratner, V., Sosunov, S., Fraser, D.A., Botto, M., Sivasankar, B., Morgan, B.P., Silverstein, S., Stark, R., Polin, R., Vannucci, S.J., Pinsky, D., and Starkov, A.A. (2010). Complement component c1q mediates mitochondria-driven oxidative stress in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *The Journal of Neuroscience*. 30(6), 2077-2087.
- Tenner, A.J., and Volkin, D.B. (1986). Complement subcomponent C1q secreted by cultured human monocytes has subunit structure identical with that of serum C1q. *The Biochemical Journal*. 233(2), 451-458.
- Thomas, A., Gasque, P., Vaudry, D., Gonzalez, B., and Fontaine, M. (2000). Expression of a complete and functional complement system by human neuronal cells in vitro. *International Immunology*. 12(7), 1015-1023.

- Thomas, C.G., Miller, A.J, and Westbrook, G.L. (2006). Synaptic and extrasynaptic NMDA receptor NR2 subunits in cultured hippocampal neurons. *Journal of Neurophysiology*. 95(3), 1727-1734.
- Thomas, R.R., Keeney, P.M., and Bennett, J.P. (2012). Impaired complex-I mitochondrial biogenesis in Parkinson disease frontal cortex. *Journal of Parkinson's Disease*. 2(1), 67-76.
- Tirosh, A., Potashnik, R., Bashan, N., and Rudich, A. (1999). Oxidative stress disrupts insulin-induced cellular redistribution of insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes. A putative cellular mechanism for impaired protein kinase B activation and GLUT4 translocation. *Journal of Biological Chemistry*. 274(15), 10595-10602.
- Titze-de-Almeida, S.S., Lustosa, C.F., Horst, C.H., Bel, E.D., and Titze-de-Almeida R. (2014). Interferon gamma potentiates the injury caused by MPP(+) on SH-SY5Y cells, which is attenuated by the nitric oxide synthases inhibition. *Neurochemical Research*. 39(12), 2452-2464.
- Toth, C., Brussee, V., Martinez, J.A., McDonald, D., Cunningham, F.A., and Zochodne, D.W. (2006). Rescue and regeneration of injured peripheral nerve axons by intrathecal insulin. *Neuroscience*. 139(2), 429-449.
- Travis, S.F., Morrison, A.D., Clements, R.S. Jr., Winegrad, A.I., and Oski, F.A. (1971). Metabolic alterations in the human erythrocyte produced by increases in glucose concentration. The role of the polyol pathway. *The Journal of Clinical Investigation*. 50(10), 2104-2112.
- Tzatsos, A., and Kandrор, K.V. (2006). Nutrients suppress phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling via raptor-dependent mTOR-mediated insulin receptor substrate 1 phosphorylation. *Molecular Cell Biology*. 26(1), 63-76.
- Uemura, E., and Greenlee, H.W. (2006). Insulin regulates neuronal glucose uptake by promoting translocation of glucose transporter GLUT3. *Experimental Neurology*. 198(1), 48-53.
- Ueno, M., Carvalheira, J.B., Tambascia, R.C., Bezerra, R.M., Amaral, M.E., Carneiro, E.M., Folli, F., Franchini, K.G., Saad, M.J. (2005). Regulation of insulin signalling by hyperinsulinaemia: role of IRS-1/2 serine phosphorylation and the mTOR/p70 S6K pathway. *Diabetologia*. 48(3), 506-518.
- Unger, J., McNeill, T.H., Moxley, R.T. 3rd., White, M., Moss, A., and Livingston, J.N. (1989). Distribution of insulin receptor-like immunoreactivity in the rat forebrain. *Neuroscience*. 31(1), 143-157.
- van Himbergen, T.M., Beiser, A.S., Ai, M., Seshadri, S., Otokozawa, S., Au, R., Thongtang, N., Wolf, P.A., and Schaefer, E.J. (2012). Biomarkers for insulin resistance and

