



**CIVA TOKSİSİTESİNE BAĞLI NÖRONAL HÜCRE ÖLÜMÜNE
METFORMİN VE KAFEİNİN ETKİSİ**

Damla KARAKISA

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2015

Ecz. Damla KARAKISA tarafından hazırlanan “Cıva Toksisitesine Bağlı Nöronal Hücre Ölümüne Metformin ve Kafeinin Etkisi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OYBİRLİĞİ/ OY ÇOKLUĞU ile Gazi Üniversitesi F. Toksikoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Ayşe Başak ENGİN

F. Toksikoloji Anabilim Dalı, Gazi

Üniversitesi

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

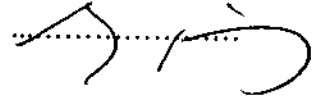


Başkan : Doç. Dr. Onur ERDEM

F. Toksikoloji Anabilim Dalı, Gülhane

Askeri Tıp Akademisi

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



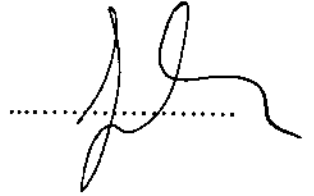
Üye : Doç. Dr. Suna

SABUNCUOĞLU

F. Toksikoloji Anabilim Dalı,

Hacettepe Üniversite

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



Tez Savunma Tarihi: 06 / 07 / 2015

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans 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.

Damla KARAKISA

06.07.2015



CIVA TOKSİSİTESİNE BAĞLI NÖRONAL HÜCRE ÖLÜMÜNE METFORMİN VE KAFEİNİN ETKİSİ

Yüksek Lisans Tezi

Damla KARAKISA

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2015

ÖZET

Cıva bileşikleri insanların sıklıkla maruz kaldığı çevresel kirleticilerdir. Cıvanın nörotoksik etkileri iyi bilinmesine rağmen mekanizması halen tartışmalıdır. Cıva maruziyeti ile meydana gelen oksidatif strese adenosin mono-fosfatla aktive protein kinaz (AMPK)'nın redoks düzenlemesi yaparak nöron hasarını önlediği ileri sürülmektedir. Bu çalışmanın amacı; farklı konsantrasyonlarda cıvaya maruz kalan SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinin nitrik oksit ve oksidatif stres düzeyleri ile hücre canlılığındaki değişikliklere AMPK aktivatörü metformin ile adenosin 2A reseptör antagonisti kafeinin etkilerini incelemektir. Farklı dozlarda cıva klorürün ve metil cıva klorürün metformin ve kafein ile ayrı ayrı veya birlikte farklı maruziyet sürelerinde SH-SY5Y dopaminerjik hücre hattı kültüründe hücre canlılığına etkisi MTT ile tayin edildi. Nitrit ve nitrat miktarı Griess yöntemi ile ölçüldü ve oksidatif stres düzeyleri hesaplandı. Bizim çalışmamızda, inorganik ve organik cıva maruziyetinin mitokondriyal oksidatif strese yol açtığı tespit edildi. Her iki cıva bileşiği de tedavi dozlarında metforminin nöron koruyucu etkisini ikinci hücre siklusunda ortadan kaldırmaktadır. Bu etkinin büyük olasılıkla AMPK aracılı geç oksidatif strese bağlı hücre ölümü ile sonuçlandığı düşünülmektedir. Cıvaya maruz kalan SH-SY5Y hücrelerinde kafein antioksidan kapasiteyi destekleyerek hücre canlılığını artırdı. Bu etki inorganik cıva ile çok daha belirgindir. Sonuç olarak, SH-SY5Y hücrelerinde inorganik ve organik cıva maruziyeti sonrasında metforminin aksine, kafeinin nöral hücreler üzerinde koruyucu etkisi bulunduğu tespit edilmiştir. Bu etkinin nöron içerisine sistein alımıyla nöronal antioksidan kapasitenin artmasına veya NMDA reseptörünün blokajına bağlı olduğu düşünülmektedir.

Bilim Kodu : 1021

Anahtar Kelimeler : Cıva, metformin, kafein, nörodejeneratif hastalıklar, SH-SY5Y hücre hattı, adenosin mono-fosfatla aktive protein kinaz (AMPK)

Sayfa Adedi : 85

Danışman : Doç. Dr. Ayşe Başak ENGİN

THE EFFECT OF METFORMIN AND CAFFEINE ON MERCURY-INDUCED
NEURONAL CELL DEATH

M. Sc. Thesis

Damla KARAKISA

GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

July 2015

ABSTRACT

Mercury compounds are ubiquitous environmental pollutants that human are frequently exposed to. Although the neurotoxic effect of mercury is well known, the mechanism is still controversial. It is suggested that redox down-regulation by adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK) prevents the oxidative stress-mediated neuronal damage due to mercury exposure. The aim of this study was to investigate the effects of AMPK activator, metformin and adenosine 2A receptor antagonist caffeine on SH-SY5Y human neuroblastoma cells' nitric oxide levels, oxidative stress and viability altered by the various concentrations of mercury. The cell viability was assessed by MTT assay on SH-SY5Y dopaminergic cell line exposed to various concentrations of mercury chloride and methyl mercury chloride with or without metformin or caffeine at different time periods. Nitrite and nitrate was measured by Griess method and oxidative stress was calculated. In this study, we found that inorganic and organic mercury exposure caused mitochondrial oxidative stress. Both of the mercury compounds diminished the neuroprotective effect of therapeutical doses of metformin at second cell cycle. Thereby, AMPK-induced late oxidative stress may lead to cells death. Caffeine was supported the antioxidant capacity and increased the cell viability of the mercury exposed SH-SY5Y cells. This effect was more pronounced by inorganic mercury. As a conclusion, despite metformin, caffeine has a neuroprotective effect on inorganic and organic mercury exposed SH-SY5Y cells. Virtually, these results may be related to the increased antioxidant capacity via cysteine uptake into the neuronal cells or due to the NMDA receptor blockage.

Science Code : 1021

Key Words : Mercury, metformin, caffeine, neurodegenerative diseases, SH-SY5Y cell line, adenosine mono-phosphate activated protein kinase (AMPK)

Page Number : 85

Advisor : Assoc. Prof. Dr. Ayse Basak ENGIN

TEŞEKKÜR

İlk olarak çalışmanın en başından sonuna kadar beni asla yalnız bırakmayan, her aşamasında destek veren, çalışmamı teorikten pratiğe ve pratikten teoriğe aktarabilmemde katkı sağlayan çok değerli hocam Doç. Dr. Ayşe Başak ENGİN'e her türlü destek ve katkıları için sonsuz teşekkür ederim.

Yine çalışmalarım sırasında manevi olarak her türlü desteğini sunan sevgili yol arkadaşım Burak AYCAN'a, kardeşim Bilge KARAKISA'ya, annem Semiha KARAKISA'ya ve babam Salih KARAKISA'ya her zaman yanımda oldukları ve zorlukları kolaylaştırdıkları için teşekkür ederim. Ayrıca manevi desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen sevgili dostlarım Nezahat SARAÇOĞLU'na, Burcu ŞAYİN'e, İsmiur SİVRİ'ye, Duygu SEVİM'e ve Şeyma TERCAN'a teşekkürler.

Ayrıca yüksek lisans eğitimim süresince her türlü katkıları için fakültemiz Farmasötik Toksikoloji Ana Bilim Dalı'na teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Cıva.....	5
2.1.1. Organik cıva.....	7
2.1.2. İnorganik cıva.....	7
2.2. Nöral Bozukluklar.....	8
2.3. Cıva Nörotoksisitesi.....	8
2.3.1. Organik cıva nörotoksisitesi.....	8
2.3.2. İnorganik cıva nörotoksisitesi.....	9
2.4. Metformin.....	9
2.4.1. AMPK’yi aktive eden metforminin nöronlardaki etkisi.....	11
2.4.2. AMPK’yi aktive eden metformin ile nörotoksisite ilişkisi.....	11
2.5. Kafein.....	12
2.5.1. Kafeinin nöronlardaki etkisi.....	12

	Sayfa
2.5.2. Kafein ile nörotoksisite ilişkisi.....	13
2.6. Oksidatif Stres.....	13
2.6.1. Oksidatif stresin nöronlardaki etkisi.....	16
2.6.2. Oksidatif stres ve cıva ilişkisi.....	17
2.6.3. Oksidatif stres ve metformin ilişkisi.....	18
2.6.4. Oksidatif stres ve kafein ilişkisi.....	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
3.1. Hücrelerin Hazırlanması.....	21
3.1.1. Kullanılan Malzemeler.....	21
3.1.2. Kullanılan Maddeler.....	21
3.1.3. SH-SY5Y hücre hattı ve hücre kültürünün hazırlanması.....	22
3.1.4. Hücrelerin hazırlanma yöntemi.....	22
3.2. MTT Deneyinin Hazırlanması ve Yöntemi.....	24
3.2.1. Kullanılan malzemeler.....	24
3.2.2. Kullanılan maddeler.....	22
3.2.3. Çözeltilerin hazırlanması.....	25
3.2.4. MTT deneyi yöntemi.....	26
3.3. Kantitatif Total Nitrit-Nitrat Miktarı Tayini Deneyinin Hazırlanması ve Yöntemi.....	26
3.3.1. Kullanılan malzemeler.....	26
3.3.2. Kullanılan maddeler.....	27
3.3.3. Çözeltilerin hazırlanması.....	28
3.3.4. Kantitatif total nitrit-nitrat miktarı tayini deney yöntemi	29

	Sayfa
3.4. Oksidatif Stresin Hesaplanması.....	30
3.5. İstatistiksel Analiz.....	30
4. BULGULAR.....	31
4.1. MTT Deneyi Bulguları.....	31
4.1.1. Maddeler tek başına uygulandığında deney bulguları.....	31
4.1.2. Maddeler birlikte uygulandığında deney bulguları.....	34
4.2. Kantitatif Total Nitrit-Nitrat Tayini Bulguları.....	41
5. TARTIŞMA	51
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	65
KAYNAKLAR.....	67
ÖZGEÇMİŞ.....	85

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. Uygulanan madde dozları.....	25
Çizelge 3.2. Birlikte uygulamalarda madde dozları.....	26
Çizelge 3.3. Nitrit ve nitrat deneyinde kullanılan madde konsantrasyonları.....	29
Çizelge 4.1. Birinci hücre siklusunda metil cıva klorür, metformin ve kafeinin hücre canlılığı, nitrik oksit ve oksidatif stres düzeylerine etkisi.....	41
Çizelge 4.2. Birinci hücre siklusunda cıva klorür, metformin ve kafeinin hücre canlılığı, nitrik oksit ve oksidatif stres düzeylerine etkisi.....	43
Çizelge 4.3. İkinci hücre siklusunda metil cıva klorür, metformin ve kafeinin hücre canlılığı, nitrik oksit ve oksidatif stres düzeylerine etkisi.....	44
Çizelge 4.4. İkinci hücre siklusunda cıva klorür, metformin ve kafeinin hücre canlılığı, nitrik oksit ve oksidatif stres düzeylerine etkisi.....	45
Çizelge 4.5. Birinci ve ikinci hücre sikluslarında metil cıva klorür, metformin ve kafeinin hücre canlılığı, nitrik oksit ve oksidatif stres düzeylerine etkisi.....	46
Çizelge 4.6. Birinci ve ikinci hücre sikluslarında cıva klorür, metformin ve kafeinin hücre canlılığı, nitrik oksit ve oksidatif stres düzeylerine etkisi.....	48

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil		Sayfa
Şekil 2.1.	Cıvanın küresel siklusu	5
Şekil 2.2.	Glutasyon oluşumu ve siklusu.....	15
Şekil 2.3.	AMPK sinyalinin patofizyolojik regülasyonu	18
Şekil 3.1.	Thoma lamı kutucuklarının şekilsel gösterimi.....	23
Şekil 4.1.	Farklı dozlardaki cıva klorüre maruziyetin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi.....	31
Şekil 4.2.	Farklı dozlardaki metil cıva klorüre maruziyetin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi.....	32
Şekil 4.3.	Farklı dozlardaki metformine maruziyetin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi.....	33
Şekil 4.4.	Farklı dozlardaki kafeine maruziyetin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi.....	34
Şekil 4.5.	Cıva klorür ve metformine birinci hücre siklusu sonunda maruziyetin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi	35
Şekil 4.6.	Cıva klorür ve metformine ikinci hücre siklusu sonunda maruziyetin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi.....	36
Şekil 4.7.	Metil cıva klorür ve metformine birinci hücre siklusu sonunda maruziyetin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi.....	37
Şekil 4.8.	Metil cıva klorür ve metformine ikinci hücre siklusu sonunda maruziyetin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi.....	37
Şekil 4.9.	Cıva klorür ve kafeine birinci hücre siklusu sonunda maruziyetin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi.....	38
Şekil 4.10.	Cıva klorür ve kafeine ikinci hücre siklusu sonunda maruziyetin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi.....	38
Şekil 4.11.	Metil cıva klorür ve kafeine birinci hücre siklusu sonunda maruziyetin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi.....	40
Şekil 4.12.	Metil cıva klorür ve kafeine ikinci hücre siklusu sonunda maruziyetin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi.....	40

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bizim çalışmamızda kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

$\mu\text{g/ml}$	1 ml'deki mikrogram ağırlık
$\mu\text{g/l}$	1 l'deki mikrogram ağırlık
$\mu\text{g/kg}$	1 kg'daki mikrogram ağırlık
μM	Mikro molar
mg/kg	1 kg'daki miligram ağırlık
mg/l	1 l'deki gram ağırlık
mg/m^3	m^3 'teki miligram ağırlık

Kısaltmalar

Açıklamalar

Aβ	Amiloid beta
A₁	Adenozin 1
A_{1A}	Adenozin 1A
A_{2A}	Adenozin 2A
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ADP	Adenozin difosfat
AH	Alzheimer hastalığı
AMP	Adenozin monofosfat
ALS	Amyotrofik lateral skleroz
AMPK	Adenozin mono-fosfatla aktive protein kinaz
ATP	Adenozin trifosfat
Ca⁺²	Kalsiyum iyonu
CaM	Kalmodulin
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
CaMKKβ	Ca ⁺² /kalmodulin bağımlı protein kinaz β
CAT	Katalaz

Kısaltmalar	Açıklamalar
COX-2	Siklooksijenaz 2
DNA	Deoksiribonükleik asit
EPA	Çevre Koruma Ajansı
FBS	Fötal sığır serumu
FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Ajansı
GABA	Gama amino bütirik asit
GPx	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
GS	Glutasyon sentaz
GSH	Glutasyon
GSL	Glutamat sistein ligaz
GSSG	Okside glutasyon
GST	Glutasyon-S-transferaz
HgCl₂	Cıva klorür
IMS	Uluslararası Pazarlama Servisi
JECFA	Gıda Katkıları FAO/WHO Ortak Uzmanlar Komitesi
KBB	Kan beyin bariyeri
LKB1	Karaciğer kinaz B1
MeHg	Metil cıva
MeHgCl	Metil cıva klorür
mTOR	Memeli hedef rapamisin proteini
MTT	3-[4,5-dimetitiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolyum bromür
MS	Multipl Skleroz
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH/H⁺	İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
Na⁺/K⁺-ATPaz	Sodyum potasyum adenozin trifosfataz
NaNO₂	Sodyum nitrit
NaNO₃	Sodyum nitrat
NIOSH	Amerikan Ulusal İş Sağlığı ve Güvenliği Enstitüsü
NMDA	N-metil-D-aspartat
NO	Nitrik oksit

Kısaltmalar	Açıklamalar
NOS	Nitrik oksit sentaz
NO_x	[Nitrit + Nitrat]
eNOS	Endotelyal nitrik oksit sentaz
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
nNOS	Nöronal nitrik oksit sentaz
NR1	A _{2A} /cAMP/PKA/NMDAR
ONOO-	Peroksinitrit
OSHA	İş Sağlığı ve Güvenliği Kurumu
PARP	Poli adenzin difosfat riboz polimeraz
PBS	Fosfat Tamponu
PH	Parkinson hastalığı
PKA	Protein kinazA
PS1	Presenilin 1
RfD	Oral referans doz
RNS	Reaktif nitrojen türleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
S6K1	Ribozomal S6 kinaz 1
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SOD	Süper oksit dismutaz
SSS	Santral sinir sistemi
Thr 172	Treonin 172
TWA	Eşik limit değeri

1. GİRİŞ

Cıva bileşiklerine hava, su, gıda, farmasötikler, kozmetik ürünler aracılığıyla sıklıkla maruz kalınmaktadır. Bu bileşikler besin zincirinde birikmeleri nedeniyle büyük bir çevresel sorun oluşturmaktadırlar (Zahir, Rizwi, Haqb and Khanb, 2005). Doğada elementel (cıva buharı), inorganik cıva ve organik metil cıva (MeHg) formlarında bulunmakta olup her birinin ayrı toksikolojik profili ve kendine özgü klinik semptomları vardır (Clarkson, Magos ve Myers, 2003). İnsanlarda çok çeşitli advers etkilere neden olan yaygın bir çevresel toksindir (Guzzi ve La Porta, 2008) ve aynı zamanda çevrede her yerde bulunabilen çok iyi bilinen bir nörotoksindir (Song ve Choi, 2013). Cıva, nörolojik ve psikiyatrik bulgulara yol açacak biçimde beyinde birikir (Sieger, Silva, Ardila ve Garcia, 2012). MeHg'nın yaygın olarak hücrel hedeflerle etkileşime girdiği ve birçok hücrel fonksiyonu etkilediği bildirilmiştir (Xu ve diğerleri, 2012).

Demans, Dünya Sağlık Örgütü tarafından hafıza, düşünme, yön bulma, kavrama, öğrenme kapasitesi, dil yeteneği ve muhakeme gücü dahil beyin fonksiyonlarının bozulması ile karakterize bir bozukluk olarak tanımlanır (World Health Organization, 1992). Alzheimer hastalığı (AH) ise demansın en sık görülen formu olup (World Health Organization, 1992) aynı zamanda en sık rastlanan nörodejeneratif hastalıktır (Hroudová, Singh ve Fisar, 2014). 2010 yılında dünya çapında demanslı toplam kişi sayısının 35,6 milyon olduğu ve bu sayının 2030 yılına kadar ikiye katlanarak 65,7 milyonu bulacağı ve 2050 yılına kadar ise 115,4 milyona ulaşacağı düşünülmektedir (Gulland, 2012). Tüm dünyada bu bozukluğun görülme sıklığında artış olmasına rağmen, demans tam olarak tedavi edilememektedir ve demansa karşı koruyucu mekanizmalar da tam olarak aydınlatılamamıştır.

Santral sinir sistemi (SSS), cıva toksisitesinden etkilenen en hassas organlardan birisidir (Xu ve diğerleri, 2012). Erişkinlerde MeHg'nın etkisi, doza ve maruziyet süresine bağlıdır. Meydana gelen etki, maruziyet ve belirtilerin ortaya çıkması arasında geçen latent süre ile karakterize olup bu uzun sürenin altında yatan mekanizma ise hala bilinmemektedir (Guzzi ve La Porta, 2008). Ek olarak, her yıl doğan yaklaşık 500.000 çocuğun kan cıva seviyeleri, 5,8 mg/l'nin üzerinde olup bu seviye kognitif bozukluk ile ilişkili bulunmuştur (Newland, Paletz ve Reed, 2008).

Yapılan klinik çalışmalar sağlıklı bireylere kıyasla Alzheimer hastalarının kanlarında veya beyin dokularında belirgin ve yüksek miktarlarda cıva bulunduğunu göstermiştir. Bu bulgular nörodejeneratif hastalıklarda cıvanın rol oynadığını düşündürmektedir (Lu ve diğerleri, 2011). MeHg'nın ana etki mekanizması hala çözülememiş olmakla birlikte, maruziyetinin SSS fonksiyonları üzerindeki etkileri ve bunların sonuçlarını anlamak için çalışmalar büyük önem taşımaktadır (Aschner, Syversen, Souza, Rocha ve Farina, 2007). Ek olarak, beyinde organik cıva bileşiklerinin dealkilasyonu ile merkürük cıva oluşumu gözlemlenebildiğinden inorganik cıva klorür (HgCl_2) ile çalışma yapılmaktadır (Pieper ve diğerleri, 2014). MeHg'nın aksine, inorganik HgCl_2 'ün toksik etkileri hakkında daha az bilgi olmasına rağmen inorganik cıva da kan-beyin bariyerini (KBB) geçebilir ve beyinde yüksek konsantrasyonlarda birikebilir (Xu ve diğerleri, 2012).

Cıva çok sayıda hücrel enzimi, stratejik metabolik yolları etkilemekte olup, dendritlerin ve aksonların yapısını ve sinaptik aktiviteyi değiştirebilmekte ve nöronal oksidatif stres mekanizmalarını tetikleyebilmektedir (Sieger, Silva, Ardila ve Garcia, 2012). Ayrıca HgCl_2 , nörotoksitesi uzun latent süreye sahip birçok makromolekül ile etkileşime girebilen daha reaktif bir cıva formudur; örneğin HgCl_2 'ün hippokampal nöronlardaki L tipi Ca^{+2} kanallarını bloke etmede MeHg'dan beş kat daha potent olduğu bilinmektedir (Xu ve diğerleri, 2012; Szücs, Angiello, Salánki ve Carpenter, 1997). Birçok çalışma, MeHg toksisitesini değiştirmede glutatyonun (GSH) kritik rol oynadığını göstermekte olup MeHg intraselüler konsantrasyonunun artmasıyla meydana gelen reaktif oksijen türlerine karşı koruma için GSH tarafından güçlenen koruma olup olmadığı hala belirsizdir (Kaur, Aschner ve Syversen, 2006).

Biguanid türevi olan metformin ise özellikle Tip 2 diyabet tedavisinde oldukça yaygın olarak kullanılan oral antidiyabetik bir ilaçtır (Bridges, Jones, Pollak ve Hirst, 2014). "Adenozin mono-fosfatla aktive protein kinaz (AMPK)" metabolizmada birçok hemostatik mekanizmada görev alan önemli bir düzenleyicidir (Hardie, Ross ve Hawley, 2012). Tip 2 diyabetli bireylerde metforminin AMPK aktivitesini artırdığı gözlenmiştir (Musí ve diğerleri, 2002). Nöronlarda ise, AMPK'nin enerji homeostazında ve nöron hücrelerinin korunmasında kritik bir rol oynadığı düşünülmektedir (Poels, Spasic, Callaerts ve Norga, 2009). Culmsee, Monnig, Kemp ve Mattson (2001) AMPK'nin çeşitli nörodejeneratif hastalıkların patogeneziyle ilişkili metabolik bozukluklara karşı nöronları koruyabileceğini gösteren bulgular elde etmişlerdir. Metforminin *in vitro* olarak AMPK aktivasyonunu

yeniden düzenleyerek nörotoksisiteyi azalttığı tespit edilmiştir (Dulovic ve diğerleri, 2014). Ancak, adenosin trifosfat (ATP) sentezini inhibe eden $HgCl_2$ maruziyetinde AMPK aktivitesinin mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna etkisini gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır.