- inflammation and the risk for all-cause dementia and alzheimer disease: results from the Framingham Heart Study. *Archives of Neurology*. 69(5), 594-600.
- Van Ness-Otunnu, R., and Hack, J.B. (2013). Hyperglycemic crisis. *Journal of Emergency Medicine*. 45(5), 797-805.
- Vandame, D., Ulmann, L., Teigell, M., Prieto-Cappellini, M., Vignon, J., Privat, A., Perez-Polo, R., Nesic, O., and Hirbec, H. (2013). Development of NMDAR antagonists with reduced neurotoxic side effects: a study on GK11. *PLOS ONE*. 8, 11. e81004.
- Vannucci, S.J., Clark, R.R., Koehler-Stec, E., Li, K., Smith, C.B., Davies, P., Maher, F., and Simpson, I.A. (1998). Glucose transporter expression in brain: relationship to cerebral glucose utilization. *Developmental Neuroscience*. 20(4-5), 369-379.
- Vannucci, S.J., Maher, F., and Simpson, I.A. (1997). Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia*. 21(1), 2-21.
- Vedeler, C., Ulvestad, E., Bjørge, L., Conti, G., Williams, K., Mørk, S., and Matre, R. (1994). The expression of CD59 in normal human nervous tissue. *Immunology*. 82(4), 542-547.
- Vegh, Z., Goyarts, E.C., Rozengarten, K., Mazumder, A., and Ghebrehiwet, B. (2003). Maturation-dependent expression of C1q-binding proteins on the cell surface of human monocyte-derived dendritic cells. *International Immunopharmacology*. 3(3), 345-357.
- Vincent, A.M., Brownlee, M., and Russell, J.W. (2002). Oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 959: 368-83.
- Vizi, E.S., Kisfali, M., and Lőrincz, T. (2013). Role of nonsynaptic GluN2B-containing NMDA receptors in excitotoxicity: evidence that fluoxetine selectively inhibits these receptors and may have neuroprotective effects. *Brain Research Bulletin*. 93: 32-8.
- Wamelink, M.M., Struys, E.A., and Jakobs, C. (2008). The biochemistry, metabolism and inherited defects of the pentose phosphate pathway: a review. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 31(6), 703-717.
- Wang, J., Simonavicius, N., Wu, X., Swaminath, G., Reagan, J., Tian, H., and Ling, L. (2006). Kynurenic acid as a ligand for orphan G protein-coupled receptor GPR35. *The Journal of Biological Chemistry*. 281(31), 22021-22028.
- Wang, J., Alexanian, A., Ying, R., Kizhakekuttu, T.J., Dharmashankar, K., Vasquez-Vivar, J., Gutterman, D.D., and Widlansky, M.E. (2012). Acute exposure to low glucose rapidly induces endothelial dysfunction and mitochondrial oxidative stress: role for AMP kinase. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 32(3), 712-720.