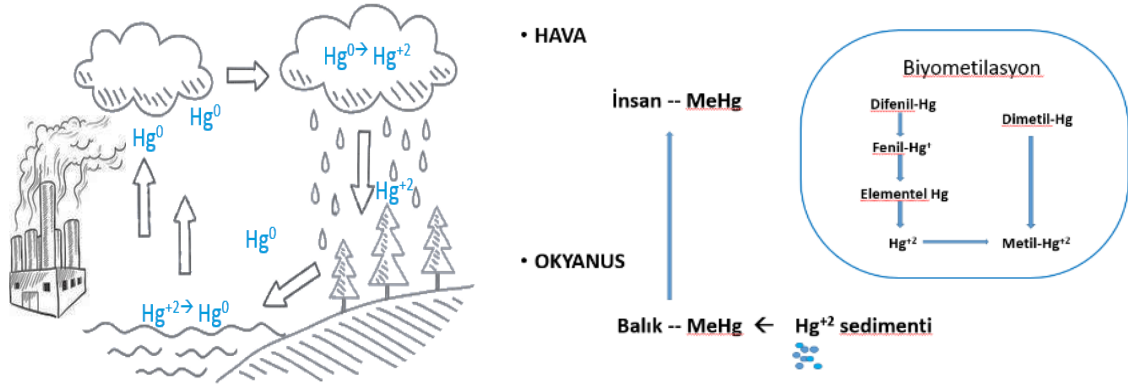
Öte yandan günlük hayatta çok yaygın kullanımı olan kafeinin sağlık üzerine olası etkileri, bireylerin özellikle kahve tüketimini bilinçli bir tercih olarak seçmesi ve halk sağlığı açısından oldukça önemlidir (Choi ve Curhan, 2007). Kafein kalsiyum kanalları ilişkili voltaj düzenlenmesini tetiklemektedir. Meydana getirdiği eksitasyonu indükleyen beyin uyarısı nedeniyle yaygın biçimde tüketilir (Cauli ve Morelli, 2005). Farmakolojik çalışmalar kafeinin birincil olarak santral sinir sistemi etkilerinin adenosin reseptörlerinin adenosin 1 (A_1) ve adenosin 2A (A_{2A}) alttiplerinin antagonistik etkisi ile yönetildiğini göstermektedir (Fredholm, Battig, Holmen, Nehlig ve Zvartau, 1999). Parkinson ilişkili bozukluklarda kafeinin nöronlarda koruyucu rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (Schwarzschild ve diğerleri, 2003).

Bu çalışmanın amacı; muhtelif konsantrasyonlarda organik ve inorganik cıva bileşiklerine maruz kalan SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde, nöron apoptozunu ve oksidatif stresi kontrol eden metformin ile A_{2A} reseptör antagonisti olan kafeinin hücre ölümüne etkisini incelemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Cıva

Cıva buharı doğal ve insan kökenli kaynaklardan atmosfere salınır, volkanlar ise yerel özelliklere bağlı olarak cıva için doğal kaynaktır, daha sonra cıva yağmur suları ile birlikte yeryüzüne iner (Fitzgerald ve Clarkson, 1991).



Şekil 2.1. Cıvanın küresel siklusu (Clarkson, Magos ve Myers, 2003) (MeHg : Metil cıva, Hg: Cıva, Hg⁰: Elementel cıva, Hg⁺: +1 değerlikli cıva, Hg⁺²: +2 değerlikli cıva)

Cıvanın biyometilasyonunun yanı sıra cıva siklusunun önemli özellikleri, biyokonsantrasyon (özellikle suda planktonlar ve yüzen materyallerde cıva miktarının artması), biyoakümülyasyon (yaşam süresi boyunca balıklarda cıva seviyelerinin artması) ve biyomagnifikasyona (trofik besin zincirinde MeHg yüzdesi ve cıva seviyelerinin artması) yol açmasıdır (Baeyens ve diğerleri, 2003). Genel olarak, maruziyet hava ve sudaki cıva miktarına bağlı olsa da en önemli günlük maruziyet kaynağı besinlerdir (World Health Organization, 1990). Organik MeHg dışında başka bir cıva türü de etil cıva formundaki tiyomersal olup aşıların yapısına koruyucu olarak katıldığı bilinmektedir. Merkürük katyon olan Hg⁺², cıvanın tüm inorganik formları arasında en toksik olanıdır (Clarkson ve Magos, 2006).

Hem metalik hem de organik formdaki yüksek miktarlarda cıva beyinde veya fetal dokularda birikebilmektedir (Rischer ve Dewoskin, 1999). Bunun en büyük göstergesi olan cıva maruziyeti felaketi Minamata Körfezi'nde Kumamoto, Japonya'da 1956 yılında keşfedilmiştir ve ikinci salgın Agano Nehri'nde Niigata, Japonya'da 1965 yılında ortaya çıkmıştır (Eto, 2000). Dünya'da bir diğer yaşanan cıva felaketi ise Irak'ta 1971 yılının

sonlarında meydana gelmiş olup MeHg ile muamele edilen buğdayı tüketen bireylerin kanında çok yüksek miktarlarda cıva seviyelerine rastlanmıştır (Bakir, Rustam, Tikriti, Al-Damluji ve Shihristani, 1980).

Cıvanın inorganik formları, sıvı metalik cıva ve onun buharı biçiminde veya cıvalı bileşikler, merkürük cıva ve dental amalgam içeriğinde bulunur (Clarkson ve Magos, 2006). Elementel cıva, termometrelerde, termostatlarda, dental amalgamlarda ve cıva katkılı lateks boyalarda bulunmakta olup bunlar buhar yoluyla vücuda girerler (Patrick, 2002). Amalgam, bir metaller karışımı olup gümüş renkli diş dolgusu, yaklaşık %50 metalik cıva, %35 gümüş, %9 kalay ve eser miktarda çinko içerir (Risher ve Dewoskin, 1999). Genel olarak, amalgamlardan salınan cıva buharı akciğerlerden absorpsiyon yoluyla kan dolaşımına girdikten sonra kan beyin bariyerinden difüzyon ile beyne ulaşır (Clarkson ve Magos, 2006). Bu nedenle, inorganik cıva kaynağı dental amalgamın da nörodejeneratif hastalıklardan biri olan AH'na etkisi olabileceği veya neden olan etkileri artırabileceği düşünülmektedir (Mutter, Naumann, Sadaghiani, Schneider ve Walach, 2004).

Cıvanın özellikle madencilikte ve diş hekimleri tarafından kullanıldığı düşünüldüğünde mesleki maruziyet açısından da cıvanın risk teşkil ettiği düşünülebilir. Amerika Birleşik Devletleri (ABD) İş Sağlığı ve Güvenliği Kurumu (OSHA), günlük 8 saat çalışma üzerinden hesaplanan ve günlük ortalama konsantrasyonlar olarak inorganik cıva için 0,1 mg/m³ (OSHA, 1978b), alkilli cıva için 0,01 mg/m³ (OSHA, 1976a) eşik limit değerlerini (TWA) önermektedir. Amerikan Ulusal İş Sağlığı ve Güvenliği Enstitüsü (NIOSH) ise günlük 8 saat çalışma üzerinden hesaplanan ve deriden maruziyet ile günlük ortalama konsantrasyonlar olarak inorganik cıva için 0,05 mg/m³ (NIOSH, 1994a), alkilli cıva için 0,01 mg/m³ (NIOSH, 1994b) eşik limit değerlerini (TWA) önermektedir. Çevre Koruma Ajansı (EPA), kritik etkisi gelişimsel nörofizyolojik hasar olarak belirtilen MeHg'nin günlük alınmasına izin verilen – oral referans dozunu (RfD) 0,0001 mg/kg olarak belirlemiştir (EPA, 1987). EPA, kritik etkisi otoimmün etkiler olarak belirtilen HgCl₂'ün günlük alınmasına izin verilen – oral referans dozunu (RfD) 0,0004 mg/kg olarak belirlemiştir (EPA, 1995). Türkiye'de ise günlük 8 saat çalışma üzerinden hesaplanan cıva oksit ve HgCl₂ dahil olmak üzere cıva ve iki değerlikli inorganik cıva bileşiklerinin (cıva olarak ölçülen) mesleki maruziyet eşik limit değeri 0,02 mg/m³ (TWA) olarak belirlenmiştir (Kimyasal Maddelerle Çalışmalarda Sağlık ve Güvenlik Hakkında Yönetmelik, 2013).

2.1.1. Organik cıva

MeHg, tatlı ve okyanus sularındaki canlı sedimentlerinde bulunan mikroorganizmalar tarafından inorganik cıvanın metilasyonu ile birçok su canlısının yapısına katılır (Clarkson ve Magos, 2006). Özellikle balık gibi MeHg ile kontamine gıdaların tüketilmesi insanlarda organik cıvaya en yaygın maruziyet kaynağıdır (Guzzi ve La Porta, 2008). Özellikle köpek balığı, kılıç balığı ve Akdeniz ton balığında 1200 µg/kg'dan fazla yüksek miktarda MeHg besin yollu önemli maruziyet kaynağıdır; bunun dışında cıva besinlerde özellikle inorganik formda olup tespit limitinin (20 µg cıva/kg yaş ağırlık) altındadır (World Health Organization, 1990). Balıkta fazla miktarda MeHg birikimi tatlı su göllerinin ve nehirlerin veya korunaklı okyanus körfezlerinin lokal olarak kirlenmesine bağlı olarak da meydana gelebilir (Clarkson ve Magos, 2006).

Yapılan bir insan otopsi incelemesinde oksipital lob korteks bölgesindeki ortalama organik MeHg miktarı 6 µg/kg iken kandaki konsantrasyon 2,7 µg/l bulunmuştur (Björkman ve diğerleri, 2007). Türkiye'de 125 bireyin sağ serebellar lob dokusu otopsi incelemeleri sonucunda ortalama cıva seviyesinin 167.18 ± 38.57 µg/l olduğu bulunmuştur (Kaya, Aliyev, Iritas ve Soylemezoglu, 2009).

2.1.2. İnorganik cıva

İnorganik cıva, GSH ile kompleks oluşturarak safra yoluyla karaciğeri terketmektedir, KBB'ni ve plasental bariyerleri geçme kapasitesi kısıtlıdır ve özellikle böbreklerde birirmektedir (Clarkson ve Magos, 2006). Organik MeHg'nın aksine, HgCl₂'ün toksik etkileri hakkında çok az bilgi mevcuttur (Xu ve diğerleri, 2012). İnorganik cıva kandan beyne kolaylıkla geçemediği düşünülmeyle birlikte, nöronlarda meydana getirdiği hasarın mekanizması bilinmemektedir. Bununla birlikte inorganik cıva yüksek miktarlarda yutulduğunda mide ve bağırsaklarda bulantı, diyare, şiddetli ülsere neden olabilmektedir (Risher ve Dewoskin, 1999).

Diğer taraftan, yapılan bir insan otopsi incelemesinde oksipital lob korteks bölgesindeki ortalama inorganik cıva miktarı 12 µg/kg iken kandaki konsantrasyon 2,3 µg/l bulunmuştur (Björkman ve diğerleri, 2007). HgCl₂'ün toksisitesi inkübasyon zamanı ile artmaktadır (Pieper ve diğerleri, 2014).

2.2. Nöral Bozukluklar

Beyinde serbest radikallerin aşırı artması, oksidatif radikaller ve antioksidan mekanizmalar arasındaki dengenin nörodejeneratif hastalıkların patogeneziyle ilişkili olduğu bilinmektedir (Moneim, baskıda). Beynin reaktif oksijen radikallerini (ROS) ortadan kaldırma kapasitesi sınırlıdır, bu nedenle ROS'un artışı veya antioksidan eksikliği durumunda beyinde ilk etkilenen hücreler nöronlar olmaktadır (Kern ve diğerleri, 2012). Mitokondriyal fonksiyon bozuklukları ve eksitotoksisite ve sonunda apoptoz, patolojik olarak, yaşlanma ve AH, Parkinson hastalığı (PH), Multipl Skleroz (MS) ve amiotrofik lateral skleroz (ALS) gibi nörodejeneratif hastalıklara neden olur (Uttara, Singh, Zamboni ve Mahajan, 2009). AH, en yaygın nörodejeneratif bozukluklardan biridir (Hock ve diğerleri, 1998). Bu hastalık aynı zamanda diğer demans bozuklukları gibi nöronların kortikal ve subkortikal alanlarda geniş sinaptik kaybı ile karakterizedir (Masliah, Terry, Deteresa ve Hansen, 1989). Sinapslardan glutamat alımının inhibisyonu, özellikle AH olmak üzere çeşitli nörodejeneratif hastalıkları etkilemektedir, bu hastalıklarda özellikle oksidatif hasar ve eksitotoksisitenin rolü vardır (Lauderback ve diğerleri, 2001). Cıva, birçok çevresel kirlenici gibi nörodejeneratif hastalıklara neden olabilmekte ve bunu mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, oksidatif stres, protein döngüsünün bozulması ve beyinde inflamatuvar reaksiyonların başlatılması ile yapmaktadır (Monnet-Tschudi, Zurich, Boschat, Corbaz ve Honegger, 2006).

2.3. Cıva Nörotoksisitesi

2.3.1. Organik cıva nörotoksisitesi

MeHg beyinde birikerek mitokondri, endoplazmik retikulum, golgi kompleksi, çekirdek zarı ve lizozomlarla etkileşmeye başlamaktadır (Atchison ve Hare, 1994). Uzun dönemli MeHg maruziyeti sonucunda demetilasyon ile beyinde inorganik cıvanın yavaş biçimde biriktiği düşünülmektedir (Vahter ve diğerleri, 1995). Astrositlerde birikme, glutamat tutulumunu spesifik olarak inhibe etme, nöronal fonksiyon bozukluğu ayrıca reaktif oksijen radikallerinin oluşumuna katkıda bulunma gibi birçok kritik bulgu MeHg ile uyarılmış nörotoksisiteye işaret etmektedir (Aschner ve diğerleri, 2007).

Minamata körfezinde yaşanan felakette, ataksi, görme alanlarında bilateral eşmerkezli büzülme, sağırılık ve konuşma bozukluğu, mental bozukluklar, titreme gibi nörolojik değişimler gözlenmiş olup bu hastalığa Minamata Hastalığı denilmektedir (Ceccatelli, Daré ve Moors, 2010). Yüksek seviyelerdeki maruziyetlerde MeHg'nın insanlarda ve hayvanlardaki nöropatolojik etkileri kalitatif ve kantitatif benzerlikler göstermektedir (Burbacher, Rodier ve Weiss, 1990). Yapılan bir çalışmada ortalama kan cıva konsantrasyonlarının AH olan bireylerde kontrole göre iki kattan fazla olduğu, hatta hastalığın erken evresinde üç kata kadar yükseldiği bulunmuştur (Hock ve diğerleri, 1998).

2.3.2. İnorganik cıva nörotoksitesitesi

Birçok vaka çalışması diş pudraları, merhemler, laksatiflerin terapötik ajanlarla oral olarak alınması ile inorganik cıvanın insanlarda nörotoksitesiteyi tetiklediği gösterilmiştir. İnorganik $HgCl_2$ *in vitro* olarak astrosit lizatlarındaki glutamin sentetaz aktivitesini inhibe etmektedir (Allen, Mutkus ve Aschner, 2001). MeHg'nın, kan beyin bariyerini geçerek orada biyotransformasyonu sonucu inorganik cıvanın beyin hasarına neden olduğu ileri sürülmüştür (Davis ve diğerleri, 1994). $HgCl_2$ 'ün oksidatif hasara öncülük eden serbest radikallerin üretimini sinaptozomlarda artırdığı gözlenmiştir (Hussain, Rodgers, Duhart ve Ali, 1997). Yüksek konsantrasyonlarda inorganik cıva sitotoksik kalsiyumu doğrudan artırmaktadır (Rossi ve diğerleri, 1997). İnorganik $HgCl_2$ 'ün SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde sitotoksitesiteyi ve oksidatif stresini indüklediği ve bu sayede AH'nın patofizyolojisine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir (Olivieri ve diğerleri, 2000). Ayrıca, EPA'nın içme sularındaki inorganik cıvanın hiçbir önemli advers sağlık etkisi yaratmayacak günlük maruziyet limitini 2 $\mu g/l$ olarak belirlemiştir (Risher ve Dewoskin, 1999). İnorganik cıva maruziyetinin metalin türüne, maruziyet süresine ve cıvaya maruziyet sırasındaki stres miktarı ve egzersize bağlı olarak bir nörodejeneratif hastalık olan ALS'nin meydana gelmesi ile ilişkili olan kortikomotor nöronlar üzerinde etkisi olduğu tahmin edilmektedir.

2.4. Metformin

Bilindiği üzere, metformin Tip 2 diyabet hastalarında yaygın olarak kullanılan bir ilaçtır. Dünya Sağlık Örgütü'nün yayımladığı halk sağlığının gözetiminde öncelikli olan “Temel İlaçlar” listesinde metformin yer almaktadır (World Health Organization, 2013).

Uluslararası Pazarlama Servisi (IMS) verilerine göre metformin ABD’de yıldan yıla giderek artan sayılarla 2012 yılında 61,6 milyon hastada kullanılmış olup 2008 ile 2012 yılları arasında en çok kullanılanlar listesinde ilk on ilaç arasında sekizinci sırada yer almıştır (IMS Health, 2012). Metformin Tip 2 diabetes mellitus tedavisinde, özellikle aşırı kilolu hastalarda egzersiz ve diyet ile yeterli glisemik kontrolün sağlanamadığı durumlarda bazal ve postprandiyal plazma glukoz seviyelerinin azaltılmasında kullanılır (Aurobindo Pharma Limited, 2010). Diyabet hastalarında metforminin özellikle glukoneogenezi azalttığı gözlenmiştir (Hundal ve diğerleri, 2000).

AMPK, tüm ökaryotlarda çoklu biyokimyasal yolların düzenlenmesi ile enerji dengesini kontrol eden sinyallerin en önemli bütünleyicisidir (Steinberg ve Kemp, 2009). AMPK’nin katalitik α alt ünitesi ve düzenleyici β ve γ alt üniteleriyle heterotrimerik kompleksten oluşmaktadır (Steinberg ve Kemp, 2009). Memelilerde, her bir alt ünite için alternatif izoformlar ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$ and $\gamma 3$) mevcuttur ve bu nedenle en az 12 tip potansiyel heterotrimerik AMPK kompleksi olasıdır (Ramamurthy, Chang, Cao, Zhu ve Ronnett, 2014). Hipotalamik AMPK’nin enerji üretimini kontrol ederek metabolik yolların aktivasyonu ile nöronların metabolizma ve fonksiyonuna katkıda bulunmaktadır (Stark, Ashley ve Andrews, 2013).

Temel olarak, hücrel stresin neden olduğu katabolik hız ATP tüketiminin hızına yetişemezse, adenosin difosfat (ADP) seviyeleri yükselecek ve ATP seviyeleri düşecektir; ADP adenilat kinaz ile adenosin monofosfat (AMP)’ye dönüşecektir ve ATP’nin azalması da AMPK’nin aktive olmasına neden olmaktadır (Hardie, 2004). Glukoz ve lipid metabolizmasında merkez rol oynayan AMPK, Ca^{+2} seviyelerinin yükselmesine bağlı olarak kalmodulin-bağımlı protein kinaz kinaz beta ile ve AMP/ATP oranının artışına bağlı olarak karaciğer kinaz B1 (LKB1) kompleksi ile treonin 172 (Thr 172)’nin fosforilasyonu ile aktive olmaktadır (Cai, Yan, Li, Quazi ve Zhao, 2012). AMPK aktivasyonu, memeli hedef rapamisin proteini (mTOR) ve S6 kinazın fosforilasyonunun azalmasıyla da ilişkilidir (Zakikhani, Dowling, Fantus, Sonenberg ve Pollak, 2006). AMPK sistemi, hücrel AMP/ATP oranının artmasıyla tetiklenen LKB1 ile ya da spesifik hücrelerde Ca^{+2} ’un yükselmesiyle değişir, sistemi tetikleyen ne olursa olsun AMPK aktivasyonu glukoz, kolesterol sentezinde artış ve hücre büyümesini sağlar (Hardie, 2008).

2.4.1. AMPK'yi aktive eden metforminin nöronlardaki etkisi

Sıçanlarda yapılan bir çalışmada, metforminin terapötik dozlarda primer kortikal nöronlarda etanol ile indüklenmiş hücre ölümünde ciddi seviyede nöronları koruyucu etkileri gözlenmiştir (Ullah, I., Ullah, N., Naseer, Lee ve Kim, 2012). Öte yandan, nörodejeneratif hastalığa sahip fareler üzerinde yapılan deneyde ise oral yolla metforminin ATP tüketimli prosesleri azaltan ve ATP üretimli hücresel prosesleri kolaylaştıran AMPK aktivasyonunu beyinde artırdığı ve böylece KBB'yi geçerek beyinde farmakolojik bir etki yarattığı gözlemlenmiştir (Ma ve diğerleri, 2007).

Ca^{+2} /kalmodulin bağımlı protein kinaz β (CaMKK β)'nin dokularda dağılımı LKB1'e göre daha kısıtlı olup, özellikle nöronlarda ve endotelial ve hemopoietik hücrelerde oldukça bol bulunmaktadır (Hardie, 2008). Embriyonik dönemde AMPK'nın α_2 ve β_2 alt ünitelerinin mRNA seviyeleri beyinde yüksek bulunmuş olup nöronlarda en fazla α_2 katalitik alt ünitesinin eksprese olduğu ve bunun da astrositleri aktive ettiği gözlenmiştir (Turnley ve diğerleri, 1999). AMPK enerji sensörü olarak nöronları da etkilemekte, aşırı aktivasyonu, mTOR yolağının inhibisyonu ile akson oluşumunu inhibe etmektedir (Williams, Courchet, Viollet, Brenman ve Polleux, 2011). Nöronlar, selüler ATP konsantrasyonlarının azalmasına eşlik eden glutamat stimülasyonuna cevapta fosforile AMPK'nin seviyelerini artırmaktadır (Weisová, Concannon, Devocelle, Prehn ve Ward, 2009).

2.4.2. AMPK'yi aktive eden metformin ile nörotoksisite ilişkisi

Nöronal aktivite oldukça enerji bağımlı olup, özellikle mitokondriyal fonksiyon değişikliklerine hassastırlar (Galindo, Ikuta, Zhu, Casadesus ve Jordan, 2010). Salminen, Kaarniranta, Haapasalo, Soininen ve Hiltunen (2011), AMPK'nin nöroprotektif rolü olabileceğini ve AH'nın patogenezi baskılayabileceğini; AMPK tau fosforilasyonunu azaltıp AH'nın inflamatuvar cevabını inhibe ettiğini belirtmektedir (Salminen, Kaarniranta, Haapasalo, Soininen ve Hiltunen, 2011). Buna karşın, Vingtdeux ve arkadaşları (2011), AMPK aktivasyonunun AH'nda görülen serebral senil plakların oluşmasından sorumlu olan amiloid β (A β) plaklarının degradasyonunu arttırdığını göstermiştir (Vingtdeux ve diğerleri, 2011).

Hipoksi veya iskemi gibi patolojik durumlarda AMP ve LKB1 bağımlı mekanizması oldukça önemli hale gelmekte iken normal nöral aktivite tarafından üretilen şiddetli uyarılma süresince $Ca^{+2}/CaMKK\beta$ mekanizmasının AMPK aktivasyonu için oldukça önemli olabileceği vurgulanmaktadır (Hardie ve Frenguelli, 2007).

2.5. Kafein

Kafein, bilindiği üzere dünyada en yaygın tüketilen farmakolojik özelliği olan etkin maddedir. Neredeyse tüm kafein kaynağı içecek ve yiyecekler gibi gıdalar olup bunların en önemlisi kahvedir. Kahve dışında ise çay ve kola gibi içecekler ve küçük porsiyon çikolata da kafein kaynakları arasındadır (Ross, Abbott, Petrovitch, White ve Tanner, 2000). Sindiriminin ardından kafein hızla ve tamamen sindirim sisteminden kan dolaşımına geçer. Kafein kan beyin bariyerini de geçmektedir (Nawrot ve diğerleri, 2003). Bir kahve fincanı 0,4 mg/kg ila 2,5 mg/kg doz kafein içermektedir. Bu da yaklaşık 1 μ M ila 10 μ M veya 0,25 mg/l ila 2 mg/l pik plazma konsantrasyonuna denk gelmektedir (Fredholm ve diğerleri, 1999). Sıçanlarda yapılan bir çalışmaya göre kafeinin serebrospinal sıvı konsantrasyonu, beyin konsantrasyonu ve plazma konsantrasyonunun açık biçimde birbiriyle aynı olduğu bulunmuştur (Liu ve diğerleri, 2006).