- Wang, Y., Guo, S.Y., Gu, P.Q., Wang, X.M., Sun, N., and Gao, L.J. (2014). The globular heads of the C1q receptor regulate apoptosis in human extravillous cytotrophoblast-derived transformed cells via a mitochondria-dependent pathway. *American Journal of Reproductive Immunology*. 71(1), 73-85.
- Wang, Y.H., Yu, H.T., Pu, X.P., and Du, G.H. (2014). Myricitrin alleviates methylglyoxal-induced mitochondrial dysfunction and AGEs/RAGE/NF- κ B pathway activation in SH-SY5Y cells. *Journal of Molecular Neuroscience*. 53(4), 562-570.
- Watson, R.T., and Pessin, J.E. (2001). Intracellular organization of insulin signaling and GLUT4 translocation. *Recent Progress in Hormon Research*. 56: 175-193.
- Weisová, P., Concannon, C.G., Devocelle, M., Prehn, J.H., and Ward, M.W. (2009). Regulation of glucose transporter 3 surface expression by the AMP-activated protein kinase mediates tolerance to glutamate excitation in neurons. *Journal of Neuroscience*. 29(9), 2997-3008.
- Weiss, V., Fauser, C., and Engel, J. (1986). Functional model of subcomponent C1 of human complement. *Journal of Molecular Biology*. 189(3), 573–581.
- Wen, Y., Perez, E.J., Green, P.S., Sarkar, S.N., and Simpkins, J.W. (2004). nNOS is involved in estrogen mediated neuroprotection in neuroblastoma cells. *Neuroreport*. 15(9), 1515-1518.
- White, R.J., and Reynolds, I. J. (1995). Mitochondria and Na⁺/Ca²⁺ exchange buffer glutamate-induced calcium loads in cultured cortical neurons. *The Journal of Neuroscience*. 15(2), 1318–1328.
- Williams, W.M., Weinberg, A., and Smith, M.A. (2011). Protein modification by dicarbonyl molecular species in neurodegenerative diseases. *Journal of Amino Acids*. 2011, 461216.
- Williamson, J.R., Chang, K., Frangos M, Hasan, K.S., Ido, Y., Kawamura, T., Nyengaard, J.R., van den Enden, M., Kilo, C., and Tilton, R.G. (1993). Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes*. 42(6), 801–813.
- Wroge, C.M., Hogins, J., Eisenman, L., and Mennerick, S. (2012). Extrasynaptic NMDA receptors mediate hypoxic excitotoxic death. *The Journal of Neuroscience*. 32(19), 6732-6742.
- Xie, H., Hu, L., and Li, G. (2010). SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chinese Medical Journal*. 123(8), 1086-1092.
- Xu, Q.G., Li, X.Q., Kotecha, S.A., Cheng, C., Sun, H.S., and Zochodne, D.W. (2004). Insulin as an in vivo growth factor. *Experimental Neurology*. 188(1), 43-51.

- Yan, L.J. (2014). Pathogenesis of chronic hyperglycemia: from reductive stress to oxidative stress. *Journal of Diabetes Research*. 2014: 137919.
- Yan, S.D., Schmidt, A.M., Anderson, G.M., Zhang, J., Brett, J., Zou, Y.S., Pinsky, D., and Stern, D. (1994). Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 269 (13), 9889–9897.
- Yang, L.B., Li, R., Meri, S., Rogers, J., and Shen, Y. (2000). Deficiency of complement defense protein CD59 may contribute to neurodegeneration in Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience*. 20(20), 7505-7509.
- Yin, Q.Q., Dong, C.F., Dong, S.Q., Dong, X.L., Hong, Y., Hou, X.Y., Luo, D.Z., Pei, J.J., and Liu, X.P. (2012). AGEs induce cell death via oxidative and endoplasmic reticulum stresses in both human SH-SY5Y neuroblastoma cells and rat cortical neurons. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 32(8), 1299-1309.
- Yokoyama, H., Takagi, S., Watanabe, Y., Kato, H., and Araki, T. (2008). Role of reactive nitrogen and reactive oxygen species against MPTP neurotoxicity in mice. *Journal of Neural Transmission*. 115(6), 831-842.
- Yuan, Z.R., Liu, B., Zhang, Y., Yuan, L., Muteliefu, G., and Lu, J. (2004). Upregulated expression of neuronal nitric oxide synthase by insulin in both neurons and astrocytes. *Brain Research*, 1008(1), 1–10.
- Zádori, D., Veres, G., Szalárdy, L., Klivényi, P., Toldi, J., and Vécsei, L. (2014). Glutamatergic dysfunctioning in Alzheimer's disease and related therapeutic targets. *Journal of Alzheimer's Disease*. 42 Suppl 3, S177-S187.
- Zhang, H.F., Yu, J., Bajwa, E., Morrison, S.L., and Tomlinson, S. (1999). Targeting of functional antibody-CD59 fusion proteins to a cell surface. *The Journal of Clinical Investigation*. 103(1), 55-61.
- Zhang, S.J., Steijaert, M.N., Lau, D., Schütz, G., Delucinge-Vivier, C., Descombes, P., and Bading H. (2007). Decoding NMDA receptor signaling: identification of genomic programs specifying neuronal survival and death. *Neuron*. 53(4), 549-562.
- Zhou, X., Hollern, D., Liao, J., Andrechek, E., and Wang, H. (2013). NMDA receptor-mediated excitotoxicity depends on the coactivation of synaptic and extrasynaptic receptors. *Cell Death Disease*. 4, e560.
- Zorov, D.B., Juhaszova, M., Yaniv, Y., Nuss, H.B., Wang, S., and Sollott, S.J. (2009). Regulation and pharmacology of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovascular Research*. 83(2), 213-225.
- Zwilling, D., Huang, S.Y., Sathyaikumar, K.V., Notarangelo, F.M., Guidetti, P., Wu, H.Q., Lee, J., Truong, J., Andrews-Zwilling, Y., Hsieh, E.W., Louie, J.Y., Wu, T., Scarce-

Levie, K., Patrick, C., Adame, A., Giorgini, F., Moussaoui, S., Laue, G., Rassoulpour, A., Flik, G., Huang, Y., Muchowski, J.M., Masliah, E., Schwarcz, R., and Muchowski, P.J. (2011). Kynurenine 3-monooxygenase inhibition in blood ameliorates neurodegeneration. *Cell*. 145(6), 863-874.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Uyruğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 18 Nisan 1978, Ankara
 Medeni hali : Bekar
 Telefon : +90 312 202 3084
 Faks : +90 312 222 2326
 e-mail : abengin@gmail.com



Eğitim		
Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Toksikoloji A.B.D.	2008
Yüksek Lisans	Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Toksikoloji A.B.D.	2002
Lisans	Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi	1999
Lise	TED Ankara Koleji	1995

İş Deneyim		
Yıl	Yer	Görev
2012 -	Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Toksikoloji A.B.D.	Doçent, Öğretim Üyesi
2007 - 2012	Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Toksikoloji A.B.D.	Araştırma Görevlisi
1999 - 2006	Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Toksikoloji A.B.D.	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce, Almanca

Ödüller

1. Blair-Curtius-Pfleiderer-Wachter AWARD For Pteridine Research, 2004.
2. EEMS Young Scientist Travel Award, 2008.
3. SOT/AstraZeneca Travel Fellowship, 2010.
4. Pteridines, Best Paper Award, 2010.
5. Türk Eczacıları Birliği, Eczacılık Akademisi, Teşvik Ödülü, 2013.

Yazılan uluslararası kitap ve kitap bölümleri:

“Endothelium: Molecular Aspects of Metabolic Disorders” ISBN 978-1-57808-784-6; 29 Mayıs 2013 (CRC Press/Taylor & Francis Group, SCIENCE PUBLISHERS, An Imprint of Edenbridge Ltd 43 La Motte Street, St. Helier, Jersey JE4 8SD British Channel Islands)

Editör

A. Basak Engin: Faculty of Pharmacy, Department of Toxicology, Gazi University, Hipodrom, Ankara, Turkey

Atilla Engin: Faculty of Medicine, Department of General Surgery, Gazi University, Ankara, Turkey

Kitap Bölümleri

Ayşe Basak Engin. “Chapter 6: Oxidative stress and endothelium” in “Endothelium: Molecular aspects of metabolic disorders”, ISBN 978-1-57808-784-6; May 2013 (CRC Press/Taylor & Francis Group, SCIENCE PUBLISHERS, An Imprint of Edenbridge Ltd 43 La Motte Street, St. Helier, Jersey JE4 8SD British Channel Islands) Ed: A. Basak Engin, Atilla Engin.

Ayşe Basak Engin. “Chapter 14: Nanoparticle: As a messenger between environment and endothelium” in “Endothelium: Molecular aspects of metabolic disorders”, ISBN 978-1-57808-784-6; May 2013 (CRC Press/Taylor & Francis Group, SCIENCE PUBLISHERS, An Imprint of Edenbridge Ltd 43 La Motte Street, St. Helier, Jersey JE4 8SD British Channel Islands) Ed: A. Basak Engin, Atilla Engin.