2.5.1. Kafeinin nöronlardaki etkisi

Endojen nöromediyatör olan adenozinin miktarı, artmış nöronal aktivite, hipoksi ve iskemi sonucu artmakta olup bağlandığı adenosin reseptörlerinin ana görevi sinir aktivitelerini ve transmitter salınımını düzenlemek ve diğer transmitter sistemlerle etkileşime girmektir (Fredholm, Chen, Cunha, Svenningsson ve Vaugeois, 2005).

Birçok çalışma kafeinin adenosin reseptör antagonisti olarak nöroprotektif etki yaptığını göstermektedir (Chen ve diğerleri, 2001). Adenosin ve adenosin reseptörlerinin beyindeki esas rolü nörotransmitterler tarafından düzenlenen cevapları değiştirmektir (Cauli ve Morelli, 2005).

Kafein, presinaptik A_1 ve A_{2A} reseptörlerini bloke etmektedir. (Yoshimura, 2005). Kafein, noradrenerjik nöronlara etki etmekte ve dopaminin lokal olarak serbest bırakılmasını etkilemektedir (Nehlig, Daval ve Debry, 1992). SH-SY5Y hücre hattı üzerinde yapılan bir

çalışmada kafeinin hipoksi ile indüklenen hücre hasarını belirgin biçimde azalttığı bulunmuştur (Tanaka ve diğerleri, 2013). İnsanlarda kafein absorbe olduktan sonra paraksantin, teobromin ve teofiline sırasıyla %67,3, %24,4 ve %8,3 oranlarında metabolize olduğu tespit edilmiştir (Lelo, Miners, Robson ve Birkett, 1986).

2.5.2. Kafein ile nörotoksisite ilişkisi

Orta yaş döneminde makul seviyelerde kafein tüketimi ilerleyen dönemlerde demans ve AH riskini azaltmaktadır (Eskelinen, Ngandu, Tuomilehto, Soininen ve Kivipelto, 2009). Bunu aynı zamanda 11 insan kohort ve vaka çalışması da desteklemekte olup AH'nin insidansındaki azalma ile düzenli kafein alımının kognitif fonksiyonlar üzerinde koruyucu etkileri olduğu sonucuna varılmıştır (Santos, C., Costa, Santos, J., Vaz-Carneiro ve Lunet (2010). Günde üç bardak kahve tüketimi olan birinde özellikle kafein ve onun primer metabolitlerinin uzun bir süre plazmada kaldığı görülmüş olup çalışılan bileşiklerin detoksifikasyonu indüklediği, A β plak oluşumunu tetikleyen enzimleri baskıladığı düşünülmektedir (Lang ve diğerleri, 2013). Dahası motor stimulant olarak kafeinin tekrar tekrar tüketilmesi ile direnç oluşmasına rağmen kafeinin nöroprotektif etkilerinin azalmadığı sıçan kortikal nöronları üzerinde yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (Xu, K., Xu, Y. H., Chen ve Schwarzschild, 2002). Yine fareler üzerinde yapılan başka bir çalışma ile, A_{2A} reseptörlerinin upregülasyonu sonucu sinaptik fonksiyon bozukluklarının görüldüğü beyinde meydana gelen bozukluklarda ve kronik strese verilen bozulmuş adaptif cevaplara karşı doğru bir efektif hedef olabileceği sonucuna varılmıştır (Cognato ve diğerleri, 2010; Kaster, baskıda).

2.6. Oksidatif Stres

Yaygın olarak bilindiği üzere reaktif oksijen türleri (Reactive oxygen species-ROS), çeşitli metabolik olaylar sonucunda oluşan kararsız, oksijen içeren moleküllerdir. ROS'nin hücresel üretimi ve buna karşı antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin bozulmasına “oksidatif stres” adı verilir (Betteridge, 2000). ROS olan süper oksit anyon serbest radikalleri, hidroksil radikaller ve radikal oluşturan hidrojen peroksit aracılı peroksidatif hücre hasarının başladığı düşünülmektedir (Atchison ve Hare, 1994). Beyin ROS'ne karşı oldukça hassastır, bunun nedeni beynin vücuda göre %2'lik ağırlığı olmasına karşın %20'lik total oksijen tüketimindeki orantısızlık ve çok kolaylıkla perokside olabilen

yağ asitlerince zengin olması ve antioksidan moleküller ve enzimler bakımından sınırlı olmasıdır (Pong, 2003). Hücre hasarına yol açan radikallerin ortadan kaldırılmasında birçok enzim görev almaktadır. Normal koşullarda serbest radikallerin devamlı üretimi, süper oksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon-S-transferaz (GST) gibi endojen antioksidan savunma sistemi tarafından kontrol edilmektedir (Halliwell, 1991; Pong, 2003). SOD, CAT ya da glutatyon peroksidaz (GPx) tarafından H_2O ve O_2 'e hızlıca redükte olabilmesi için O_2^- iyonunu H_2O_2 'e dönüştürür (Fridovich, 1997; Dickinson ve Forman, 2002). Mitokondriyal H_2O_2 'i nötralize ederek suya dönüştüren GPx, bu dönüşüm üzerine GR tarafından GSH'un yeniden üretilmesine imkan sağlar (Ruszkiewicz ve Albrecht, baskıda).

Mitokondriler de hücrenin hayatta kalması ve ölümünde kilit düzenleyicilerdir, yaşlanmada merkezi role sahiptirler ve nörodejeneratif hastalıkların genetik oluşumlarını içine alan belirli birçok protein ile etkileşime girebilmektedir (Lin ve Beal, 2006). Mitokondri sinyâl iletiminde, kalsiyum homeostazında, hücre siklusunun düzenlenmesinde, apoptozda, serbest radikal üretiminde ve termogeneizde önemli rol oynamaktadır (Sas, Robotka, Toldi ve V'ecsei, 2007). Hücresel strese ve toksik uyarılara karşı mitokondrinin stabilizasyonu ya da mitokondriyal fonksiyonların düzenlenmesi nöronal canlılığın devamlılığını sağlayan yolların ve genlerin aktivasyonunda önemli rol oynamaktadır. (Lau ve Bading, 2009). Mitokondriyal ve mitokondriyal bileşenleri kodlayan nükleer deoksiribonükleik asitteki (DNA) mutasyonlar ve çevresel nedenlerle mitokondriyal fonksiyon bozukluğu oluşabilmektedir (Hroudová, Singh ve Fišar, 2014). Lin ve Beal (2006)'e göre olağan dışı protein birikimi veya yıkımı, oksidatif stres ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğu arasında ilişki bulunmakta olup, mitokondriyal fonksiyon bozukluklarının özellikle yaşlanmış beyinde ilgili genlerin hasar görmesine neden olabileceğini öne sürmektedirler (Lin ve Beal, 2006).

Glutamat, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptid olan GSH santral sinir sisteminde antioksidan, enzim kofaktörü, sistein depolama, majör redoks tamponu ve nöromediyatör olarak görev almakta ve nörodejeneratif hastalıklarda eksikliğine rastlanmaktadır (Aoyama, Watabe ve Nakaki, 2008). GSH memeli hücrelerinde en fazla bulunan tiyol kaynağı olup redoks dengesini sıkı bir şekilde kontrol ederek hücreler içerisindeki majör antioksidan mekanizmayı oluşturur (Franco ve Cidlowski, 2009). Okside glutatyon (GSSG) ve indirgenmiş/serbest formu GSH olup bunlardan yalnızca GSH antioksidan

aktiviteye katılabilmekte ve oksidatif stres sırasında, GSH, GSSG'nin oluşumuna öncülük eden reaktif oksijen radikallerini nötralize etmektedir (Guilford ve Hope, 2014). NADPH ise birçok enzimatik redoks reaksiyonunda non-enzimatik antioksidan olarak koruyucu aktivite göstermekte olup GSH'un indirgenmesine katkıda bulunur (Forman, Zhang ve Rinna, 2009).



Şekil 2.2. Glutatyon oluşumu ve siklusu (Guilford ve Hope, 2014) (GSL: Glutamat sistein ligaz, GS: Glutatyon sentaz, ROS: Reaktif oksijen radikalleri, NADP⁺: Okside nikotinamid adenin dinükleotit fosfat, NADPH/H⁺: İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit fosfat)

Azalmış antioksidan kapasite ile doğrudan ilişkili olan oksidatif stres vücudun savunma sisteminin kapasitesinin yetmediği durumlarda serbest radikal üretiminin olması ve homeostatik proseslerin zayıflamasıyla ortaya çıkar (Rahal ve diğerleri, 2014). Nöron ve astrosit primer hücre kültürü üzerinde GSH seviyelerinin MeHg ile indüklenmiş oksidatif strese karşı koruyucu olduğu bulunmuştur, bununla birlikte sınırlı GSH varlığının nöronları astrositlere göre MeHg toksisitesine karşı daha duyarlı hale getirdiği düşünülmektedir (Kaur ve diğerleri, 2006). *In vitro* bir çalışma, özellikle GPx enziminin, MeHg'nin neden olduğu peroksitlere olan hassasiyetin artması, lipid peroksidasyonunun artması ve hücre ölümünün gerçekleşmesi gibi durumlarda doğrudan inhibitör etkisi olduğunu göstermiştir (Farine ve diğerleri, 2009).

Reaktif oksijen türleri ile birlikte reaktif nitrojen türleri (reactive nitrogen species-RNS) de oksidatif stresin bir diğer kaynağıdır. Nitrik oksit bileşikleri, vasküler endotelde bulunan eNOS (endotelyal nitrik oksit sentaz – Tip III); beyinde, omurilikte ve periferel sinir sistemindeki nNOS (nöronal NOS – Tip I) ve immünolojik veya inflamatuvar uyaranlı

iNOS (indüklenebilir NOS – Tip II)’tur (Moncada, Higgs ve Furchgott, 1997). Reaktif nitrojen türleri, nitrik oksit radikalleri ile birlikte nitrik oksit ve süper oksit radikalleri arasındaki reaksiyon sonucu oluşan bileşiklerdir. Bunlardan özellikle, peroksinitrit redoks duyarlı hücresel proteinlerin, enzimlerin ve DNA’nın hasar görmesine ve membranların peroksidasyonuna neden olur (Aschner ve diğerleri, 2007).

2.6.1. Oksidatif stresin nöronlardaki etkisi

Oksidatif stres nörodejeneratif hastalıklarla ve yaşlanma süreciyle bağlantılı olup ROS canlı hücre bileşenleri, lipitler, proteinler ve nükleik asitleri okside etmesiyle nekrotik ya da apoptotik hücre ölümüne neden olan hücre hasarının kaynaklarından (Gilgun-Sherki, Melamed ve Offen, 2001). Oksidatif stres genel olarak, lipit peroksidasyonu, iyon homeostazının bozulması, protein ve DNA hasarı, poli adenosin difosfat riboz polimeraz (PARP) aktivasyonu, ATP depleksyonu, reseptör inaktivasyonu, tamir edilemeyen fizyolojik hasarlar, mitokondriyal hasar veya kaspaz aktivasyonu yaparak hücrelerin hasarına/ölümüne yol açarak nörodejeneratif hastalıkların görülmesine neden olur (Pong, 2003).

ROS’nin mitojenle aktive protein, kinaz kaskadının aktivasyonunun, iyon transportu, kalsiyum mobilizasyonu ve apoptozun aktivasyonu gibi özellikle astrositler ve mikroglialar için kritik hücresel fonksiyonların değişiminde kilit olduğu bilinmektedir (Emerit, Edeas ve Bricaire, 2004). GSH nöral hücrelerde hidrojen peroksiti detoksifiye ederek oksidatif hasara karşı nöronları korurken, MeHg ile GSH tüketimi oksidatif hasara karşı serebral dokuların hassasiyetini artırır (Choi, Yee ve Robles, 1996). Nöronlar üzerine yapılan çalışmalarda nöronların RNS’ne potansiyel olarak hassas olduğu ve nitrik oksit aracılı mitokondriyal değişimde GSH seviyelerinin nöroprotektif yanıtta kilit faktör olabileceği düşünülmektedir (Bolanos ve diğerleri, 1996). GSH eksikliğinde, hidrojen peroksinin biriktiği ve mitokondriyal hasara yol açtığı bilinmektedir (Jain, Mårtensson, Stole, Auld ve Meister 1991). AH olan farelerden alınan nöronlar üzerinde yapılan bir çalışma sonunda NAD(P)H redoks kontrolünün GSH’un upstream düzenleyicisi olduğu ve nörodejeneratif hastalıklarda oksidasyonun redoks yönüne teşvik edilmesi yoluyla oldukça etkili terapötik bir hedef olduğu belirtilmiştir (Ghosh, Levault ve Brewer, 2014). Düşük dozlardaki nitrik oksit nöronal ölümüne karşı koruyucu iken, iskemik strese cevap için düzenlenen nitrik oksit sentaz (iNOS) tarafından üretilen aşırı miktarda nitrik oksit de nöronal apoptoza neden

olmaktadır (Nomura, 2004). Aşırı NO'nın nörotoksik etkileri peroksinitrit (ONOO⁻) ve süper oksit anyonları ile kontrol edilmektedir; patolojik koşullar hücrenin antioksidan kapasitesini aşmasıyla DNA ve lipitler dahil çeşitli hücresel bileşenlerin şiddetli hasar görmesiyle sonuçlanır (Dawson, V. L. ve Dawson, T. M., 1996). nNOS, çoğunlukla santral ve periferik nöronlar ve bazı diğer hücrelerden eksprese olmakta olup genel fonksiyonlarına santral sinir sistemindeki sinaptik plastisite, kan basıncının merkezi olarak düzenlenmesi, düz kasların gevşemesi ve periferik nitrojenik sinirler aracılığıyla vazodilatasyon dahildir (Förstermann ve Sessa, 2012). N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin aşırı aktivasyonu ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğu nitrojenatif ve oksidatif stresin bir sonucu olup nörodejeneratif hastalıkların özellikle sporadik formlarının oluşmasına neden olduğu düşünülmektedir (Nakamura ve Lipton, 2010). İnsan serebral korteks nöronları üzerinde yapılan bir çalışmada oksidatif stresin nörotoksikite için ana neden olduğunu savunurken, inorganik HgCl₂ aracılığıyla toksisitenin redoks dengesi ile birlikte Ca⁺² homeostazının bozulması sonucu olduğunu destekleyen bulgular bulunmuştur (Gasso ve diğerleri, 2001). Hücre içinde Ca⁺²'nin artışında, NMDA reseptörleri ve voltaj bağımlı Ca⁺² kanallarının rol oynadığı düşünülmektedir. Ca⁺² regülasyonundaki değişimler, hipokampusun fonksiyonlarında bozulma sonucu hücre eksitabilitesi ve sinaptik plastisitesinde değişikliklere neden olmaktadır (Foster, 2007).

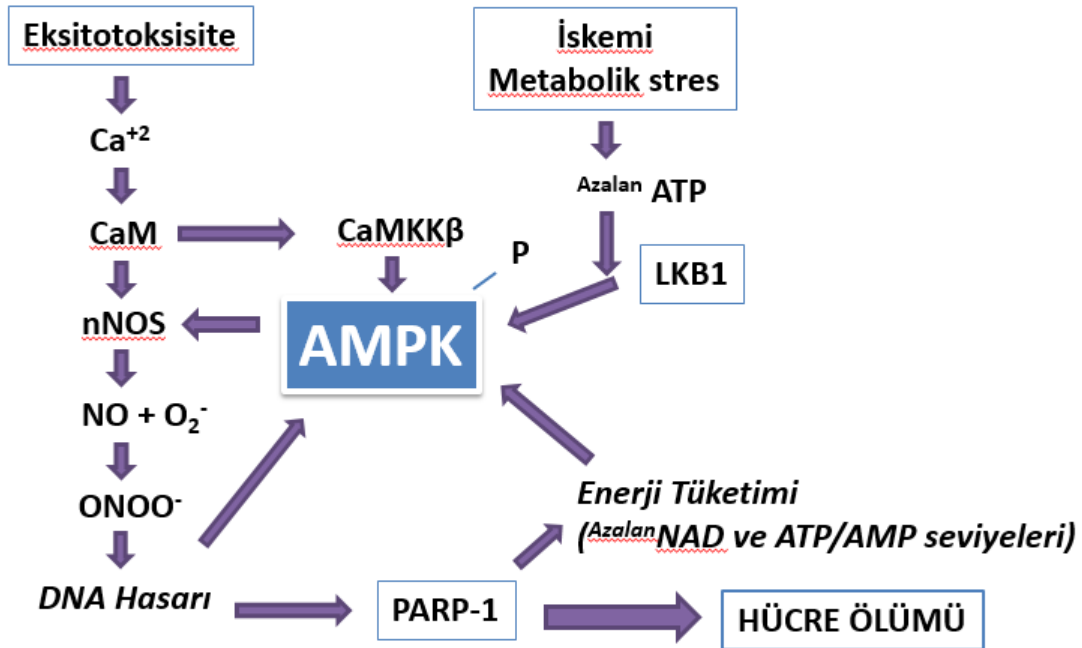
2.6.2. Oksidatif stres ve cıva ilişkisi

Aşırı ROS üretimi, MeHg'nin hücresel indirgenme ve yükseltgenme homeostazını veya antioksidan enzimleri ya da mitokondriyal elektron transport zincirini hasara uğratmaktadır (Yee ve Choi, 1996). MeHg'nin, membran permeabilitesinin ve glutamin/glutamat siklusunun ROS oluşumu ve dolayısıyla lipit peroksidasyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Yin ve diğerleri, 2007). İnorganik HgCl₂ intoksikasyonunda beyinde SOD, CAT, GPx ve GR'nin inhibisyonu artmış oksidatif/nitrojenatif (ROS/RNS) strese yol açtığı gösterilmiştir (Moneim, baskıda). Ayrıca, beyindeki belirgin cıva birikimi, sodyum potasyum adenosin trifosfat (Na⁺/K⁺-ATPaz) aktivitelerini ve NO seviyelerini etkilemektedir (Huand, Hsu, Liu ve Lin-Shiau, 2008). Feokromasitoma PC12 hücre hattı üzerinde yapılan bir çalışmada da MeHg verilen hücrelerde antioksidan enzimler olan SOD, CAT ve GPx antioksidan enzim seviyelerinin kontrole göre ciddi biçimde azaldığı bulunmuştur (Zhang ve diğerleri, 2009). Diğer taraftan, HgCl₂ ve MeHgCl, poli(ADP-ribozil)asyonunun inhibisyonuna yol açar. Cıva toksisitesinde kronik PARP-1 inhibisyonu,

oksidatif stres aracılı-DNA hasarına cevabın bozulması ile sonuçlanır. Bu sebeple, kronik PARP-1 inhibisyonunun nörojeniz ve öğrenme fonksiyonuna etkisi halen araştırılmaktadır (Pieper ve diğerleri, 2014).

2.6.3. Oksidatif stres ve metformin ilişkisi

Metforminin aktive ettiği AMPK hem fizyolojik (enerji) hem de patofizyolojik (iskemi) olarak rol almakta olup nöronal enerji dengesini yeniden düzenlemek için aktive olmaktadır, ancak bu aşırı aktivasyon da nöral hücrelerin zarar görmesine neden olur (Ronnett, Ramamurthy, Kleman, Landree ve Aja, 2009). Beyinde nNOS hücreler içerisinde çözünebilir formda olup enzim aktivitesi Ca^{+2} ve kalmodulin tarafından düzenlenmektedir (Förstermann ve Sessa, 2012). Belirli patolojik koşullarda, nNOS aktivasyonu, NMDA reseptörlerinin aşırı aktivasyonu ile artmaktadır, bu prosese eksitotoksiste adı verilmektedir (Brito ve diğerleri, 2010).



Şekil 2.3. AMPK sinyalinin patofizyolojik regülasyonu (Ronnett, Ramamurthy, Kleman, Landree ve Aja, 2009) (CaMKK β : Ca^{+2} /kalmodulin bağımlı proterin kinaz β , CaM : Kalmodulin, nNOS : nöronal nitrik oksit sentaz, NO : nitrik oksit, O_2^- : Süper oksit anyon radikali, $ONOO^-$: peroksinitrit, PARP-1: poli ADP-riboz, NAD : Nikotinamid adenin dinükleotid, ATP : Adenozin trifosfat, AMP : Adenozin monofosfat, LKB1 : Karaciğer kinaz B1, Ca^{+2} : Kalsiyum iyonu, DNA : Deoksiribonükleik asit)

Sıçanlardan elde edilen primer kortikal nöronlarda metforminin bir antitümör ilaç olan etopozit ile oksidatif strese maruz kalarak apoptotik hücre ölümünde metforminin nöronlar üzerinde koruyucu etkileri olduğu bulunmuştur (El-Mir ve diğerleri, 2008).

2.6.4. Oksidatif stres ve kafein ilişkisi

Psikostimulan olan kafeinin, nörodejeneratif bir bozukluk olan AH'ndan ve hafıza bozukluğundan korunmada etkili olabileceği düşünülmektedir (Chu ve diğerleri, 2012). Özellikle lipofilik antioksidan miktarı yüksek olan kahvede, oksidatif strese karşı artmış nöronal korunma gözlenmiştir. Oksidatif stres ile indüklenmiş nöronal hücre ölümünde mitojen ile aktive protein kinazlar, ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz 1 ve 2 ile c-jun –N-terminal kinazın hayati rol oynadığı rapor edilmiştir (Chu ve diğerleri, 2009). Sporadik AH olan tavşanlarda artmış oksidatif strese karşı kafeinin koruyucu etkileri gözlenmiştir (Prasanthi, 2010). SH-SY5Y hücre hattında yapılan bir çalışmada kafeinin sistein tutulumunu artırarak GSH sentezini indüklediği ve bu mekanizma ile nöronlarda koruyucu etki yarattığı bulunmuştur (Aoyama ve diğerleri, 2011).

Bütün bu bilgiler ışığında, oldukça yaygın biçimde maruz kalınan çevresel bir nörotoksin olan cıvanın nörotoksisite meydana getirme nedenlerinin incelenerek dünyada oldukça yaygın biçimde görülen ve görülme sıklığı giderek artan nörodejeneratif hastalıklar veya demans gibi çeşitli nöral bozuklukların tedavisi ya da bunlardan korunma için temel mekanizmaların aydınlatılması büyük önem taşımaktadır. Öte yandan nöral bozuklukların büyük çoğunluğunun oksidatif strese eşlik eden mekanizmalarla meydana geldiği bilinmektedir. Ayrıca dünyada en yaygın kullanılan oral antidiyabetik olan metforminin ve günlük olarak yaygın biçimde tüketilen kafeinin cıvanın nörotoksisitesi üzerindeki etkilerinin incelenmesi ile yeni tedavi yöntemleri için temel mekanizmalar araştırılmak istenmiştir. Bu nedenlerle, bizim çalışmamızda, MeHgCl ve HgCl₂ cıva formlarının nöron hasarına ve nöronlardaki hücre ölümüne katkısını ve ilgili cıva formlarının varlığında oluşan nörotoksisiteye karşı bir AMPK uyarıcı olan metforminin ve bir A_{2A} reseptör antagonisti olan kafeinin hücre canlılığını, nitrik oksit düzeylerini ve oksidatif stres düzeylerini nasıl değiştirdiğini mekanistik toksikoloji bakış açısıyla irdelemek amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hücrelerin Hazırlanması

3.1.1. Kullanılan malzemeler

1,5 ml steril eppendorf tüpü

14 ml steril santrifüj tüpü

25 ml steril santrifüj tüpü

Steril filtre

5 ml enjektör

Thoma lamı 0,0025 m²

(Thoma CE Marienfeld, Almanya)

Su banyosu, 15 Lt

(Nüve, Türkiye)

Santrifüj

(Nüve, Türkiye)

CO₂ inkübatör

(Sanyo, Japonya)

Manuel sayaç

Mikroskop

(Leica, Almanya)

Sınıf 2 biyogüvenlik kabini

(Metis, Türkiye)

5, 10 ml steril cam pipetler

Pasteur pipeti

Steril mikropipetler

Hücre kültürü şişesi (Flask)

3.1.2. Kullanılan maddeler

SH-SY5Y (ATCC®CRL-2266™)

F-12 (HAM) Nutrient Mixture with L- (1-095-1A, Biological Industries, Glutamine, steril İsrail)

MEM Earle's with 2,3 g/L NaHCO₃ with (Fg 0325, Biochrom AG, Almanya) stable glutamine low endotoxin

%1 Esansiyel olmayan aminoasit çözeltisi (Biological Industries, İsrail)

Fötal sığır serumu (FBS) (Biochrom, Almanya)

%0,05 Trypsin-EDTA Solution C (1:5000) (03-053-1B, Biological Industries,

	İsrail)
Fosfat Tamponu (PBS)	(Sigma-Aldrich, Almanya)
Tripan mavisi çözeltisi %0,5, steril	(03-102-IB, Biological Industries, İsrail)

3.1.3. SH-SY5Y hücre hattı ve hücre kültürünün hazırlanması

Bizim çalışmamızda, SH-SY5Y dopaminerjik insan nöroblastoma hücre hattı kullanıldı. SH-SY5Y hücre hattı çalışmalarımızda kullanılmak üzere Dr. Nathalie Herlin-Boime (CEA-CNRS, Saclay, Fransa) ve Dr. Marie Carriere (CEA, Grenoble, Fransa) tarafından armağan edilmiştir. SH-SY5Y hücrelerinin bir döngüsü 24 saat olarak tespit edilmiştir (Engin, 2015).