Yayınlar

1. Ozmeric, N., Baydar, T., Bodur, A., Engin, A.B., Uraz, A., Eren, K., Sahin, G. (2002). Level of neopterin, a marker of immune cell activation in gingival crevicular fluid, saliva, and urine in patients with aggressive periodontitis. *J. Periodontol.*, 73, 720-5.
2. Bodur, A, Baydar, T., Ozmeric, N., Engin, A.B., Uraz, A., Eren, K., Sahin, G. (2003). Neopterin profile in aggressive periodontitis to evaluate the effectiveness of the periodontal treatment. A pilot study. *Pteridines*, Vol. 14, pp.77-81.
3. Altindag Z.Z., Baydar T., Engin A.B., Sahin G. (2003). Effects of the metals on dihydropteridine reductase activity. *Toxicology in Vitro*, 17, 533-537.
4. Baydar, T., Engin, A.B., Aydin, A., Sahin, G. (2005). Effect of Aluminum exposure on pteridine metabolism. *Biol. Trace Elem. Res.*, 106(2), 153-164.
5. Baydar T, Engin A.B., Girgin G., Aydin S., Sahin G. (2005). Aflatoxin and ochratoxin in various types of commonly consumed retail ground samples in Ankara, Turkey. *Ann. Agricul. Environ. Med.* 12(2), 193-197.
6. Engin AB, Ergun MA, Yurtcu E, Kan D, Sahin G. (2005). Effect of ionizing radiation on the pteridine metabolic pathway and evaluation of its cytotoxicity in exposed hospital staff. *Mutat Res.*, 1, 585, 184-92.
7. Gurbay A., Aydin S., Girgin G., Engin A.B., Sahin G. (2006). Assessment of aflatoxin M1 levels in milk in Ankara, Turkey. *Food Control*, 17, 1-4.
8. Gurbay A, Engin AB, Caglayan A, Sahin G. (2006). Aflatoxin M1 levels in commonly consumed cheese and yogurt samples in Ankara, Turkey. *Ecology of Food and Nutrition*, 45:449-459. (
9. Engin AB, Tuzun D, Sahin G. (2006) Evaluation of pteridine metabolism in battery workers exposed to lead. *Hum Exp Toxicol*, 25(7):353-9. (*Science Citation Index*)
10. Giray B, Girgin G, Engin AB, Aydın S, Sahin G. (2007). Aflatoxin levels in wheat samples consumed in some regions of Turkey, *Food Control*, 18(1):23-29.
11. Yeşim Ö, Yardım-Akaydın S, Sepici A, Engin B, Sepici V, Şimşek B. (2007) Alteration in Serum Homocysteine, Neopterin and Nitric oxide levels in Active Behçet's Disease: Relation of Hcy with nitric oxide and neopterin, *Clin Chem Lab Med*, 45(1):73-77.