Hücre kültürü besi yerinin hazırlanması

1 L medyum hazırlanabilmesi için;
 %84 Ham F12:EMEM (1:1),
 %15 FBS (Biochrom, Almanya),
 %1 Esansiyel olmayan aminoasit çözeltisi (Biological Industries, İsrail),
 %0,5 antibiyotik içeren besiyeri kullanıldı.

Tripsinizasyon çözeltisi

%0,05 Tripsin-EDTA Solution C (1:5000) : PBS (1:1) karışımı hazırlandı.

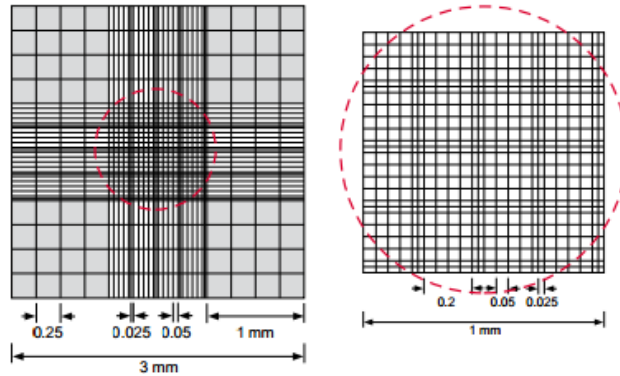
3.1.4. Hücrelerin hazırlanma yöntemi

- Hücreler %5 CO₂'li ortamda 37°C'da inkübe edildi ve böylece hücrelerin logaritmik çoğalması sağlandı.
- Her deneye başlamadan önce inkübe edilen her biri 75 cm² olan flasklardaki hücrelerin en az %70 hücre doluluk oranı (confluency) bulunmasına özen gösterildi.
- Ardından hücre flasklarına hazırlanan Tripsinizasyon çözeltisi 5-6 ml ilave edildi.

- Hücreler 30 dk etüvde bekletildikten sonra, hücrelerin yüzüp yüzmediği mikroskopla kontrol edildi.
- Hücrelerin yüzdüğü görüldükten sonra flasklardaki hücre çözeltileri 50 ml'lik tüpte toplandı. Her flaska, yaklaşık 2 ml besiyeri ilave edilerek yıkandı. Kalan hücreler de yeniden tüpe ilave edildi.
- Hücreler 2000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüjün ardından üstte kalan çözelti yeniden vakumlu motor sayesinde cam pastör pipeti ile dikkatlice çekildi. Üzerine 10 ml besiyeri ilave edildi.
- Hücreler 3-[4,5-dimetitiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolyum bromür (MTT) deneyleri için her kuyucukta 10.000, diğer deneyler için 100.000 hücre olacak şekilde ekildi.

Tripan mavisi ile hücre sayımı

- Hazırlanan hücre çözeltisinden 10 µl alındı, tüpün içerisine x10 dilüsyonu sağlamak üzere 80 µl PBS eklendi.
- Steril olmayan ortamda bu karışıma 10 µl tripan mavisi eklendi.
- Thoma lamında sayımı aşağıda gösterildiği biçimde 1mm x 1mm x 0,1mm = 0,1mm³ hacmi içerisine yerleşen hücreler sayılarak gerçekleştirildi.



Şekil 3.1. Thoma lamı kutucuklarının şekilsel gösterimi (Marienfeld, 2015)

- MTT deneyleri için 50 µl'de 10.000 hücre olacak biçimde ve diğer deneyler için 100.000 hücre olacak şekilde tüm maruziyet dozları triplike olarak hazırlandı ve her deney 3 defa tekrarlandı.
- Her çalışmada MTT deneyleri için 96 kuyucuklu plaklara 10.000, diğer deneyler için 48 kuyucuklu plaklara 100.000 hücre ekimi yapıldı.
- Plaklara konulan hücreler bir gece inkübe edildikten sonra deneylere başlandı.

3.2. MTT Deneyinin Hazırlanması ve Yöntemi

3.2.1. Kullanılan malzemeler

1,5 ml steril eppendorf tüpü	
14 ml steril santrifüj tüpü	
50 ml steril santrifüj tüpü	
1,25 ml steril finntip stepper pipet	(Thermo, Finlandiya)
5,0 ml steril finntip stepper pipet	(Thermo, Finlandiya)
0,2 mikron steril filtre	(Corning, Almanya)
5 ml enjektör	
Mikroplak okuyucu	(Molecular Devices, ABD)
Vortex	(Labnet, ABD)
Su banyosu	(Nüve, Türkiye)
CO ₂ inkübatörü	(Sanyo, Japonya)
Hassas terazi	(Denver Instruments, ABD)
Mikroskop	(Leica, Almanya)
Sınıf 2 biyogüvenlik kabini	(Metis, Türkiye)
Steril mikropipetler	
Tekrarlamalı pipet	
96 kuyucuklu plak	

3.2.2. Kullanılan maddeler

Metil cıva (II) klorür	(33368, Fluko Anaytical, Almanya)
Cıva (II) klorür	(4417, Merck, Almanya)
Metformin	(PHR-1084, Sigma Aldrich, ABD)
Kafein	(C0750, Sigma Aldrich, ABD)
MTT	(20395, Serva, Almanya)
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	(71727, Sigma Aldrich, Almanya)
PBS	(Sigma-Aldrich, Almanya)

3.2.3. Çözeltilerin hazırlanması

5 mg/ml MTT çözeltisinin hazırlanması

- 50 mg MTT maddesi tartıldı.
- 10 ml PBS çözeltisi içerisinde hazırlandı.

%10 SDS çözeltisinin hazırlanması

- 250 ml SDS hazırlamak için 25 g SDS tartıldı.
- 0,01 M HCl çözeltisi içerisinde çözüldü.

Tatbik edilecek maddelerin hazırlanması

- Aşağıdaki çizelgede belirtilen konsantrasyonlarda metformin, HgCl_2 , MeHgCl ve kafein hazırlandı.

Çizelge 3.1. Uygulanan madde dozları

Tek başına uygulanan maddeler	1. doz	2. doz	3. doz	4. doz	5. doz	6. doz	7. doz	8. doz	9. doz	10. doz	11. doz
Cıva klorür (μM)	0,1	0,2	0,5	1	2	5	10	25	50	100	200
Metil cıva klorür (μM)	0,01	0,1	0,5	1	2	5	10	20	50	100	500
Metformin ($\mu\text{g/ml}$)	0,1	0,5	1	2	5	10	20	50	100	500	1000
Kafein (μM)	0,1	0,5	1	2	5	10	20	50	100	500	1000

- Aşağıdaki çizelgede belirtilen kombinasyonlarda 4 farklı konsantrasyonda metformine karşılık 5 farklı konsantrasyonda HgCl_2 ve aynı şekilde metformin ve MeHgCl ile 4 farklı konsantrasyonda kafeine karşılık 5 farklı konsantrasyonda HgCl_2 ve aynı şekilde kafein ve MeHgCl hazırlandı.

Çizelge 3.2. Birlikte uygulamalarda madde dozları

Birlikte uygulamalarda maddeler	1. doz	2. doz	3. doz	4. doz	5. doz
Cıva klorür (μM)	0,2	1	2	5	10
Metil cıva klorür (μM)	0,1	0,5	1	2	5
Metformin ($\mu\text{g/ml}$)	2	5	500	1000	-
Kafein (μM)	10	20	50	100	-

3.2.4. MTT deneyi yöntemi

- Hücre canlılığı, canlı hücrelerin çözünebilir MTT bileşimini formazana çevirmesi esasına dayanan (Mosmann, 1983) *in vitro* yöntem ile incelenmiştir.
- Her bir kuyucuğunda 50'şer μl hücre içeren 96'lık plakların her bir kuyucuğunun üzerine 50'şer μl metformin, HgCl_2 , MeHgCl ve kafein ayrı ayrı deney gruplarında ilave edildi.
- 6, 24, 48, 72 saatlik inkübasyon sürelerinde etüvde bekletildi.
- Kombinasyonlu dört ayrı deney grubu için ise her bir maddeden 25'er μl ilave edildi.
- Tayin edilen saatler olan ilk 24 ve ikinci 24 saat inkübasyon sürelerinde etüvde bekletildi.
- Tekli veya kombinasyonlu deney gruplarında inkübasyon sürelerinin sonunda 10 μl MTT çözeltisi her bir kuyucuğa ilave edildi.
- 4 saat MTT çözeltisi ile inkübe edilen hücrelere, bu sürenin sonunda 100 μl %10 SDS çözeltisi ilave edildi ve ölçüm için bir gece etüvde bekletildi.
- Bunun ardından, görünür dalga boylarında (550 nm ve 690 nm) UV spektrofotometre ile hücre canlılığı absorpsanları ölçüldü.

3.3. Kantitatif Total Nitrit-Nitrat Miktarı Tayini Deneyinin Hazırlanması ve Yöntemi

3.3.1. Kullanılan malzemeler

1,5 ml steril eppendorf tüpü

14 ml steril santrifüj tüpü

50 ml steril santrifüj tüpü	
1,25 ml steril finntip stepper pipet	(Thermo, Finlandiya)
5,0 ml steril finntip stepper pipet	(Thermo, Finlandiya)
0,2 mikron steril filtre	(Corning, Almanya)
5 ml enjektör	
Mikroplak okuyucu	(Molecular Devices, ABD)
Vortex	(Labnet, ABD)
Su banyosu	(Nüve, Türkiye)
CO ₂ inkübatörü	(Sanyo, Japonya)
Hassas terazi	(Denver Instruments, ABD)
Mikroskop	(Leica, Almanya)
Sınıf 2 biyogüvenlik kabini	(Metis, Türkiye)
Steril mikropipetler	
Tekrarlamalı pipet	
96 kuyucuklu plak	
48 kuyucuklu plak	

3.3.2. Kullanılan maddeler

Metilciva (II) klorür	(33368, Fluko Anaytical, Almanya)
Cıva (II) klorür	(4417, Merck, Almanya)
Metformin	(PHR-1084, Sigma Aldrich, ABD)
Kafein	(C0750, Sigma Aldrich, ABD)
MTT	(20395, Serva, Almanya)
Sülfonamid	(S9251, Sigma-Aldrich, Almanya)
N-naftiletilediamin (NED)	(N9125, Sigma-Aldrich, ABD)
%85'lik fosforik asit çözeltisi	(Merck, Almanya)
Vanadyum (III) klorür	(208272, Sigma-Aldrich, Almanya)
Sodyum nitrit (NaNO ₂)	(23721, Sigma-Aldrich, Almanya)
Sodyum nitrat (NaNO ₃)	(S5509, Sigma-Aldrich, Almanya)

3.3.3. Çözeltilerin hazırlanması

Griess reaktifinin hazırlanması

%1 Sülfonilamid çözeltisi :

- 226 mg sülfonilamid tartıldı.
- 22,6 ml %5 fosforik asitte çözüldü.

%0,1 NED çözeltisi :

- 23,8 mg NED tartıldı.
- 23,8 ml distile suda çözüldü.

%5 fosforik asit çözeltisi:

- 1,24 ml %85'lik fosforik asit çözeltisi mikropipetle çekildi.
- 19,76 ml distile suyun üzerine ilave edilerek 21 ml %5 fosforik asit çözeltisi hazırlandı.

Vanadyum (III) klorür çözeltisinin hazırlanması

- 0,1771 g vanadyum (III) klorür maddesi tartıldı.
- 22,1375 ml 1M HCl'de çözüldü.

Sodyum nitrit (NaNO_2) standartları çözeltilerinin hazırlanması

- 1 mg NaNO_2 tartıldı, 1000 μl distile suda çözüldü.
- 0,78125 μM , 1,5625 μM , 3,125 μM , 6,25 μM , 12,5 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM 'lık nitrit standartları 200 μM 'lık standart hazırlandıktan sonra büyükten küçüğe yarı yarıya dilüe edilerek hazırlandı.

Sodyum nitrat (NaNO_3) standartları çözeltilerinin hazırlanması

- 1,3 mg NaNO_2 tartıldı, 1300 μl distile suda çözüldü.

- 0,78125 μM , 1,5625 μM , 3,125 μM , 6,25 μM , 12,5 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM 'lık nitrit standartları 200 μM 'lık standart hazırlandıktan sonra büyükten küçüğe yarı yarıya dilüe edilerek hazırlandı.

Örnek çözeltilerin hazırlanması

Örnek çözeltiler aşağıdaki Çizelge 3.3.'te belirtilen dozlarda hazırlandı.

Çizelge 3.3. Nitrit ve nitrat deneyinde kullanılan madde konsantrasyonları

Tek başına ve birlikte uygulamalardaki maddeler	1. doz	2. doz	3. doz
Cıva klorür (μM)	1	2	5
Metil cıva klorür (μM)	1	2	5
Metformin($\mu\text{g/ml}$)	2	5	-
Kafein (μM)	10	20	-

3.3.4. Kantitatif total nitrit-nitrat miktarı tayini deney yöntemi

- Deney sistemi bir kez daha kurularak hücrelerin birinci ve ikinci hücre siklusu inkübasyon sürelerinde oluşturdukları oksidatif stres nitrit ve nitratın kantitatif tayini ile deneylendi.
- Nitrit ve nitrat konsantrasyonlarının değerlendirilmesi 96 kuyucuklu plaklarda yapıldı. Deney, nitratın vanadyum (III) klorür tarafından redüksiyonu ile kombine asidik Griess reaksiyonu tarafından tespit edilmesi prensibine dayanan bir miktar tayini metodudur (Miranda, Espey ve Wink, 2001).
- Çizelge 3.3.'te seçilen dozlar için tek başına ve birlikte uygulamalar 48 kuyucuklu plaklarda birinci ve ikinci hücre sikluslarında yapıldı.
- 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda triplike olarak çalışılan örneklerin süpernatantları toplanarak nitrit ve nitrat ölçümleri yapıldı.
- 100 μl süpernatantların üzerine 100 μl etanol eklendi.
- 30 dakika 4°C'de bekletildi.
- 14000 rpm'de 4 dakika santrifüj yapıldı ve deneyde kullanılacak süpernatant elde edildi.

- Tüm örnekler ve nitrit ve nitrat standartları 96 kuyucuklu plaklara 70'er µl olarak eklendi.
- Nitrit ölçümleri için 70 µl süpernatant üzerine 70 µl Griess reaktifi eklendi.
- Nitrat ölçümleri için 70 µl süpernatant üzerine 70 µl Griess reaktifi ve 70 µl vanadyum (III) klorür ilave edildi.
- Tüm plaklar 45 dakika 37°C'de inkübe edildi.
- Absorbansları UV spektrometrede görünür bölge olan 540 nm'de tayin edildi.
- Nitrit ve nitrat standartları kullanılarak elde edilen kalibrasyon doğrularının denklemlerinden nitrit ve nitrat miktarları kantitatif olarak ayrı ayrı tayin edildi. Nitrit ve nitrat miktarları toplanarak NO_x elde edildi.

3.4. Oksidatif Stresin Hesaplanması

Nitrit ve nitrat ölçümlerine paralel olarak, bizim çalışmamızda oksidatif stres daha önce Engin (2015) tarafından belirtildiği gibi $Q = \frac{[(NO_3 + NO_2) - MTT]}{MTT}$ oranı olarak hesaplanmıştır (Engin, 2015).

3.5. 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. Gruplar arasındaki farklar non-parametrik Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi ve $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

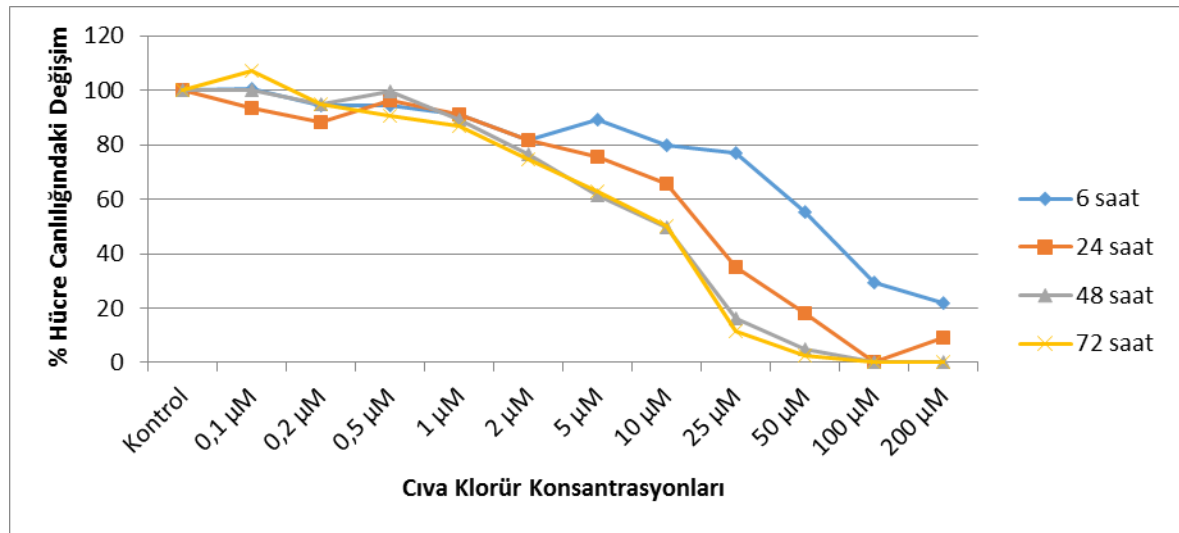
4. BULGULAR

4.1. MTT Deneyi Bulguları

4.1.1. Maddeler tek başına uygulandığında deney bulguları

SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleri maddelere tek başına 6, 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde MTT’de incelendi.

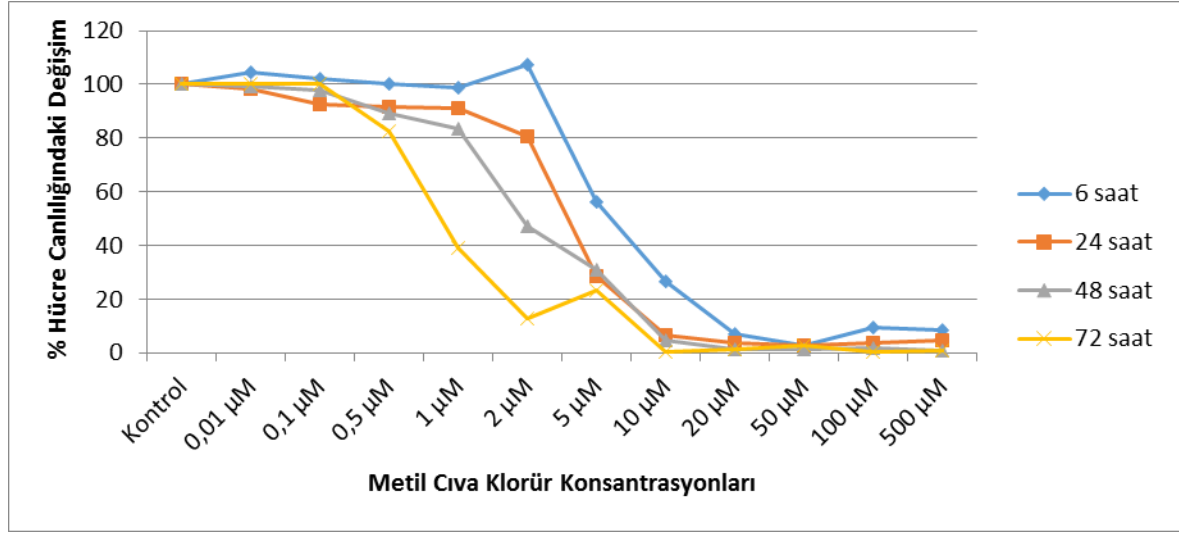
Cıva klorür



Şekil 4.1. Farklı dozlardaki cıva klorüre maruziyetin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi

0,1 µM ila 200 µM arasında değişen konsantrasyonlar ön deneylerimizde kullanılmak üzere seçilmiştir. SH-SY5Y hücrelerinde metformin ile aynı inkübasyon saatlerinde belirlenen HgCl₂ dozları için MTT testinde her bir inkübasyon saati için doz arttıkça hücre canlılığında azalma gözlemlendi. 10 µM HgCl₂’de birinci hücre siklusu inkübasyonunda hücrelerin %34’ü ölürken, 48 saat ve 72 saat inkübasyonda hücrelerin %50’si öldü. 100 µM ve 200 µM’lık çok yüksek HgCl₂ dozlarında beklendiği üzere özellikle birinci hücre siklusundan sonra hücreler tamamen öldü. Bizim sonuçlarımıza göre; HgCl₂ verilen SH-SY5Y hücrelerinde doz-bağımlı olarak hücre canlılığında azalma birinci hücre siklusunun ardından görüldü (Bkz. Şekil 4.1.).

Metil cıva klorür



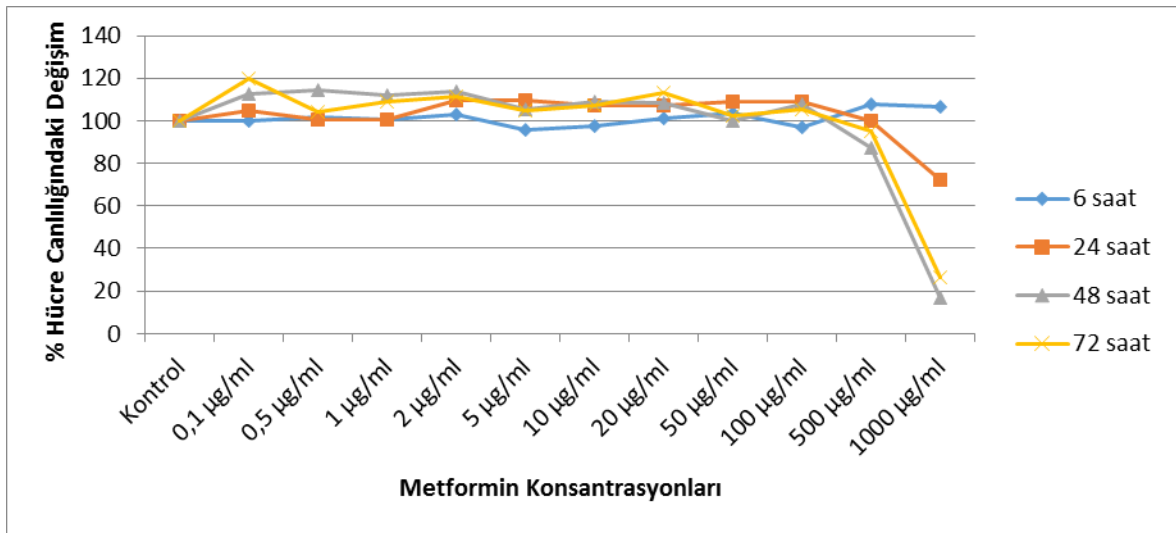
Şekil 4.2. Farklı dozlardaki metil cıva klorüre maruziyetin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi

SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde tek başına MeHgCl'e maruziyet, 0,01 µM ila 500 µM arasında değişen konsantrasyonlar ön deneylerimizde kullanılmak üzere seçilerek incelendi. Organik MeHgCl'de de inorganik formu olan HgCl₂ gibi hücre canlılığında doz-bağımlı bir azalma gözlemlendi. 6 saatlik akut maruziyette %43 ölüm meydana gelen konsantrasyona 5 µM'da rastlanırken, aynı MeHgCl dozunda birinci hücre siklusu inkübasyonunda hücrelerin %71'i öldü. Diğer inkübasyon sürelerinde de azalma (%69, %77 hücre ölümü) devam etti. 72. saatin sonunda 1 µM'lik organik cıva dozunda bile hücre canlılığı %50'nin de altına düşerek %60 hücre ölümü gözlemlendi (Bkz. Şekil 4.2.).

İnorganik ve organik cıvanın tek başına uygulamalarında aynı dozda maruziyetlerinde MTT sonuçları karşılaştırılacak olursa, 0,1 µM'lık dozlarında önemli bir değişiklik görülmezken, 0,5 µM'lık dozlarında ise birinci ve ikinci hücre siklusu inkübasyonlarda inorganik HgCl₂'de sırasıyla %3 ve %1'lik azalma gözlenirken organik MeHgCl'de %9 ve %11'lik azalma gözlemlendi. 1 µM'lık dozlarında her iki cıva formu için 6. saat, ilk 24 saat ve ikinci 24 saatte önemli bir değişim gözlenmezken; özellikle üçüncü siklus sonrasında (72 saat) MeHgCl'deki belirgin olarak hücre proliferasyonunda (%61) azalma gözlenirken aynı dozda HgCl₂'de bu azalma %13'te kalmayı sürdürdü. 2 µM dozlarında inorganik cıva formunda ikinci hücre siklusunda %24 hücre canlılığı mevcutken organik cıva formunda hücrelerin %50'sinden daha azı canlı kaldı, hücre canlılığı %47 oranındaydı. 5 µM'lık

dozlarda inorganik formda tüm inkübasyon saatleri içerisinde en fazla azalma üçüncü siklustaki %39'luk düşmedir. Organik formda 6 saatlik inkübasyonda bile hücre canlılığı %56 dolaylarındaydı. İki formun da çok yüksek dozlarında inorganik cıva hücre proliferasyonu daha iyi olmakla birlikte hücre canlılığı %50'nin oldukça altına düşmüş olup üçüncü siklusun sonrasında bütün hücreler öldü. Bu sonuçlarla birlikte organik formdaki MeHgCl'ün akut ve subakut maruziyetlerde insan nöroblastoma hücrelerinde inorganik forma göre daha toksik olduğu ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğunda daha fazla etkili olduğu görüldü (Bkz. Şekil 4.1. ve 4.2.).

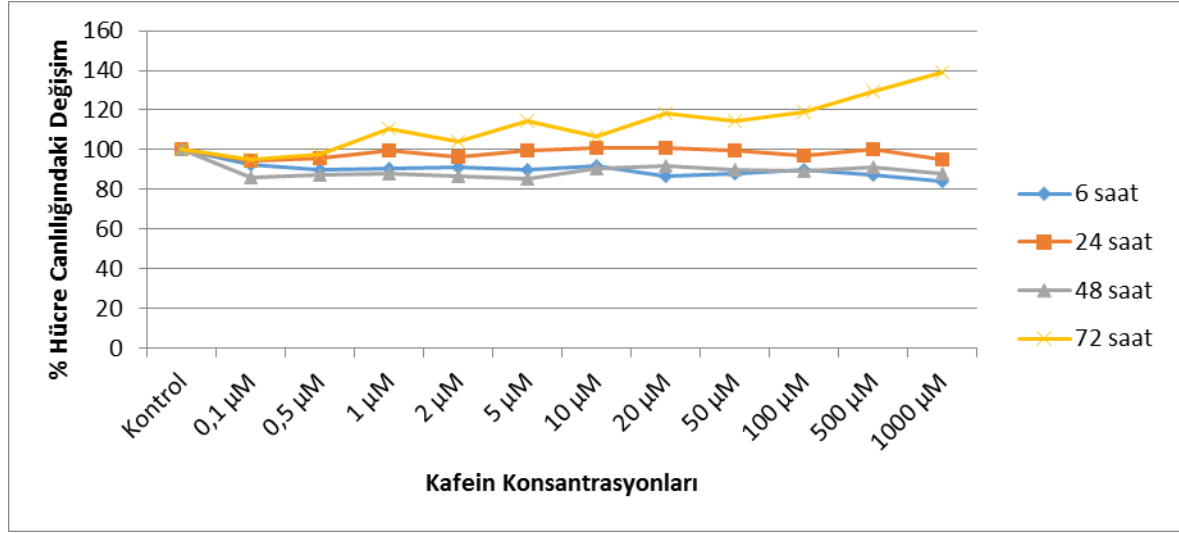
Metformin



Şekil 4.3. Farklı dozlardaki metformine maruziyetin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi

İnsanda kullanılan tedavi dozlarını ve olası kanser tedavi dozlarını kapsayacak biçimde 0,1 µg/ml ila 1000 µg/ml arasında değişen konsantrasyonları seçilen metformin dozları için 6. saatte hücrelerin proliferasyonunda herhangi bir değişiklik gözlenmezken 24. saatte metformin için seçilen en yüksek doz olan 1000 µg/ml'de kontrole göre hücre canlılığında %28 azalma görüldü. Bunun yanında 48. saatte ve 72. saatte yine en yüksek doz için hücre canlılığının %50'nin altına düştüğü gözlemlendi, yani metforminin 1000 µg/ml'lik dozda hücrelerin ölümüne neden olduğu gözlemlendi (Bkz. Şekil 4.3).

Kafein



Şekil 4.4. Farklı dozlardaki kafeine maruziyetin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi

SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde muhtelif dozlardaki kafeinin hücre canlılığına etkisi seçilen 0,1 µM ve 1000 µM arasındaki dozlarda incelendi. 6 saatlik inkübasyonda kafeinle muamelede tüm dozlarda hücre canlılığındaki azalma yönündeki değişim %16'dan aşağıya inmemiş olup birinci hücre siklusunda en fazla 1000 µM kafein dozunda %5'lik azalma görülen hücre canlılığında kayda değer bir değişme gözlenmedi. 48. saatin sonunda en fazla %15'lik azalma 5 µM'da görülürken en az düşme %8 ile 20 µM kafein dozunda görüldü. 72 saat sonucunda kafein doz-bağımlı bir hücre canlılığı artışı görülerek 1000 µM kafein dozunda bu canlılık %39 arttı. Tek başına kafeinin antioksidan etkileri ile oksidatif strese karşı nöral hücreleri koruyarak hücrelerin apoptozunu engellediği gözlemlendi (Bkz. Şekil 4.4.).

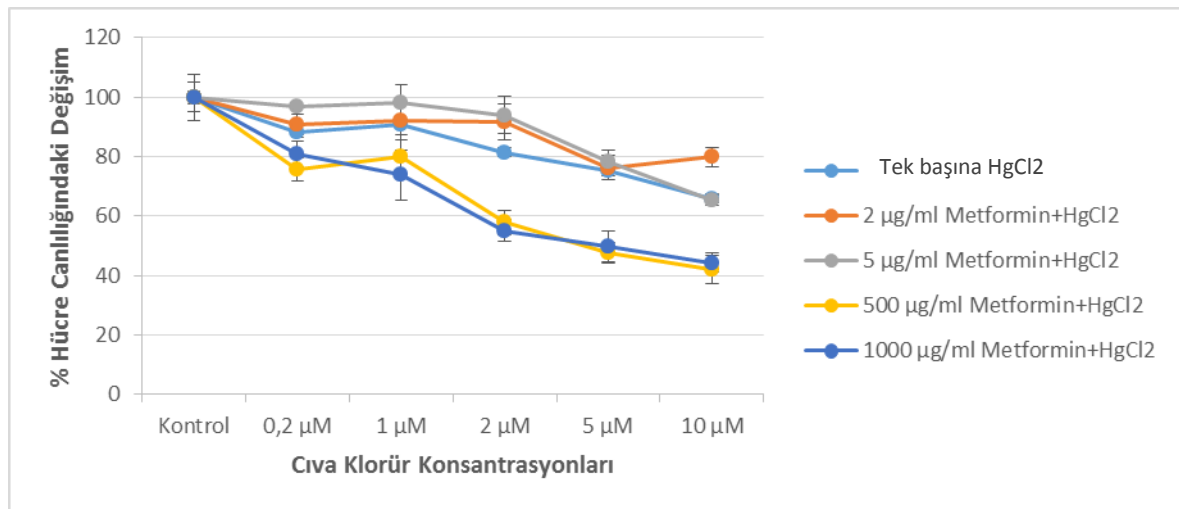
4.1.2. Maddeler birlikte uygulandığında deney bulguları

SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde HgCl₂ maruziyeti sonunda metforminin etkilerini görebilmek üzere MTT deneyinde birinci ve ikinci hücre siklusu inkübasyon süreleri seçilerek inceleme yapıldı. Bu siklus seçimlerinde özellikle insanın maruz kaldığı HgCl₂ dozları 0,2 µM, 1 µM, 2 µM, 5 µM ve 10 µM seçildi. MeHgCl için de yine HgCl₂'de belirtilen yaklaşım gözetilerek, 0,1 µM, 0,5 µM, 1 µM, 2 µM, 5 µM seçildi.

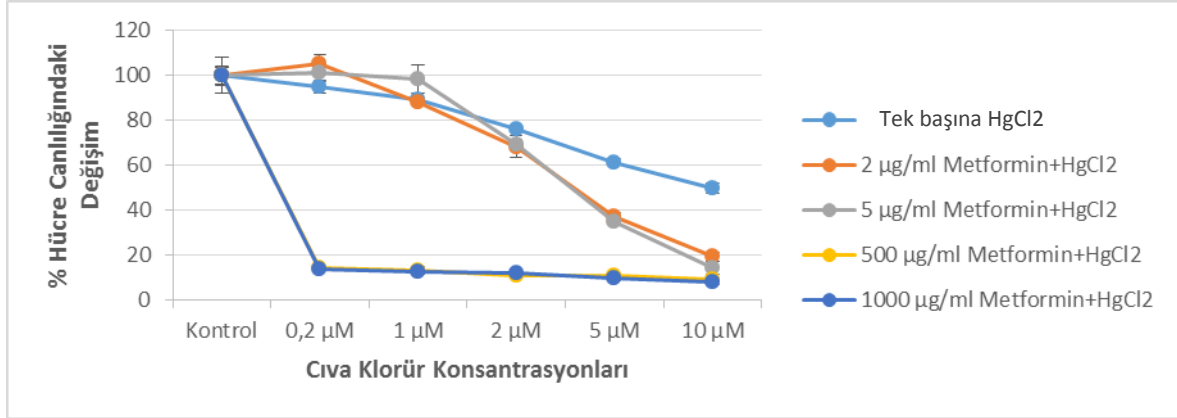
Metforminde ise tek başına yapılan deneylerde bulunan sonuçlara göre kombinasyonlarda iki düşük ve iki yüksek doz belirlendi. Sıçanlarda metformin ile yapılan bir çalışmada, kan ve beyin oranının 0,99 olduğu gözlenmiştir (Labuzek ve diğerleri, 2010). Düşük doz metformin için, antidiyabetik olarak tedavide kullanılan dozlarına karşılık gelen 2 µg/ml ve onun 2,5 katı olan dozu 5 µg/ml, yüksek doz metformin için ise kanser tedavisinde kullanılan 500 µg/ml ve 1000 µg/ml, AMPK uyarı dozları olarak seçildi.

Kafeinde ise tek başına verildiğinde hücre canlılığını koruyucu etkilerin artışının gözlemlendiği ve insanlarda günlük tüketilen konsantrasyonlara yakın olan ve ortalamaya göre çok daha fazla tüketilen dozları da dikkate alınarak 10 µM, 20 µM, 50 µM ve 100 µM'lık dozları belirlendi.

Cıva klorür ve metformin



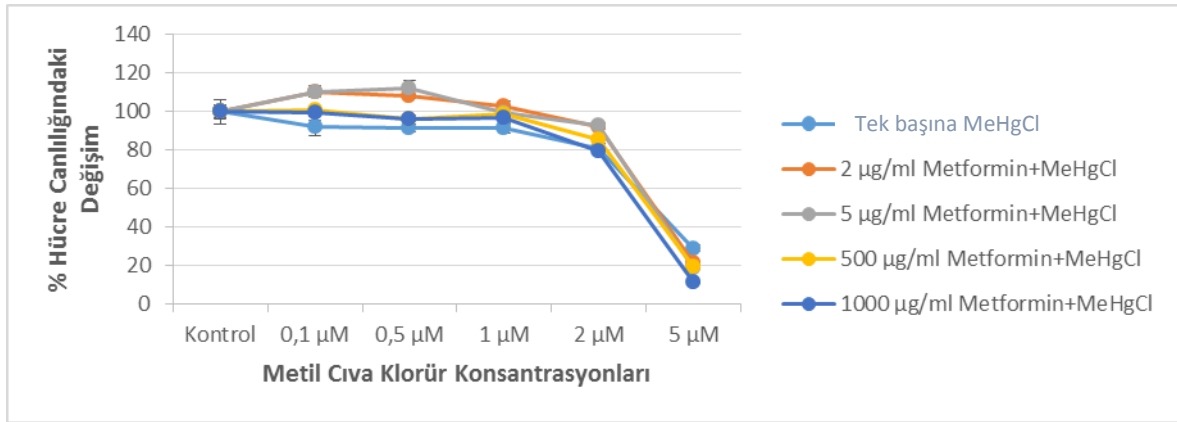
Şekil 4.5. Cıva klorür ve metformine birinci hücre siklusu sonunda maruziyetin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi



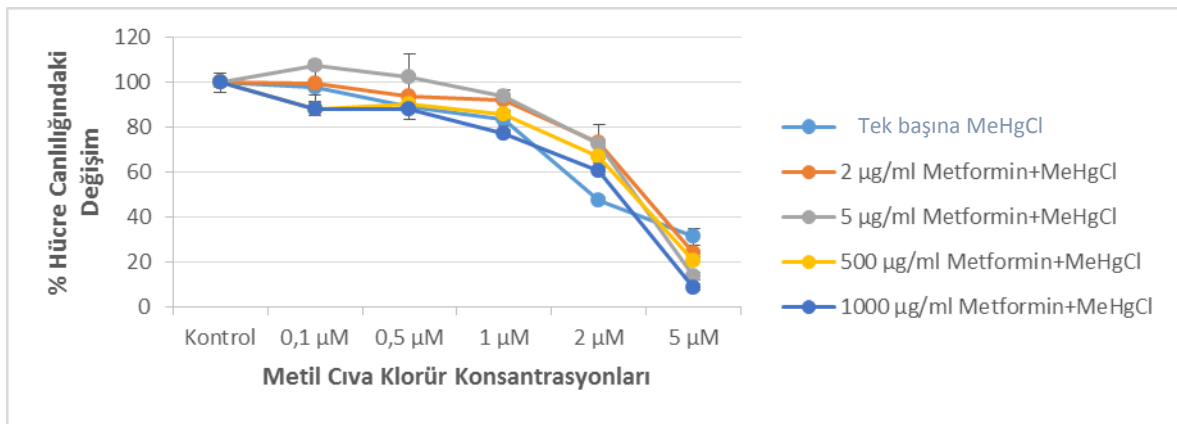
Şekil 4.6. Cıva klorür ve metformine ikinci hücre siklusu sonunda maruziyetin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi

Bu deney grubunun sonucunda, düşük doz metforminin 5 µg/ml’de daha etkin olmak üzere kombinasyon için seçilen HgCl₂ konsantrasyonlarında hücre canlılığını artırdığı tespit edildi. HgCl₂ dozunun kombinasyon çalışmasında 1 µM’den sonraki dozlarında 2 µg/ml ve 5 µg/ml’lik metformin dozlarının koruyucu etkisinin kaybolduğu gözlemlendi. Henüz birinci hücre siklusunda metforminin (Bkz. Şekil 4.5.) yüksek dozlarında 5 µM’lık HgCl₂ dozunda bile %50 hücre ölümü görüldü. 5 µg/ml’lik metformin dozunda 0,2 µM ve 1 µM HgCl₂ dozlarında belirgin bir değişme gözlenmezken, 500 µg/ml’lik metformin dozunda ilk siklustan ikinci siklusa azalma sırasıyla %62, %63, %47, %36, %33 olarak değişme gösterdi. Yani, ikinci siklusa, metforminin düşük dozlarında kontrole göre HgCl₂ doz-bağımlı bir azalma gözlenirken, metforminin yüksek dozlarında metforminin protein sentezini ve hücre proliferasyonunu etkileyerek azaltması ile HgCl₂ ‘nin seçilen en düşük dozunda dahi hücre canlılığında %86’lık trajik bir azalma gözlemlendi (Bkz. Şekil 4.6.). Bu azalmayı HgCl₂ dozları artmasıyla en son %91’e varan azalma takip etti. Burada metforminin insan nöroblastoma hücrelerinde AMPK yollarını tamamen aktive ederek hücre proliferasyonuna etki ettiği görüldü (Bkz. Şekil 4.6.).

Metil cıva klorür ve metformin



Şekil 4.7. Metil cıva klorür ve metformine birinci hücre siklusu sonunda maruziyetin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi

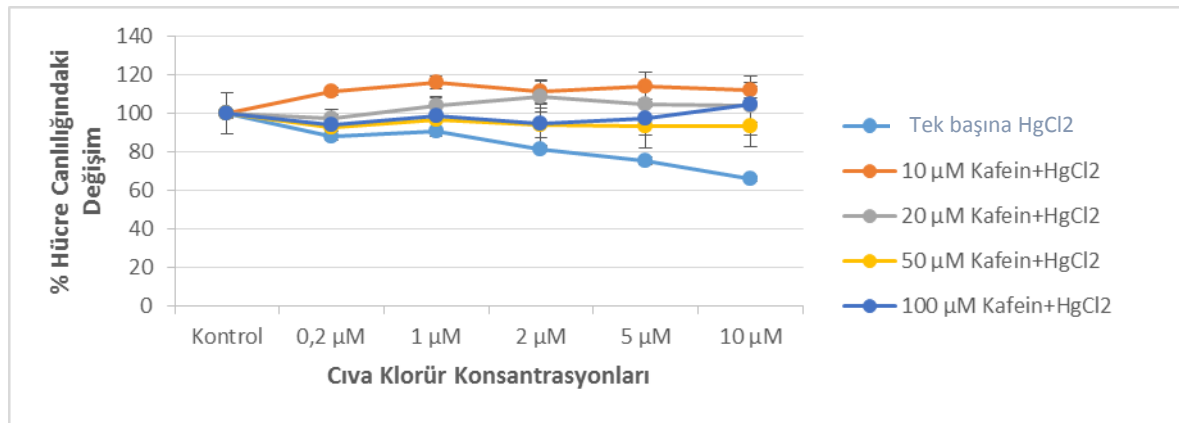


Şekil 4.8. Metil cıva klorür ve metformine ikinci hücre siklusu sonunda maruziyetin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi

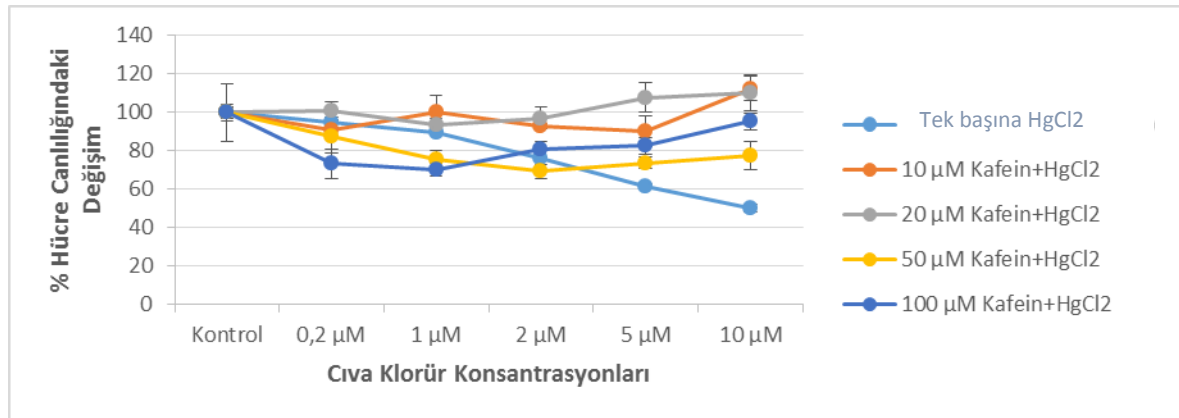
SH-SY5Y nöronal hücrelerinin bir kez de organik MeHgCl ile maruziyetinde metforminin hücre canlılığına etkisi MTT ile incelendi. İlk 24 saatte, organik cıva ile maruziyet sonrasında özellikle düşük metformin dozlarında koruyucu etkiler gözlemlendi. Bu koruyucu etki her iki düşük metformin dozu için de 5 µM'lık organik cıva dozuna kadar sürdü. Örneğin, 5 µg/ml metformin dozunda kontrole göre hücre canlılığında sırasıyla %18, %21, %8, %5 artma gözlemlendi (Bkz. Şekil 4.7.). İkinci 24 saatte ise yine 5 µM'lık organik cıva dozuna kadar koruyucu etkiler gözlemlenmiş olup 5 µg/ml metformin dozunda kontrole göre hücre canlılığında ilk üç organik cıva dozunda sırasıyla %10, %14, %10 artış görüldü. 2 µM MeHgCl dozunda hücrelerin yaklaşık %50'si ölürken, her iki düşük metformin dozunda hücre canlılığında %26'lık artış görüldü (Bkz. Şekil 4.8.). İlk 24 saatte, metforminin yüksek dozlarında da düşük dozlarında olduğu gibi koruyucu etkiler görüldü.

500 µg/ml’de ilk siklusta hücre canlılığındaki artış kontrole göre sırasıyla %9, %4, %8, %5 olup organik cıvanın en yüksek dozunda yine hücre koruyucu etki gözlenmedi (Bkz. Şekil 4.7.). İkinci hücre siklusunda ise yüksek metformin dozlarında düşük organik cıva dozlarında neredeyse koruyuculuğun kaybolduğu görülmekle birlikte, 2 µM organik cıva maruziyetinde önemli koruyuculuk görülmüş olup sırasıyla kontrole göre %20, %14 artış saptandı. İkinci siklus sonunda yine en yüksek organik cıva dozunda hücre canlılığında azalma devam etti. Bu sonuçlara göre düşük doz metforminin her iki inkübasyon saatinde en yüksek organik cıva dozuna kadar koruyuculuk gözlemlendi. Özellikle 2 µM MeHgCl mitokondriyal fonksiyon bozukluklarının ikinci siklustaki tüm metformin dozlarının engellediği gözlemlendi (Bkz. Şekil 4.8.).