12. Engin AB, Ozkan Y, Fuchs D, Yardim-Akaydin S. (2009) Serum tryptophan, kynurenine, neopterin and C-reactive protein concentrations in patients with small cell and non-small cell bronchus carcinoma at diagnosis, *Eur J Cancer Care*, 19(6): 803-808.
13. Mizrak D, Engin B, Onder FO, Yener B, Bektaş M, Biyikli Z, Idilman R, Cinar K, Karayalçin K, Ersöz S, Karayalçin S, Ozden A, Yurdaydin C, Yazihan N, Ataoğlu H, Bozkaya H, Uzunalimoğlu O. (2009) Aflatoxin exposure in viral hepatitis patients in Turkey, *Turk J Gastroenterol* 20(3):192-7.
14. Engin AB, Kadioğlu E. (2009) Nutrigenomik-Kişiselleştirilmiş Diyet, *Gıda Güvenliği Dergisi*, 3(1):36-38.
15. Engin AB, Engin A, Sepici-Dincel A. (2010) Influence of surgical trauma on neopterin concentrations in gastric carcinoma patients, *Tumori*, 96(4): 589-593.
16. Engin AB, Karahalil B, Engin A, Karakaya AE. (2010) Oxidative Stress, *Helicobacter pylori* and OGG1 Ser326Cys, XPC Lys939Gln and XPD Lys751Gln Polymorphisms in a Turkish Population with Colorectal Carcinoma, *Genet Test Mol Biomarkers*, 14(4):559-64.
17. Abike F, Engin AB, Dunder I, Tapisiz OL, Aslan C, Kutluay L. (2011) Human papilloma virus persistence and neopterin, folate and homocysteine levels in cervical dysplasia, *Arch Gynecol Obstet*, 284(1):209-14.
18. Engin AB, Sepici-Dincel A, Gonul II, Engin A. (2012) Oxidative stress-induced endothelial cell damage in thyroidectomized rat. *Journal of Experimental Toxicology and Pathology*, 64(5):481-5.
19. Engin AB, Karahalil B, Engin A, Karakaya AE. (2011) DNA Repair Enzyme Polymorphisms and Oxidative Stress in a Turkish Population with Gastric Carcinoma. *Molecular Biology Reports*, 38(8): 5379-5386.
20. Engin AB, Karahalil B, Karakaya AE, Engin A. (2010) Exposure to *Helicobacter pylori* and Serum Kynurenine to Tryptophan Ratio in Patients with Gastric Cancer. *Pteridines* 21, 110 – 120. (*Pteridines, Best Paper Award, 2010 International Society of Pteridinology*)
21. Engin AB. (2011) Dual Function of Nitric Oxide in Carcinogenesis, Reappraisal. *Curr Drug Metab.* 12(9):891-9.

22. Engin AB, Karahalil B, Karakaya AE, Engin A. (2011) Association Between XRCC1 ARG399GLN and P53 ARG72PRO Polymorphisms and the Risk of Gastric and Colorectal Cancer in Turkish Population. *Arh Hig Rada Toksikol.* 62(3):207-214.
23. Engin AB, Bukan N, Kurukahvecioglu O, Memis L, Engin A. (2011) Effect of butylated hydroxytoluene (E321) pretreatment versus l-arginine on liver injury after sub-lethal dose of endotoxin administration. *Environ Toxicol Pharmacol.* 32(3):457-64.
24. Dhawan A, Shanker R, Laffon B, Tajés JF, Fuchs D, van der Laan G, van Broekhuizen P, Becker H, Moriske HJ, Teixeira JPF, Carriere M, Herlin-Boime N, Engin AB, Coskun E, Karahalil B. (2011) Nanotoxicology Link Between India and European Nations, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 7(2): 203-204.
25. Kesimci E, Engin AB, Kanbak O, Karahalil B. (2012) Association between ABCB1 gene polymorphisms and fentanyl's adverse effects in Turkish patients undergoing spinal anesthesia. *Gene.* 493(2):273-7.
26. Engin AB, Dogruman-Al F, Ercin U, Celebi B, Babur C, Bukan N. (2012) Oxidative stress and tryptophan degradation pattern of acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Parasitol Res.* 111(4):1725-30.
27. Karahalil B, Engin AB, Coskun E. (2012) Could 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 Ser326Cys polymorphism be a biomarker of susceptibility in cancer? *Toxicol Ind Health.* 2014 Oct;30(9):814-25. [Epub 2012 Oct 18.] Engin AB, Engin ED, Karahalil B. (2012). Effect of N-acetyl cysteine, Neopterin and Dexamethasone on the Viability of Titanium dioxide Nanoparticles Exposed Cell Lines. *Pteridines.* 23: 111-122.
28. Engin AB, Karahalil B, Karakaya AE, Engin A. (2015) *Helicobacter pylori* and serum kynurenine-tryptophan ratio in patients with colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 28;21(12):3636-43.



GAZİ GELECEKTİR...