Cıva klorür ve kafein



Şekil 4.9. Cıva klorür ve kafeine birinci hücre siklusunda maruziyetin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi



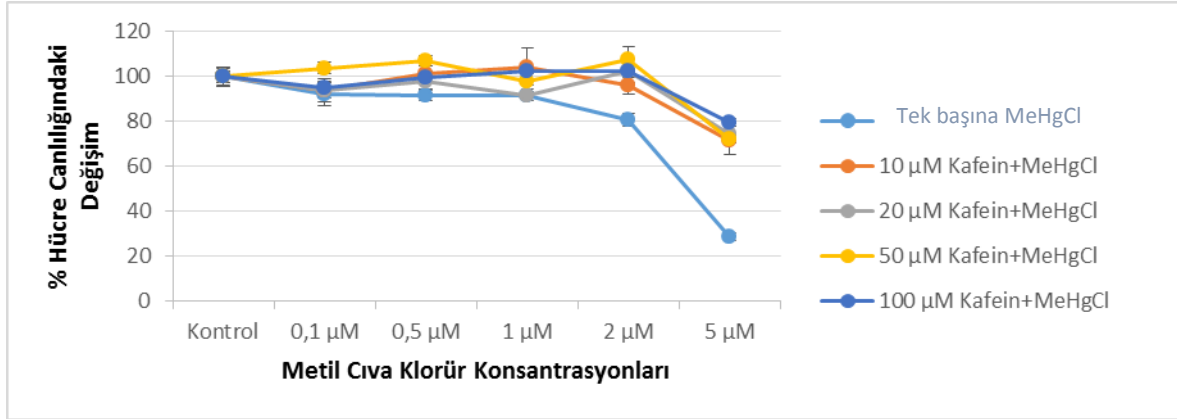
Şekil 4.10. Cıva klorür ve kafeine ikinci hücre siklusunda maruziyetin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi

Deneysel çalışmalarda insan nöral hücreleri yerine kullanılabilen SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde inorganik HgCl_2 maruziyet sonrasında kafeinin hücre canlılığına etkisi incelendi. Bu inceleme için günlük bir insanın ortalama içtiği kahve konsantrasyonuna denk gelmekte olan 10 μM , 20 μM , 50 μM ve 100 μM dozları seçildi. HgCl_2 değerleri bir insanın ortalama maruz kalabileceği düzeylerde seçilmiş olup az ve çok maruziyet olabilecek orta dozları ile çalışma 0,2 μM , 1 μM , 2 μM , 5 μM , 10 μM dozlarında gerçekleştirildi. Özellikle 10 μM ve 20 μM 'lık dozlarda hücre canlılığında kayda değer bir artış birinci hücre siklusu sonunda gözlemlendi. Birinci hücre siklusunda, 10 μM 'lık kafein dozunda kontrole göre sırasıyla %23, %25, %21, %30, %46 ile kafein dozu arttıkça antioksidan etkinin arttığı gözlemlendi. 20 μM 'lık kafein dozunda en düşük kafein dozu olan 0,2 μM 'da bir azalma görülse de diğer dozlarında anlamlı hücre canlılığı artışı bir önceki dozda olduğu gibi artarak devam etti (Bkz. Şekil 4.9.).

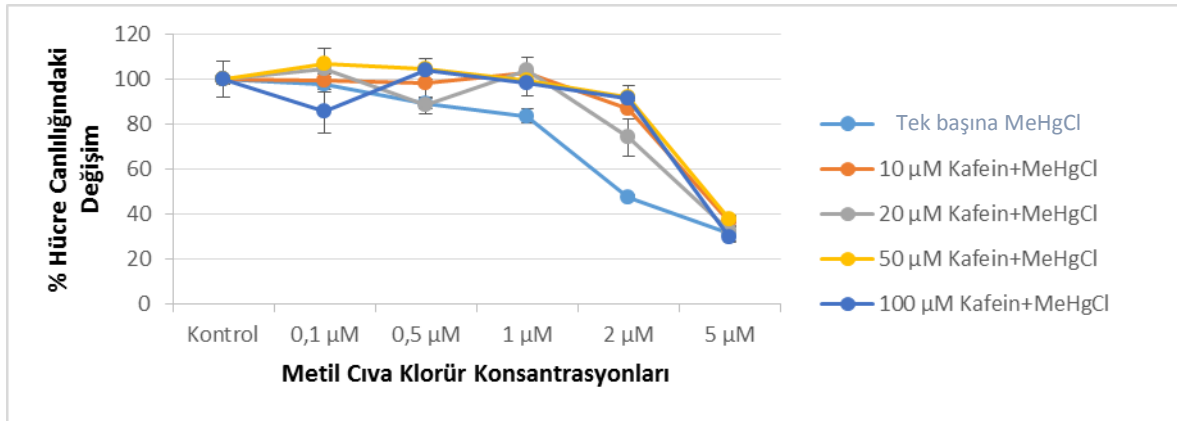
İkinci 24 saatte, kafeinin az-orta tüketimine denk gelebilecek dozları için hücre canlılığı 10 μM kafein dozunda en düşük HgCl_2 dozunda %4 olan göz ardı edilebilecek bir düşme göstermekle birlikte kontrole göre artışını sürdürdü (Bkz. Şekil 4.10.). Bu artışlar 10 μM kafein dozu için %3 azalma gözlenirken, %11, %17, %29, %62 ve 20 μM kafein dozu için %6, %5, %21, %47, %60 olarak artış gözlemlendi.

Kafeinin yüksek dozları olan 50 μM ve 100 μM için birinci hücre siklusunda tüm HgCl_2 dozlarında artış gözlenmiş olup HgCl_2 dozu arttıkça artmaya devam etti (Bkz. Şekil 4.9.). İkinci 24 saatte, 50 μM ve 100 μM kafein dozları için ilk iki HgCl_2 dozunda kontrole göre azalma gözlenmiş olup bu azalma en fazla %22'ye ulaşmıştı. Hücre canlılığı 2 μM HgCl_2 dozunda 50 μM kafein dozunda %7 azalırken 100 μM kafein dozunda %5 artış gösterdi. İkinci siklusta diğer HgCl_2 dozlarında hücre canlılığı kafeinin antioksidan etkileriyle korunarak kontrole göre artışını olumlu sürdürdü (Bkz. Şekil 4.10.).

Metil cıva klorür ve kafein



Şekil 4.11. Metil cıva klorür ve kafeine birinci hücre siklusu sonunda maruziyetin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi



Şekil 4.12. Metil cıva klorür ve kafeine ikinci hücre siklusu sonunda maruziyetin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi

MeHgCl'e maruziyet sonrası kafeinin SH-SY5Y hücrelerindeki canlılığa etkisi MTT ile incelenmiştir. Bizim çalışmamızda kafeinin 10 µM, 20 µM, 50 µM ve 100 µM'lık dozlarına karşılık MeHgCl'ün insanın yaşamında ortalama kronik olarak maruz kalabileceği dozları seçildi. Birinci hücre siklusunda, bütün MeHgCl dozlarına karşılık hücre canlılığında kontrole göre artma gözlemlendi. Bu artış 2 µM MeHgCl dozunda kontrole göre sırasıyla kafein dozları için %15, %21, %27, 21 iken; 5 µM MeHgCl dozunda kontrole göre sırasıyla kafein dozları için artış %42, %47, %43, %51 ile anlamlı görüldü. Burada kafeinin artan dozları ile kontrole göre nöral hücrelerin oksidatif strese korunmasında anlamlı bir artış olduğu gözlemlenmiş olup özellikle 50 µM'lık kafeinin bu artışı en fazla etkilediği gözlemlendi (Bkz. Şekil 4.11.). İkinci 24 saatte ise üç minör azalma dışında kontrole göre tüm MeHgCl dozlarında artış gözlemlendi. İkinci 24 saatte 1 µM

MeHgCl'e maruziyette kontrole göre %19, %20, %16, %14'lük artışlar kaydedildi. Bu artış en fazla MeHgCl'ün 2 μ M olduğu dozda tüm kafein dozlarına karşılık sırasıyla %30, %27, %45 ve %44 olarak saptandı (Bkz. Şekil 4.11.). 2 μ M'dan sonraki MeHgCl dozunda kafeinin koruyuculuğunu büyük miktarda yitirdiği gözlemlendi (Bkz. Şekil 4.11.).

4.2. Kantitatif Total Nitrit-Nitrat Tayini Bulguları

Total nitrit ve nitratın kantitatif tayininde doz seçiminde temel olarak HgCl₂ ve MeHgCl'ün *in vitro* yöntemler için kronik maruziyet dozları ve bu çalışmanın deney sonuçlarında meydana gelen dramatik değişimlerin gözlemlendiği dozlar tercih edildi. Kafein için dozlar, 70 kg insanın içtiği bir fincan kahve ile plazma kafein konsantrasyonu olan 10 μ M ve bunun iki katı için bir bireyde gözlenebilecek 20 μ M olarak belirlenmiştir. Metforminde ise günlük tedavi dozları ve onun iki katına denk gelebilecek metforminin iki düşük deney dozu olan 2 μ g/ml ve 5 μ g/ml seçilmiştir.

Çizelge 4.1. Birinci hücre siklusunda metil cıva klorür, metformin ve kafeinin hücre canlılığı, nitrik oksit ve oksidatif stres düzeylerine etkisi

	MTT (%)	% artış	NOx (μ M)	% artış	Q (μ M/%)	% artış
Kontrol	100 $\pm$ 0,25		42,55 $\pm$ 0,37		0,43 $\pm$ 0,005	
1μM MeHgCl	91,31 $\pm$ 2,26*	-8,69	46,59 $\pm$ 4,98	9,49	0,51 $\pm$ 0,04	19,41
2μM MeHgCl	80,68 $\pm$ 2,77*	-19,32	53,18 $\pm$ 3,85*	24,98	0,66 $\pm$ 0,05*	55,24
5μM MeHgCl	28,72 $\pm$ 1,62*	-71,28	55,33 $\pm$ 1,75*	30,05	1,94 $\pm$ 0,11*	355,35
2μg/ml Metformin	109,63 $\pm$ 0,69*	9,63	49,29 $\pm$ 2,92*	15,85	0,45 $\pm$ 0,02	5,62
5μg/ml Metformin	109,52 $\pm$ 6,96	9,52	61,80 $\pm$ 2,28*	45,25	0,57 $\pm$ 0,06*	34,28
10μM Kafein	102,40 $\pm$ 6,71	2,40	60,39 $\pm$ 6,55*	41,94	0,59 $\pm$ 0,03*	37,78
20μM Kafein	101,10 $\pm$ 1,95	1,09	48,98 $\pm$ 6,90	15,12	0,49 $\pm$ 0,07	14,10
1μM MeHgCl + 2μg/ml Metformin	102,71 $\pm$ 2,81	2,71	53,02 $\pm$ 8,43	24,61	0,52 $\pm$ 0,09	22,34
2μM MeHgCl + 2μg/ml Metformin	92,25 $\pm$ 1,65*	-7,76	58,47 $\pm$ 1,43*	37,42	0,63 $\pm$ 0,02*	49,14
5μM MeHgCl + 2μg/ml Metformin	20,99 $\pm$ 1,17*	-79,02	58,98 $\pm$ 0,27*	38,62	2,83 $\pm$ 0,17*	564,90
1μM MeHgCl + 5μg/ml Metformin	99,37 $\pm$ 3,44	-0,63	63,49 $\pm$ 11,35	49,22	0,63 $\pm$ 0,09*	48,65
2μM MeHgCl + 5μg/ml Metformin	92,95 $\pm$ 1,49*	-7,05	49,92 $\pm$ 4,60*	17,33	0,54 $\pm$ 0,04*	25,95
5μM MeHgCl + 5μg/ml Metformin	18,56 $\pm$ 0,81*	-81,44	57,73 $\pm$ 5,66*	35,67	3,10 $\pm$ 0,23*	628,93
1μM MeHgCl + 10μM Kafein	104,35 $\pm$ 8,26	4,35	64,04 $\pm$ 5,22*	50,51	0,62 $\pm$ 0,08*	46,64
2μM MeHgCl + 10μM Kafein	95,95 $\pm$ 3,80	-4,06	57,61 $\pm$ 3,05*	35,39	0,60 $\pm$ 0,05*	42,04
5μM MeHgCl + 10μM Kafein	71,49 $\pm$ 6,53*	-28,51	57,06 $\pm$ 15,63	34,10	0,79 $\pm$ 0,21	85,07

Çizelge 4.1. Birinci hücre siklusunda metil cıva klorür, metformin ve kafeinin hücre (devamı) canlılığı, nitrik oksit ve oksidatif stres düzeylerine etkisi

	MTT (%)	% artış	NOx (µM)	% artış	Q (µM/%)	% artış
1µM MeHgCl + 20µM Kafein	91,46 ± 1,12*	-8,55	43,69 ± 7,77	2,67	0,48 ± 0,08	12,18
2µM MeHgCl + 20µM Kafein	102,56 ± 0,90*	2,55	59,06 ± 4,47*	38,80	0,58 ± 0,04*	35,24
5µM MeHgCl + 20µM Kafein	74,57 ± 4,32*	-25,44	66,39 ± 4,75*	56,04	0,90 ± 0,12*	112,53

*p<0,05; Kontrole göre istatistiksel olarak farklı örnekler. (MTT: % hücre canlılığındaki değişim, NOx: [NO₂+NO₃], Q: NOx/MTT, % artış: Kontrole göre % artış)

Birinci hücre siklusunda, kontrole göre 1 µM, 2 µM ve 5 µM dozda MeHgCl'ün hücre canlılığını (MTT) istatistiksel olarak anlamlı düşürdüğü gözlemlendi (p<0,05) ve bu düşüşün doz arttıkça arttığı bulundu. MeHgCl'ün yalnızca 2 µM ve 5 µM dozda [Nitrit+Nitrat] (NOx) ve oksidatif stresi (Q) anlamlı arttırdığı bulundu (p<0,05). 5 µg/ml metforminin ise hem NOx düzeylerini hem de Q'ı anlamlı arttırdığı gözlemlendi. 10 µM kafein de ise hem NOx düzeylerinin hem de Q'ın anlamlı arttığı gözlemlendi (p<0,05). 20 µM kafein de ise hem NOx hem de Q düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı değildi (p>0,05). 1 µM ve 2 µM MeHgCl'e 2 µg/ml metformin ilave edildiğinde tek başına MeHgCl varlığındakine göre hücre canlılıklarında artış olduğu ve bu artışın 2 µM MeHgCl dozda anlamlı olduğu bulundu (p<0,05). Buna karşılık MeHgCl'ün her dozunda NOx ve Q düzeylerinin yüksek kaldığı ve bu artışın 2 ve 5 µM MeHgCl'de anlamlı olduğu tespit edildi.

Birinci hücre siklusunda, 5 µM MeHgCl dozuna her iki metformin dozu ilave edildiğinde kontrole göre oksidatif stres düzeylerinin dramatik olarak yüksek olduğu bulundu. Hücre canlılığındaki değişim 5 µg/ml metformin ilave edildiğinde de 2 µg/ml metformindeki gibi tek başına MeHgCl varlığındakine göre istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi (p<0,05).

MeHgCl'nin her dozuna 10 µM kafein ilave edildiğinde NOx ve Q yüksek kaldığı gözlemlendi. Tek başına MeHgCl'e göre kafeinin her iki dozu ilave edildiğinde hücre canlılıklarının arttığı gözlemlendi. Ancak 2 µM ve 5 µM MeHgCl'ye 20 µM kafein ilavesi ile NOx ve Q düzeylerinde kontrol verilerine göre anlamlı artış olduğunu bulduk (p<0,05) (Bkz. Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.2. Birinci hücre siklusunda cıva klorür, metformin ve kafeinin hücre canlılığı, nitrik oksit ve oksidatif stres düzeylerine etkisi

	MTT (%)	% artış	NOx (µM)	% artış	Q (µM/%)	% artış
Kontrol	100 ± 0,25		42,55 ± 0,37		0,43 ± 0,005	
1µM HgCl₂	91,00 ± 0,73*	-9,01	48,98 ± 7,39	15,12	0,54 ± 0,08	26,46
2µM HgCl₂	81,47 ± 1,54*	-18,53	48,75 ± 5,62	14,56	0,60 ± 0,07*	40,84
5µM HgCl₂	75,40 ± 1,75*	-24,61	53,92 ± 4,62*	26,73	0,71 ± 0,05*	67,68
2µg/ml Metformin	109,63 ± 0,69*	9,63	49,29 ± 2,92*	15,85	0,45 ± 0,02	5,62
5µg/ml Metformin	109,52 ± 6,96	9,52	61,80 ± 2,28*	45,25	0,57 ± 0,06*	34,28
10µM Kafein	102,40 ± 6,71	2,40	60,39 ± 6,55*	41,94	0,59 ± 0,03*	37,78
20µM Kafein	101,10 ± 1,95	1,09	48,98 ± 6,90	15,12	0,49 ± 0,07	14,10
1µM HgCl₂ + 2µg/ml Metformin	92,07 ± 6,48	-7,94	55,10 ± 6,21	29,49	0,61 ± 0,10	43,82
2µM HgCl₂ + 2µg/ml Metformin	91,61 ± 5,90	-8,40	56,00 ± 4,48*	31,61	0,61 ± 0,02*	43,50
5µM HgCl₂ + 2µg/ml Metformin	85,67 ± 4,12*	-14,33	60,08 ± 2,30*	41,20	0,70 ± 0,03*	65,29
1µM HgCl₂ + 5µg/ml Metformin	98,22 ± 5,90	-1,79	44,71 ± 7,72	5,07	0,46 ± 0,10	9,17
2µM HgCl₂ + 5µg/ml Metformin	94,04 ± 6,41	-5,97	42,08 ± 3,12	-1,11	0,45 ± 0,05	6,35
5µM HgCl₂ + 5µg/ml Metformin	78,29 ± 3,99*	-21,71	41,06 ± 0,77	-3,50	0,53 ± 0,02*	23,64
1µM HgCl₂ + 10µM Kafein	115,99 ± 3,43*	15,99	40,67 ± 5,10	-4,42	0,35 ± 0,05*	-16,91
2µM HgCl₂ + 10µM Kafein	111,54 ± 6,19	11,54	42,08 ± 13,91	-1,11	0,38 ± 0,13	-9,77
5µM HgCl₂ + 10µM Kafein	114,49 ± 7,30	14,49	36,75 ± 10,81	-13,64	0,33 ± 0,10	-23,20
1µM HgCl₂ + 20µM Kafein	104,19 ± 4,31	4,18	42,08 ± 3,98	-1,11	0,40 ± 0,02	-5,48
2µM HgCl₂ + 20µM Kafein	108,69 ± 8,06	8,68	55,73 ± 7,80	30,97	0,53 ± 0,11	24,20
5µM HgCl₂ + 20µM Kafein	104,78 ± 1,43*	4,77	43,06 ± 6,05	1,20	0,41 ± 0,06	-3,01

*p<0,05; Kontrole göre istatistiksel olarak farklı örnekler. (MTT: % hücre canlılığındaki değişim, NOx: [NO₂+NO₃], Q: NOx/MTT, % artış: Kontrole göre % artış)

Birinci hücre siklusunda, kontrol göre HgCl₂'ün her dozunda hücre canlılığı anlamlı olarak azaldığı (p<0,05), ancak sadece 5 µM dozda NOx anlamlı arttığı bulundu. Hem 2 µM hem de 5 µM dozda ise Q'nun istatistiksel olarak anlamlı arttığı tespit edildi. HgCl₂'ün her bir dozuna 2 µg/ml ve 5 µg/ml metformin ilave edildiğinde hücre canlılıkları tek başına HgCl₂ varlığında tespit edilenden daha yüksek bulundu. Bununla birlikte 2 µM ve 5 µM HgCl₂ varlığında 2 µg/ml metformin ilavesiyle sırayla (%31,61 ve %41,20 artış) NOx ve (%43,50 ve %65,29 artış) Q değerleri anlamlı olarak artış gösterdi. 5 µg/ml metformin varlığında ise NOx değerleri düşük doz metforminde görülen düzeylere göre bir miktar düşük bulundu. Ancak hücre canlılığı 5 µM HgCl₂'de ise oksidatif stres istatistiksel olarak anlamlı olarak artmıştır (p<0,05) (Bkz. Çizelge 4.2.).

Birinci hücre siklusunda, her doz HgCl_2 ile hem 10 μM hem de 20 μM kafein ilavesi ile hücre canlılıklarının arttığı, bu artışlardan yalnızca 1 μM HgCl_2 'ye 10 μM kafein uygulaması ve 5 μM HgCl_2 'ye 20 μM kafein uygulanması ile istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi ($p < 0,05$). Yine HgCl_2 uygulaması sonrasında ilave edilen her iki kafein dozu ile NOx düzeylerinin kontrol seviyesine düştüğü gözlemlendi, bununla birlikte Q 'inde düştüğü görüldü.

Çizelge 4.3. İkinci hücre siklusunda metil cıva klorür, metformin ve kafeinin hücre canlılığı, nitrik oksit ve oksidatif stres düzeylerine etkisi

	MTT (%)	% artış	NOx (μM)	% artış	Q ($\mu\text{M}/\%$)	% artış
Kontrol	100 $\pm$ 0,23		44,94 $\pm$ 4,69		0,45 $\pm$ 0,05	
1μM MeHgCl	83,65 $\pm$ 3,11*	-16,35	50,24 $\pm$ 3,20	11,78	0,60 $\pm$ 0,05	34,18
2μM MeHgCl	54,21 $\pm$ 1,13*	-45,79	57,14 $\pm$ 6,72	27,14	1,06 $\pm$ 0,14*	135,79
5μM MeHgCl	31,14 $\pm$ 3,78*	-68,86	40,47 $\pm$ 2,19	-9,95	1,35 $\pm$ 0,22*	200,61
2$\mu\text{g}/\text{ml}$ Metformin	113,78 $\pm$ 6,51*	13,78	51,53 $\pm$ 2,96	14,66	0,45 $\pm$ 0,02	0,96
5$\mu\text{g}/\text{ml}$ Metformin	105,71 $\pm$ 6,80	5,71	51,69 $\pm$ 6,61	15,01	0,50 $\pm$ 0,09	11,11
10μM Kafein	90,78 $\pm$ 6,20	-9,22	65,96 $\pm$ 6,74*	46,77	0,73 $\pm$ 0,08*	63,06
20μM Kafein	91,93 $\pm$ 5,21	-8,07	57,18 $\pm$ 6,96	27,23	0,62 $\pm$ 0,04*	37,40
1μM MeHgCl + 2$\mu\text{g}/\text{ml}$ Metformin	92,33 $\pm$ 2,13*	-7,67	47,29 $\pm$ 5,56	5,24	0,51 $\pm$ 0,07	14,53
2μM MeHgCl + 2$\mu\text{g}/\text{ml}$ Metformin	73,10 $\pm$ 1,50*	-26,90	51,84 $\pm$ 3,09	15,36	0,71 $\pm$ 0,03*	57,56
5μM MeHgCl + 2$\mu\text{g}/\text{ml}$ Metformin	23,87 $\pm$ 1,50*	-76,13	62,27 $\pm$ 3,55*	38,57	2,65 $\pm$ 0,33*	489,84
1μM MeHgCl + 5$\mu\text{g}/\text{ml}$ Metformin	94,07 $\pm$ 2,42*	-5,93	48,90 $\pm$ 3,17	8,81	0,52 $\pm$ 0,04	15,80
2μM MeHgCl + 5$\mu\text{g}/\text{ml}$ Metformin	72,83 $\pm$ 8,50*	-27,17	52,04 $\pm$ 2,35	15,79	0,73 $\pm$ 0,08*	62,96
5μM MeHgCl + 5$\mu\text{g}/\text{ml}$ Metformin	13,64 $\pm$ 1,69*	-86,36	50,90 $\pm$ 9,67	13,26	3,70 $\pm$ 0,48*	723,38
1μM MeHgCl + 10μM Kafein	103,15 $\pm$ 0,98*	3,15	60,63 $\pm$ 2,07*	34,90	0,59 $\pm$ 0,03*	30,88
2μM MeHgCl + 10μM Kafein	87,14 $\pm$ 2,26*	-12,86	55,10 $\pm$ 5,76	22,60	0,64 $\pm$ 0,08	41,42
5μM MeHgCl + 10μM Kafein	36,56 $\pm$ 2,56*	-63,44	48,94 $\pm$ 3,13	8,90	1,34 $\pm$ 0,03*	198,21
1μM MeHgCl + 20μM Kafein	104,47 $\pm$ 5,34	4,47	38,67 $\pm$ 0,84	-13,96	0,37 $\pm$ 0,02	-17,09
2μM MeHgCl + 20μM Kafein	74,13 $\pm$ 8,18*	-25,87	51,57 $\pm$ 3,59	14,75	0,71 $\pm$ 0,10*	58,58
5μM MeHgCl + 20μM Kafein	32,69 $\pm$ 1,51*	-67,31	56,39 $\pm$ 8,06	25,48	1,75 $\pm$ 0,31*	289,62

* $p < 0,05$; Kontrole göre istatistiksel olarak farklı örnekler. (MTT: % hücre canlılığındaki değişim, NOx : [$\text{NO}_2 + \text{NO}_3$], Q: NOx/MTT , % artış: Kontrole göre % artış)

İkinci hücre siklusunda, kontrole göre 2 μM ve 5 μM MeHgCl'de oksidatif stresin (Q) istatistiksel anlamlı olarak arttığı ($p < 0,05$), hücre canlılığının (MTT) ise 1 μM 'da da istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı ($p < 0,05$), NOx düzeylerinin ise farksız olduğu ($p > 0,05$) tespit edildi. MeHgCl'nin her dozuna 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ metformin ilavesi oksidatif stresi

kontrole göre azaltmadığı, hatta 5 μM MeHgCl ile daha da çok arttığı gözlenmiştir. MeHgCl'nin her dozuna 5 μM metformin ilavesinin oksidatif stresi kontrole göre 2 $\mu\text{g/ml}$ metformin gibi etkilediği gözlemlendi. İkinci hücre siklusunda tüm MeHgCl dozlarına karşılık 2 $\mu\text{g/ml}$ ve 5 $\mu\text{g/ml}$ terapötik dozlarında metformin ilavesiyle hücre canlılıkları MeHgCl dozları arttıkça kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı bulundu ($p<0,05$) (Bkz. Çizelge 4.3.).

10 μM kafein ilave edilen MeHgCl'ün her dozunda da hücre canlılıkları tek başına MeHgCl'e göre daha yüksek bulundu, ancak oksidatif stres (Q) kontrole göre hala yüksek olduğu görüldü. NOx düzeyleri ise tüm 10 μM kafein ilave edilen örneklerde artmış olup yalnızca 1 μM MeHgCl'ye 10 μM kafein ilave edildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi ($p<0,05$). 20 μM kafein ilavesi MeHgCl maruziyetinde hücre canlılığının anlamlı artmış olduğu, ancak NOx sentezi biraz daha fazla olduğundan Q'nun 10 μM kafeindekine oranla daha yüksek olduğu gözlemlendi (Bkz. Çizelge 4.3.).

Çizelge 4.4. İkinci hücre siklusunda cıva klorür, metformin ve kafeinin hücre canlılığı, nitrik oksit ve oksidatif stres düzeylerine etkisi

	MTT (%)	% artış	NOx (μM)	% artış	Q ($\mu\text{M}/\%$)	% artış
Kontrol	100 $\pm$ 0,23		44,94 $\pm$ 4,69		0,45 $\pm$ 0,05	
1μM HgCl₂	89,23 $\pm$ 0,71*	-10,77	45,18 $\pm$ 4,32	0,52	0,51 $\pm$ 0,05	12,80
2μM HgCl₂	76,38 $\pm$ 0,49*	-23,62	50,47 $\pm$ 3,89	12,30	0,66 $\pm$ 0,05*	46,96
5μM HgCl₂	61,42 $\pm$ 1,33*	-38,58	49,25 $\pm$ 4,84	9,60	0,81 $\pm$ 0,10*	79,35
2$\mu\text{g/ml}$ Metformin	113,78 $\pm$ 6,51*	13,78	51,53 $\pm$ 2,96	14,66	0,45 $\pm$ 0,02	0,96
5$\mu\text{g/ml}$ Metformin	105,71 $\pm$ 6,80	5,71	51,69 $\pm$ 6,61	15,01	0,50 $\pm$ 0,09	11,11
10μM Kafein	90,78 $\pm$ 6,20	-9,22	65,96 $\pm$ 6,74*	46,77	0,73 $\pm$ 0,08*	63,06
20μM Kafein	91,93 $\pm$ 5,21	-8,07	57,18 $\pm$ 6,96	27,23	0,62 $\pm$ 0,04*	37,40
1μM HgCl₂ + 2$\mu\text{g/ml}$ Metformin	88,11 $\pm$ 1,31*	-11,89	59,76 $\pm$ 4,28	32,98	0,68 $\pm$ 0,06*	51,16
2μM HgCl₂ + 2$\mu\text{g/ml}$ Metformin	68,19 $\pm$ 4,80*	-31,81	64,55 $\pm$ 3,28*	43,63	0,95 $\pm$ 0,02*	111,24
5μM HgCl₂ + 2$\mu\text{g/ml}$ Metformin	37,11 $\pm$ 1,78*	-62,89	62,31 $\pm$ 3,10*	38,66	1,69 $\pm$ 0,13*	276,01
1μM HgCl₂ + 5$\mu\text{g/ml}$ Metformin	98,51 $\pm$ 6,10	-1,49	71,80 $\pm$ 6,65*	59,77	0,74 $\pm$ 0,11*	64,99
2μM HgCl₂ + 5$\mu\text{g/ml}$ Metformin	69,46 $\pm$ 1,84*	-30,54	66,59 $\pm$ 3,05*	48,17	0,96 $\pm$ 0,07*	114,12
5μM HgCl₂ + 5$\mu\text{g/ml}$ Metformin	34,99 $\pm$ 1,53*	-65,01	66,86 $\pm$ 3,30*	48,78	1,91 $\pm$ 0,05*	325,18
1μM HgCl₂ + 10μM Kafein	100,29 $\pm$ 8,35	0,29	68,51 $\pm$ 4,31*	52,44	0,69 $\pm$ 0,02*	52,60
2μM HgCl₂ + 10μM Kafein	92,81 $\pm$ 1,27*	-7,19	52,55 $\pm$ 4,46	16,93	0,57 $\pm$ 0,05	25,92
5μM HgCl₂ + 10μM Kafein	90,27 $\pm$ 7,95	-9,73	49,57 $\pm$ 4,47	10,30	0,55 $\pm$ 0,02*	22,23
1μM HgCl₂ + 20μM Kafein	93,66 $\pm$ 3,24*	-6,34	46,27 $\pm$ 4,14	2,97	0,49 $\pm$ 0,03	9,55

Çizelge 4.4. İkinci hücre siklusunda cıva klorür, metformin ve kafeinin hücre canlılığı, (devamı) nitrik oksit ve oksidatif stres düzeylerine etkisi

	MTT (%)	% artış	NOx (µM)	% artış	Q (µM/%)	% artış
2µM HgCl₂ + 20µM Kafein	96,96 ± 5,70	-3,04	46,98 ± 3,92	4,54	0,49 ± 0,05	8,73
5µM HgCl₂ + 20µM Kafein	107,77 ± 7,47	7,77	54,31 ± 6,65	20,86	0,50 ± 0,03	11,24

*p<0,05; Kontrole göre istatistiksel olarak farklı örnekler. (MTT: % hücre canlılığındaki değişim, NOx: [NO₂+NO₃], Q: NOx/MTT, % artış: Kontrole göre % artış)

İkinci hücre siklusunda, 2 µM ve 5 µM HgCl₂ maruziyetinde Q'nun istatistiksel anlamlı olarak artmış olduğu, MTT'nin 1µM'da da istatistiksel olarak anlamlı düştüğü ve NOx'in ise istatistiksel olarak farksız olduğu gözlemlendi. Bulunan sonuçlara göre, her iki cıva türünde de 5 µM'da oksidatif stresin daha şiddetli olduğu tespit edilmiştir. 2 µg/ml metformin ilave edildikten sonra hücre canlılıklarının her üç HgCl₂ dozunda doz arttıkça istatistiksel olarak azaldığı bulundu (p<0,05). Bu sefer NOx düzeyleri ve Q'nun birlikte arttığı gözlemlendi. Bu sonuca göre, oksidatif stresin inorganik HgCl₂ ile metformin kombinasyonunda NO ile birlikte arttığı düşünülmektedir. HgCl₂ maruziyetinde 2 µg/ml metformin ile tek başına HgCl₂'ye göre anlamlı fark görülmezken (p>0,05), 5 µg/ml metformin ilave edilince hücre canlılığında artış olduğu NOx sentezinde azalma ve Q'de azalma görüldü (p>0,05). Hücre canlılıklarında her iki metformin dozu ilave edilince az artış olduğu, ancak NOx arttığında Q'nun da arttığı gözlemlendi. Burada AMPK aktivasyonu nedeniyle hücrelerin patolojik yolağa girerek NO salımını arttırdığı düşünülmektedir.

Yine ikinci hücre siklusunda, HgCl₂'ün her dozuna 10 µM kafein ilavesi hücre canlılıklarını tek başına HgCl₂'e göre oldukça artırdığı gözlemlendi. Oksidatif stresin ise yine 1 µM HgCl₂'de 10 µM kafein ilavesiyle istatistiksel olarak anlamlı yükseldiği (p<0,05), ancak 2 µM ve 5 µM HgCl₂ ile kafein ilavesinin Q düzeylerini tek başına HgCl₂'dekine göre düşürdüğü gözlemlendi. HgCl₂'ün her dozuna 20 µM kafein ilavesiyle tek başına HgCl₂'e göre Q düzeyinin azaldığı, hücre canlılıklarının ise arttığı gözlemlendi (Bkz. Çizelge 4.4.).

Çizelge 4.5. Birinci ve ikinci hücre sikluslarında metil cıva klorür, metformin ve kafeinin hücre canlılığı, nitrik oksit ve oksidatif stres düzeylerine etkisi

	Süre (saat)	MTT (%)	% artış	NOx (µM)	% artış	Q (µM/%)	% artış
Kontrol	24	100 ± 0,25	-0,004	42,55 ± 0,37	5,62	0,43 ± 0,005	5,63
	48	100 ± 0,23		44,94 ± 4,69		0,45 ± 0,05	
1µM MeHgCl	24	91,31 ± 2,26	-8,39	46,59 ± 4,98	7,83	0,51 ± 0,04	18,70
	48	83,65 ± 3,11		50,24 ± 3,20		0,60 ± 0,05	
2µM MeHgCl	24	80,68 ± 2,77*	-32,81	53,18 ± 3,85	7,45	0,66 ± 0,05*	60,44
	48	54,21 ± 1,13		57,14 ± 6,72		1,06 ± 0,14	

Çizelge 4.5. Birinci ve ikinci hücre sikluslarında metil cıva klorür, metformin ve kafeinin (devamı) hücre canlılığı, nitrik oksit ve oksidatif stres düzeylerine etkisi

	Süre (saat)	MTT (%)	% artış	NOx (µM)	% artış	Q (µM/%)	% artış
5µM MeHgCl	24	28,72 ± 1,62	8,44	55,33 ± 1,75*	-26,86	1,94 ± 0,11	-30,27
	48	31,14 ± 3,78		40,47 ± 2,19		1,35 ± 0,22	
2µg/ml Metformin	24	109,63 ± 0,69	3,78	49,29 ± 2,92	4,53	0,45 ± 0,02	0,96
	48	113,78 ± 6,51		51,53 ± 2,96		0,45 ± 0,02	
5µg/ml Metformin	24	109,52 ± 6,96	-3,49	61,80 ± 2,28	-16,37	0,57 ± 0,06	-12,60
	48	105,71 ± 6,80		51,69 ± 6,61		0,50 ± 0,09	
10µM Kafein	24	102,40 ± 6,71	-11,35	60,39 ± 6,55	9,22	0,59 ± 0,03	25,02
	48	90,78 ± 6,20		65,96 ± 6,74		0,73 ± 0,08	
20µM Kafein	24	101,10 ± 1,95	-9,07	48,98 ± 6,90	16,73	0,49 ± 0,07	27,20
	48	91,93 ± 5,21		57,18 ± 6,96		0,62 ± 0,04	
1µM MeHgCl + 2µg/ml Metformin	24	102,71 ± 2,81*	-10,11	53,02 ± 8,43	-10,80	0,52 ± 0,09	-1,11
	48	92,33 ± 2,13		47,29 ± 5,56		0,51 ± 0,07	
2µM MeHgCl + 2µg/ml Metformin	24	92,25 ± 1,65*	-20,76	58,47 ± 1,43	-11,33	0,63 ± 0,02	11,60
	48	73,10 ± 1,50		51,84 ± 3,09		0,71 ± 0,03	
5µM MeHgCl + 2µg/ml Metformin	24	20,99 ± 1,17	13,73	58,98 ± 0,27	5,59	2,83 ± 0,17	-6,29
	48	23,87 ± 1,50		62,27 ± 3,55		2,65 ± 0,33	
1µM MeHgCl + 5µg/ml Metformin	24	99,37 ± 3,44	-5,33	63,49 ± 11,35	-22,98	0,63 ± 0,09	-17,71
	48	94,07 ± 2,42		48,90 ± 3,17		0,52 ± 0,04	
2µM MeHgCl + 5µg/ml Metformin	24	92,95 ± 1,49*	-21,65	49,92 ± 4,60	4,24	0,54 ± 0,04*	36,67
	48	72,83 ± 8,50		52,04 ± 2,35		0,73 ± 0,08	
5µM MeHgCl + 5µg/ml Metformin	24	18,56 ± 0,81*	-26,51	57,73 ± 5,66	-11,82	3,10 ± 0,23	19,32
	48	13,64 ± 1,69		50,90 ± 9,67		3,70 ± 0,48	
1µM MeHgCl + 10µM Kafein	24	104,35 ± 8,26	-1,15	64,04 ± 5,22	-5,33	0,62 ± 0,08	-5,72
	48	103,15 ± 0,98		60,63 ± 2,07		0,59 ± 0,03	
2µM MeHgCl + 10µM Kafein	24	95,95 ± 3,80	-9,18	57,61 ± 3,05	-4,36	0,60 ± 0,05	5,17
	48	87,14 ± 2,26		55,10 ± 5,76		0,64 ± 0,08	
5µM MeHgCl + 10µM Kafein	24	71,49 ± 6,53*	-48,86	57,06 ± 15,63	-14,23	0,79 ± 0,21*	70,21
	48	36,56 ± 2,56		48,94 ± 3,13		1,34 ± 0,03	
1µM MeHgCl + 20µM Kafein	24	91,46 ± 1,12*	14,23	43,69 ± 7,77	-11,49	0,48 ± 0,08	-21,93
	48	104,47 ± 5,34		38,67 ± 0,84		0,37 ± 0,02	
2µM MeHgCl + 20µM Kafein	24	102,56 ± 0,90*	-27,72	59,06 ± 4,47	-12,68	0,58 ± 0,04	23,86
	48	74,13 ± 8,18		51,57 ± 3,59		0,71 ± 0,10	
5µM MeHgCl + 20µM Kafein	24	74,57 ± 4,32*	-56,16	66,39 ± 4,75	-15,06	0,90 ± 0,12*	93,65
	48	32,69 ± 1,51		56,39 ± 8,06		1,75 ± 0,31	

*p<0,05; Birinci ve ikinci hücre sikluslarının istatistiksel olarak karşılaştırılması. (MTT: % hücre canlılığındaki değişim, NOx: [NO₂+NO₃], Q: NOx/MTT, % artış: Kontrole göre % artış)

2 µM MeHgCl'e maruz kalan hücrelerde birinci hücre siklusuna göre ikinci hücre siklusunda hücre canlılığında %32,81'lik istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlenmiştir (p<0,05). Bu azalışa karşılık aynı dozda ikinci siklusta oksidatif strese anlamlı (p<0,05) bir artış görülmüştür. 1 µM ve 2 µM MeHgCl'e 2 µg/ml metformin eklendiği zaman birinci siklusa göre ikinci siklusta istatistiksel olarak anlamlı düşüşler gözlenmiştir

($p<0,05$). 5 $\mu\text{g/ml}$ metformin ilavesiyle 2 μM ve 5 μM MeHgCl'de anlamlı bir azalma gözlenirken yalnızca 2 μM MeHgCl'de oksidatif strete istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir. MeHgCl'ye maruz kalanlarda metformin kullanımının terapötik dozlarda bile oksidatif strete artışa neden olduğu gözlemlendi. 1 μM MeHgCl'ye 10 μM kafein ilavesiyle birinci siklusa göre ikinci siklusta anlamlı bir artış görülmüştür, bununla birlikte NOx ve oksidatif stres değerlerinde azalma olmasına karşın istatistiksel anlamsızdı. Yalnız 5 μM MeHgCl'ye 10 μM kafein ilavesiyle ikinci siklusta birinci siklusa göre %70,21'lik anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0,05$). Aynı şekilde aynı dozlarda hücre canlılıklarındaki azalma da anlamlı olup NOx düzeylerinde değişim ise anlamsızdır ($p>0,05$). Bunun sebebinin ikinci hücre siklusu sonunda kafeinin antioksidan enzim düzeylerinde azalma olduğu tahmin edilmektedir. MeHgCl'ün tüm dozlarına 20 μM kafein ilavesiyle iki siklus arasındaki değişim sırasıyla %14,23 anlamlı artma, %27,72 ve %56,16 anlamlı azalma görülmüştür. Ek olarak, hem 10 μM hem de 20 μM kafein ilavesiyle MeHgCl dozlarının artmasıyla doğru orantılı olarak sikluslar arasındaki oksidatif stres düzeyleri paralellik göstermiştir.

Çizelge 4.6. Birinci ve ikinci hücre sikluslarında cıva klorür, metformin ve kafeinin hücre canlılığı, nitrik oksit ve oksidatif stres düzeylerine etkisi

	Süre (saat)	MTT (%)	% artış	NOx (μM)	% artış	Q ($\mu\text{M}/\%$)	% artış
Kontrol	24	100 $\pm$ 0,25	-0,004	42,55 $\pm$ 0,37	5,62	0,43 $\pm$ 0,00	5,63
	48	100 $\pm$ 0,23		44,94 $\pm$ 4,69		0,45 $\pm$ 0,05	
1μM HgCl₂	24	91,00 $\pm$ 0,73	-1,94	48,98 $\pm$ 7,39	-7,77	0,54 $\pm$ 0,08	-5,78
	48	89,23 $\pm$ 0,71		45,18 $\pm$ 4,32		0,51 $\pm$ 0,05	
2μM HgCl₂	24	81,47 $\pm$ 1,54*	-6,25	48,75 $\pm$ 5,62	3,54	0,60 $\pm$ 0,07	10,22
	48	76,38 $\pm$ 0,49		50,47 $\pm$ 3,89		0,66 $\pm$ 0,05	
5μM HgCl₂	24	75,40 $\pm$ 1,75*	-18,53	53,92 $\pm$ 4,62	-8,65	0,71 $\pm$ 0,05	12,99
	48	61,42 $\pm$ 1,33		49,25 $\pm$ 4,84		0,81 $\pm$ 0,10	
2$\mu\text{g/ml}$ Metformin	24	109,63 $\pm$ 0,69	3,78	49,29 $\pm$ 2,92	4,53	0,45 $\pm$ 0,02	0,96
	48	113,78 $\pm$ 6,51		51,53 $\pm$ 2,96		0,45 $\pm$ 0,02	
5$\mu\text{g/ml}$ Metformin	24	109,52 $\pm$ 6,96	-3,49	61,80 $\pm$ 2,28	-16,37	0,57 $\pm$ 0,06	-12,60
	48	105,71 $\pm$ 6,80		51,69 $\pm$ 6,61		0,50 $\pm$ 0,09	
10μM Kafein	24	102,40 $\pm$ 6,71	-11,35	60,39 $\pm$ 6,55	9,22	0,59 $\pm$ 0,03	25,02
	48	90,78 $\pm$ 6,20		65,96 $\pm$ 6,74		0,73 $\pm$ 0,08	
20μM Kafein	24	101,10 $\pm$ 1,95	-9,07	48,98 $\pm$ 6,90	16,73	0,49 $\pm$ 0,07	27,20
	48	91,93 $\pm$ 5,21		57,18 $\pm$ 6,96		0,62 $\pm$ 0,04	
1μM HgCl₂ + 2$\mu\text{g/ml}$ Metformin	24	92,07 $\pm$ 6,48	-4,30	55,10 $\pm$ 6,21	8,47	0,61 $\pm$ 0,10	11,03
	48	88,11 $\pm$ 1,31		59,76 $\pm$ 4,28		0,68 $\pm$ 0,06	
2μM HgCl₂ + 2$\mu\text{g/ml}$ Metformin	24	91,61 $\pm$ 5,90*	-25,56	56,00 $\pm$ 4,48	15,27	0,61 $\pm$ 0,02*	55,50
	48	68,19 $\pm$ 4,80		64,55 $\pm$ 3,28		0,95 $\pm$ 0,02	
5μM HgCl₂ + 2$\mu\text{g/ml}$ Metformin	24	85,67 $\pm$ 4,12*	-56,69	60,08 $\pm$ 2,30	3,72	0,70 $\pm$ 0,03*	140,30
	48	37,11 $\pm$ 1,78		62,31 $\pm$ 3,10		1,69 $\pm$ 0,13	

Çizelge 4.6. Birinci ve ikinci hücre sikluslarında cıva klorür, metformin ve kafeinin hücre (devamı) canlılığı, nitrik oksit ve oksidatif stres düzeylerine etkisi

	Süre (saat)	MTT (%)	% artış	NOx (µM)	% artış	Q (µM/%)	% artış
1µM HgCl ₂ + 5µg/ml Metformin	24	98,22 ± 5,90	0,30	44,71 ± 7,72*	60,61	0,46 ± 0,10	59,65
	48	98,51 ± 6,10		71,80 ± 6,65		0,74 ± 0,11	
2µM HgCl ₂ + 5µg/ml Metformin	24	94,04 ± 6,41*	-26,14	42,08 ± 3,12*	58,25	0,45 ± 0,05*	112,69
	48	69,46 ± 1,84		66,59 ± 3,05		0,96 ± 0,07	
5µM HgCl ₂ + 5µg/ml Metformin	24	78,29 ± 3,99*	-55,30	41,06 ± 0,77*	62,85	0,53 ± 0,02*	263,25
	48	34,99 ± 1,53		66,86 ± 3,30		1,91 ± 0,05	
1µM HgCl ₂ + 10µM Kafein	24	115,99 ± 3,43	-13,54	40,67 ± 5,10*	68,47	0,35 ± 0,05*	94,01
	48	100,29 ± 8,35		68,51 ± 4,31		0,69 ± 0,02	
2µM HgCl ₂ + 10µM Kafein	24	111,54 ± 6,19*	-16,79	42,08 ± 13,91	24,88	0,38 ± 0,13	47,41
	48	92,81 ± 1,27		52,55 ± 4,46		0,57 ± 0,05	
5µM HgCl ₂ + 10µM Kafein	24	114,49 ± 7,30	-21,15	36,75 ± 10,81	34,90	0,33 ± 0,10*	68,13
	48	90,27 ± 7,95		49,57 ± 4,47		0,55 ± 0,02	
1µM HgCl ₂ + 20µM Kafein	24	104,19 ± 4,31*	-10,11	42,08 ± 3,98	9,97	0,40 ± 0,02	22,44
	48	93,66 ± 3,24		46,27 ± 4,14		0,49 ± 0,03	
2µM HgCl ₂ + 20µM Kafein	24	108,69 ± 8,06	-10,79	55,73 ± 7,80	-15,69	0,53 ± 0,11	-7,52
	48	96,96 ± 5,70		46,98 ± 3,92		0,49 ± 0,05	
5µM HgCl ₂ + 20µM Kafein	24	104,78 ± 1,43	2,86	43,06 ± 6,05	26,14	0,41 ± 0,06	21,15
	48	107,77 ± 7,47		54,31 ± 6,65		0,50 ± 0,03	

*p<0,05; Birinci ve ikinci hücre sikluslarının istatistiksel olarak karşılaştırılması. (MTT: % hücre canlılığındaki değişim, NOx: [NO₂+NO₃], Q: NOx/MTT, % artış: Kontrole göre % artış)

HgCl₂'ün ise 5 µM dozunda birinci hücre siklusuna göre ikinci hücre siklusunda canlılık %18,53'lük istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş rapor edilmiştir (p<0,05). 2 µM ve 5 µM HgCl₂'de ise birinci hücre siklusuna göre ikinci hücre siklusunda 2 µg/ml metformin ilavesiyle hücre canlılıkları istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır, bu sonuçla uyumlu olarak oksidatif strese de anlamlı dramatik artışlar (sırasıyla %55,50 ve %140,30) gözlenmiştir (p<0,05). 5 µg/ml metformin ilavesiyle de hücre canlılıklarının aynı dozlarda anlamlı azaldığı ve oksidatif stresin anlamlı artışı gözlenmiştir. 2 µM HgCl₂'e 10 µM kafein ilave edildiğinde ise ilk 24 saate göre ikinci 24 saat sonunda hücre canlılığı istatistiksel olarak azalmış, 5 µM HgCl₂ dozunda ise oksidatif stres düzeylerinde anlamlı artış gözlenmiştir. Buna karşılık, 5 µM HgCl₂'ye 10 µM kafein ilavesiyle sikluslar arasındaki hücre canlılığındaki azalma anlamlı değildi. Her iki siklusta da HgCl₂ maruziyetinde 10 µM ve 20 µM kafein ilavesinin hem hücre canlılığını artırdığı hem de NOx sentezini düşürdüğü hem de Q'yu azaltarak koruyucu etki gösterdiği görüldü. Hem kafein hem de metformine maruziyet sonucunda SH-SY5Y dopaminerjik nöron hücrelerinde NOx sentezinde artış görüldü.

5. TARTIŞMA

Bu çalışma, inorganik HgCl_2 ve organik MeHgCl 'ün farklı dozlarda yarattığı nörotoksisite üzerine AMPK uyarıcı olan metforminin ve bir A_{2A} reseptör antagonisti olan kafeinin SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleri üzerindeki etkilerini inceleyen ilk çalışmadır.

Japonya'da Minamata Körfezi'nde meydana gelen cıva faciası sonrasında yapılan bir çalışmaya göre bu bölgede cıvaya maruz kalanların beyinlerindeki cıva konsantrasyonu 1,7 μM 'dan 26 μM 'a kadar değişmektedir (Friberg ve Mottet, 1989). Bizim çalışmamızda da Şekil 4.1.'de görüldüğü gibi 25 μM 'dan sonra inorganik HgCl_2 'de SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinin ilk siklusundan sonra hücre canlılığı %50'nin altına düşmüş olup, Şekil 4.2.'de gösterilen MeHgCl 'de ise 5 μM 'dan sonra hücre canlılığının %50'nin altına indiği tespit edilmiştir. Toimela, Maenpaa, Mannerstroöm ve Tahti (2004), organik ve inorganik cıva bileşiğinin farklı toksisite gösterdiğini ve MeHg 'nın kan beyin bariyerini daha hızlı geçtiğini ve bariyer henüz hasar görmeden hedef hücreleri etkilediğini göstermiştir (Toimela, Maenpaa, Mannerstroöm ve Tahti, 2004). Ayrıca, HgCl_2 'ün toksisitesi ile ikinci hücre siklusunda birinci hücre siklusuna göre daha fazla olmak üzere doz-bağımlı olarak hücre sayısında azalma gözlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.5.). Bunun yanında MeHgCl 'de ise birinci hücre siklusunda 5 μM 'lık konsantrasyona ulaşmadan önceki daha düşük bir konsantrasyonda hücrelerin %50'sinin öldüğü, yine ikinci hücre siklusunda ise 2 μM dozda dahi hücrelerin %54'ünün canlı kaldığı gözlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.6.). Yani, bizim çalışmamızda inorganik cıva ile karşılaştırıldığında organik cıvanın çok daha toksik olduğunu, bu toksisitesinin özellikle konsantrasyonları arttıkça daha belirgin olduğunu gördük (Bkz. Şekil 4.1 ve 4.2.).

Hazırlanan bir raporda, şu anki uluslararası kabul gören MeHg maruziyetinin ABD RfD'ye göre 2,3 kat yüksek olduğu, Gıda Katkıları FAO/WHO Ortak Uzmanlar Komitesi'nin (JECFA) bu dozun yaklaşık 8,7 $\mu\text{g/l}$ 'lik maternal kan cıva seviyesine neden olduğu ve referans değerlerin birbirinden farklı olduğu vurgulanmıştır (Groth, 2012). Balık tüketimi ile ilgili çalışmalarda, ortalama kan cıva seviyesi, balık yemeyenlerde 2,0 $\mu\text{g/l}$ iken haftada iki ya da dört porsiyon balık yiyenlerde kan cıva seviyeleri 8,4 $\mu\text{g/l}$ 'ye çıkmaktadır (Jedrychowski ve diğerleri, 2006). Newland ve Reile (1999) tarafından sıçanlar üzerinde yapılan çalışmada fetüs perinatal maruziyetten etkilenmekte olup MeHg kan:beyin oranı

1,0'ın altında örneğin, doğumda 0,13-0,17 arasındadır (Newland ve Reile, 1999). Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada kronik olarak içme suyu verilenlerde 4. postnatal günde kan:beyin oranı 1,41-1,71 iken, yetişkinde aynı koşullarda 14 aydan uzun süreli MeHg maruziyetinde bu oran 0,54-0,63 olarak kaydedilmiştir (Stern, Cox, Cernichiari, Balys ve Weiss, 2001). Bunun yanı sıra, makak maymunlarında yapılan bir çalışmada infantlarda dört haftalık verilen dozlarda kan:beyin oranının 2,5 olduğu da rapor edilmiştir (Burbacher, Grant, Mayfield, Gilbert ve Rice, 2005).

Ayrıca, yapılan birçok epidemiyolojik çalışmada düşük miktarlardaki cıvanın etkileri ve fazla balık tüketimi olan bölgelerde yaşayan insanlarda, özellikle küçük çocuklardaki etkileri incelenmiştir. Maternal ve kordon kanındaki cıva seviyelerinin birbiriyle önemli biçimde korele olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Jedrychowski ve diğerleri, 2006). Balina eti ile beslenmenin yaygın olduğu Faroe adalarında 1022 çocuk doğumdan itibaren 7 yaşına kadar incelenmiş olup, yüksek prenatal cıva maruziyeti olanlarda düşük davranış, dil becerisi, hafıza, koordinasyon ve diğer motor cevaplarda azalma gözlenmiştir (Grandjean ve diğerleri, 1997). Nöronal hücre hattında yapılan bir çalışmada MeHg maruziyetinin (1-10 μM) hücresel fonksiyonları değiştirerek sonunda patofizyolojik hasar ve hücre ölümüne neden olan oksidatif stres üretimi ile toksik etkileri indüklediği rapor edilmiştir (Garg ve Chang, 2006). SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleri üzerinde yapılan bir deneyde 1-100 μM arasındaki MeHgCl konsantrasyonları ile çalışmalar yapılmış ve bu aralıkta hücre sitotoksitesi gözlemlenmiştir (Toimela ve diğerleri, 2004). Mink üzerinde yapılan deneylerde MeHgCl bazal ganglia, beyin sapı, serebellum ve oksipital kortekste hücre membranlarındaki NMDA reseptörlerine bağlanmayı %50 oranında inhibe ettiği konsantrasyonları 320 μM 'ın üzerinde bulunmuştur (Basu ve diğerleri, 2007). Farelerle yapılan bir deneyde, düşük doz MeHgCl uygulandıktan sonra anne kanı konsantrasyonu $142,9 \pm 5,8 \mu\text{g/l}$ olup 7 gün muamele sonrasında serebral korteks, serebellar korteks ve beyin sapında sırasıyla $12,2 \pm 0,5 \mu\text{g/l}$, $28,4 \pm 0,4 \mu\text{g/l}$, $19,9 \pm 1,0 \mu\text{g/l}$ konsantrasyonları bulunmuştur (Huang, Liu, Hsu ve Lin-Shiau, 2011). SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleri üzerinde yapılan bir deneyde literatürden elde edilen veriye göre 1-50 μM arasında değişen MeHg konsantrasyonları kullanılmış olup DNA hasarını gözlemlmek üzere 0,125 μM 'a kadar inen düşük değerler de tercih edilmiştir (Das, Nageshwar ve Satish, 2011).

MeHg ile indüklenen hücre ölümünün üç ana mekanizma ile gerçekleştiği düşünülmektedir; 1) kalsiyum homeostazının bozulması (Atchison ve Hare, 1994; Graff, Falconer, Brown ve Reuhl, 1997); 2) reaktif oksijen radikallerinin artması veya antioksidan savunmanın azalması ile oksidatif stresin ortadan kaldırılamaması (LeBel, Ali, McKee ve Bondy, 1990; Sarafian ve Verity, 1991; ve Yee ve Choi, 1994); 3) sülfhidril gruplarıyla girişim sonucunda sistein ve metiyonin taşıyan proteinler ile kompleks oluşturması. MeHg ile indüklenmiş nörotoksisitenin önemli moleküler hedefleri sülfidril içeren proteinler ve nonprotein tiyollerdir (çoğunlukla GSH), bunun nedeni MeHg'nin elektrofilik yapıda olması, bu moleküllerle etkileşime girmesi ve nükleofilik yapılarını okside etmesidir (Farina, Avila, da Rocha ve Aschner, 2013).

In vitro ve *in vivo* çalışmalarda, MeHg'ya maruz kalan nöron hücrelerinde hücre ölümü, hücre yapısının bozulması gibi olayların görüldüğü tespit edilmiştir (Ceccatelli ve diğerleri, 2010). MeHg'ya maruziyet sonucunda hücre içi kalsiyum miktarının arttığı birçok farklı hücre tipinde gösterilmiştir (Atchison ve Hare, 1994; Graff, Falconer, Brown ve Reuhl, 1997; Marty ve Atchison, 1997, 1998; Sarafian, 1993). MeHg'nin süperoksit, hidrojen peroksit ve lipid peroksidasyonunu artırdığı (LeBel, Ali, McKee ve Bondy, 1990; Sarafian ve Verity, 1991; Oyama ve diğerleri, 2000), buna bağlı olarak, sıçanlarda yapılan çalışmada ise beyinde (ONOO⁻) miktarında artma olduğu gözlenmiştir (Miyamoto ve diğerleri, 2001). Diğer taraftan MeHg, GSH ve SOD miktarlarında azalmaya neden olmaktadır (Shenker, Guo, I. O., Shapiro, 1999). MeHg, sülfidril gruplarına karşı büyük afinite göstermesi nedeniyle GSH miktarında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Shanker, Syversen, Aschner, J. L. ve Aschner, M., 2005). Toimela ve diğerlerinin (2004) çalışmasına göre 0,1-100 μ M konsantrasyonlarda MeHg'nin SH-SY5Y hücrelerinde mitokondriyal dehidrojenaz aktivitesinde azalmaya bağlı olarak kaspaz aktivasyonu ile nöroblastoma hücrelerinde apoptozun aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (Toimela ve diğerleri, 2004). Bizim çalışmamızda da 1-5 μ M konsantrasyonlarda MeHgCl₂'ün hücre canlılığında kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı azaldığını ($p < 0,05$) tespit ettik. Öyle ki bu azalma 5 μ M MeHgCl₂ dozunda oldukça artmış ve birinci hücre siklusunda dahi $28,72 \pm 1,62$ hücre canlılığı gözlenmiştir ($p < 0,05$). Diğer taraftan 2-5 μ M organik MeHgCl ile NO sentezindeki artmayla birlikte muhtemel GSH miktarındaki azalma ve antioksidan dengenin bozulması ile her iki hücre siklusunda da oksidatif stresin uyarıldığı belirlendi.

MeHg, mitokondriyal membran depolarizasyonu olmadan mitokondriden Ca^{+2} 'nin salınmasına neden olur (Atchison ve Hare, 1994). Cıvanın genotoksisiteye öncülük eden serbest radikallerin ve oksidatif stresin oluşumu, mikrotübüllerdeki etkiler, DNA onarım mekanizmalarındaki etkiler ve DNA molekülleri ile doğrudan etkileşim gibi birçok biyolojik olaya katıldığı bilinmektedir (Crespo-Lopez ve diğerleri, 2009). Öte yandan, MeHg ile uyarılan eksitotoksitede astrositler kilit rol oynar. MeHg astrositlerde birikirken spesifik olarak glutamat tutulumunu inhibe eder (Aschner, Yao, Allen ve Tan, 2000). Glutamat reseptörlerinden biri olan NMDA reseptörlerinin aşırı aktivasyonuna bağlı olarak nöronal dejenerasyon ve nöronal ölümün, iskemi sonrasında reperfüzyon ile artan oksidatif radikallere bağlı olarak görüldüğü düşünülmektedir (Meldrum, 2000). Nöronal hücre kültüründe yapılan bir çalışmada, nNOS aktivasyonu ve nörotoksitesinin NMDA reseptörleri aracılığıyla oluştuğu ve bu proseste glutamat reseptörlerinin aşırı stimülasyonunun rol oynadığı düşünülmektedir (Brito ve diğerleri, 2010).

İsveç'te yapılan bir çalışmada gebe kadınların kordon kanındaki MeHg'nin çok düşük 2,5-5 nM doz seviyelerinin spontan nöronal farklılaşmayı inhibe ettiği gözlenmiştir (Ceccatelli ve diğerleri, 2010). Ayrıca 10-100 μM organik MeHg ve HgCl_2 ile inkübe edilen fare beyninden alınan mitokondriden zengin kısımlarda indirgenmiş mitokondriyal GSH tüketimi, hücre canlılığında azalma ve hidrojen peroksit üretiminde artma ile korele bulunmuştur (Franco ve diğerleri, 2007). Ayrıca cıva uygulamasının beyinde GSH içeriğinde belirgin bir tüketime yol açtığı belirtilmekte ve sıçanlarda apoptotik markörler olan Bax (kontrol: $5,11 \pm 0,24$ Hg; $9,84 \pm 0,21$) ve Bax/Bcl-2 (kontrol: $0,18 \pm 0,01$, Hg: $0,38 \pm 0,02$) oranının kontrole göre belirgin biçimde cıva etkisiyle arttığı gözlenmiştir (Moneim, baskıda). Bunun yanında, MeHg'nin tiyol gruplarına olan yüksek afinitesi nM konsantrasyonlarda bile sitozolik GSH konsantrasyonlarının mM aralıkta olduğu nöronal hücre kültürlerinde GPx aktivitesini belirgin biçimde düşürdüğü görülmüştür (Farina ve diğerleri, 2009).

MeHg sitozolik fosfolipaz A2 aktivasyonu ile araşidonik asit salgılanmasına ve glutamatın hücre içine alınmasının engellenmesine neden olur (Brookes, 1992). Hücre dışında aşırı glutamat birikmesi eksitotoksik uyarıma neden olur (Matyja ve Albrecht, 1993). Bizim çalışmamızda, MeHgCl₂'ün birinci hücre siklusunda hücre canlılıklarında istatistiksel olarak anlamlı azalma varken ($p < 0,05$) NOx düzeylerindeki değişimin daha az olduğu, buna karşın oksidatif stresin özellikle yüksek organik cıva dozlarında dramatik biçimde

arttığı gözlenmiştir. Birinci hücre siklusu ile uyumlu olarak, ikinci hücre siklusunda da oksidatif streste artış devam etmiş ve 2 μM ve 5 μM organik cıva konsantrasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı artışlar bulunmuştur ($p < 0,05$) (Bkz. Çizelge 4.1.). İkinci hücre siklusundaki oksidatif stres artışı devam etmesine rağmen NO_x düzeylerindeki değişim farksızdı ($p > 0,05$) (Bkz. Çizelge 4.3.). Bulunan bu sonuçlara göre, glutamat birikimi ile NMDA reseptör uyarısı sonucunda hücre içi kalsiyum düzeylerinde artmanın MeHg'ya maruz kalan SH-SY5Y hücrelerinde oksidatif strese neden olduğunu düşünmekteyiz. Glutamatın yanında MeHg, GSH sentezi için gerekli aminoasitlerin hücre dışından içine alınmasını da engellemektedir. Hücre içi GSH düzeylerinin azalmasıyla birlikte glutamat ile NMDA reseptörlerinin aşırı uyarımı sonucunda eksitotoksisite meydana gelmektedir (Aschner ve diğerleri, 2007). 1 μM , 2 μM ve 5 μM MeHgCl konsantrasyonlarında birinci hücre siklusunda hücre canlılıkları sırasıyla $91,31 \pm 2,26$, $80,68 \pm 2,77$, $28,72 \pm 1,62$ iken ikinci hücre siklusunda hücre canlılıkları sırasıyla $83,65 \pm 3,11$, $54,21 \pm 1,13$, $31,14 \pm 3,78$ olup sonuçların tümü istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$).

SY-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde yapılan bir deneyde 1 μM , 5 μM ve 10 μM HgCl_2 konsantrasyonlarına birinci hücre siklusu sonunda maruziyete karşılık intraselüler GSH'un sırasıyla 5 μM , 6 μM ve 8 μM 'e gerilediği gözlenmiştir (Becker ve Soliman, 2009). Farelerle yapılan bir deneyde, düşük doz HgCl_2 uygulandıktan sonra anne kanı konsantrasyonu HgCl_2 $69,8 \pm 8,8$ $\mu\text{g/l}$ olup 7 gün muamele sonrasında serebral korteks, serebellar korteks ve beyin sapında sırasıyla $16,4 \pm 0,8$ $\mu\text{g/l}$, $27,1 \pm 0,2$ $\mu\text{g/l}$, $23,9 \pm 2,9$ $\mu\text{g/l}$ konsantrasyonları bulunmuştur (Huang, Liu, Hsu ve Lin-Shiau, 2011). Mink üzerinde yapılan bir deneyde bazal ganglia, beyin sapı, serebellum ve oksipital kortekste sırasıyla $1,5 \pm 0,2$ μM , $6,3 \pm 0,3$ μM , $20,7 \pm 0,6$ μM , $2,9 \pm 0,2$ μM konsantrasyonları ile HgCl_2 'ün NMDA reseptörlerine bağlanmayı %50 oranında inhibe ettiği görülmüştür (Basu ve diğerleri, 2007). Nöronal kök hücrelerinde 2 $\mu\text{g/ml}$ ve 5 $\mu\text{g/ml}$ Hg^{+2} ikinci hücre siklusunda tübülün fonksiyonlarını inhibe etmiş olup bu da sinir hücrelerinde programlanmış olan hücre ölümü yani apoptoza neden olmuş ve ısı şok proteinlerinin ekspresyonunu tetiklemiştir (Cedrola ve diğerleri, 2003). Bizim çalışmamızda 1 μM , 5 μM ve 10 μM 'lik dozlar tek başına uygulandığında kontrole göre sırasıyla %9, %25, %34'lük azalma görülmüştür (Bkz. Şekil 4.1.). Aslında, hem inorganik hem de organik cıva bileşiklerinin etki mekanizması bu kimyasalların sülfhidril, tiyol grupları bulunan protein veya diğer biyolojik bileşiklere karşı afiniteleri olmasıdır (Risher ve Dewoskin, 1999). GSH'un kaybının HgCl_2 'ün toksik etkilerinde önemli rolü olduğu ve hücrel sülfhidril ve

GSH konsantrasyonlarını düşürerek canlılığı azalttığı bulunmuştur (Becker ve Soliman, 2009). 1 mM'ın üzerindeki yüksek inorganik HgCl_2 konsantrasyonlarında hücre içi kalsiyum miktarı artmakta olup $0,1 \pm 0,3$ mM Hg^{+2} ile 50 mM subletal NMDA konsantrasyonu kombine edildiğinde DNA parçalanması ve apoptotik hücre ölümü potansiyalize olmaktadır (Rossi ve diğerleri, 1997).

MeHg'ya göre beyne geçişi çok daha az olmakla birlikte benzer şekilde HgCl_2 'ün de hücre içi kalsiyum düzeylerinde 2-5 kat artmaya neden olduğunu, bu artışın HgCl_2 'ün NMDA reseptörlerini uyardığı ve hücre iskeletinde bozulmaya neden olduğu gösterilmiştir (Xu ve diğerleri, 2012). Diğer taraftan HgCl_2 'ün gama amino bütirik asit (GABA) üzerinde de düzenleyici etkisi olduğu, mitokondriyal bütünlüğü bozarak kaspaz 3 aktivasyonu ile apoptozu indüklemesiyle tespit edilmiştir (Wyrembek, Szczuraszek, Majewska ve Mozrzymas, 2010). Bizim verilerimize göre, MeHgCl'e göre HgCl_2 hücre canlılığında daha az azalmaya neden olmakla birlikte kontrollere göre doz bağımlı, birinci hücre siklusunda ve azalma artmış olarak ikinci hücre siklusunda da istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş meydana getirmiştir ($p < 0,05$). Hücre içi kalsiyum miktarındaki olası artış ile her iki hücre siklusunda da oksidatif strese artma gözlemlendi. Oksidatif streste bu artış, 2 μM ve 5 μM 'lık HgCl_2 konsantrasyonların birinci hücre siklusunda sırasıyla %40,68 (Q: $0,60 \pm 0,07$) ve %67,68 (Q: $0,71 \pm 0,05$), yine ikinci hücre siklusunda ise %46,96 (Q: $0,66 \pm 0,05$) ve %79,35 (Q: $0,81 \pm 0,10$) olarak bulunmuştur ($p < 0,05$). NMDA reseptörlerinin fonksiyonlarını sürdürebilmesi ve redoks dengesine cevap verebilmesi için sülfhidril grupları ile etkileşim gereklidir (Kuner, Wollmuth, Karlin, Seeburg ve Sakmann, 1996; Lipton ve diğerleri, 2002; Majewska, Bell ve London, 1990). Diğer taraftan yapılan çalışmalarda HgCl_2 'ün NMDA reseptörlerinin elektrofizyolojik özelliklerini azaltırken GABA-A reseptör cevabının arttığı gösterilmiştir (Wyrembek ve diğerleri, 2010).

AH'nda meydana gelen nörodejeneratif gelişimde, nöronların ölümüne neden olan çeşitli nöronal metabolik fonksiyon bozuklukları görülür (Meraz-Ríos, Franco-Bocanegra, Toral-Rios ve Campos-Peña, 2014). Bizim çalışmamızda da nöronal hücre ölümü ile sonuçlanan mekanizmaların aktive olduğunu düşünmekteyiz.

Sıçanlarda metformin ile yapılan bir çalışmada, kan ve beyin oranının 0,99 olduğu 6. saatte sırasıyla $13,8 \pm 2,8$ $\mu\text{mol/l}$ ve $13,5 \pm 2,3$ nmol/g metformin konsantrasyonları gözlemlenmiş olup akut oral maruziyette en fazla konsantrasyon serebrospinal sıvıda ($36,6 \pm 2,7$ $\mu\text{mol/l}$)

gözlenmiştir (Labuzek ve diğerleri, 2010). Ek olarak, *in vitro* prostat kanser hücre hattında yapılan bir çalışmada 96 saatlik maruziyette 5 mM metforminin androjen reseptör seviyelerini azalttığı ve büyümeyi durdurduğu gözlenmiştir (Demir, Koehler, Schneider, Schweiger ve Klocker, 2014). Ticari metforminin günde iki defa 500 mg oral kullanımı olup günlük en fazla 3 g alınmasına izin verilmektedir (Aurobindo Pharma Limited, 2010). Farmakokinetik incelemeler ile bulunan 500 mg, 1000 mg, 1500 mg ve 2000 mg günlük tek kullanım dozları için pik plazma seviyeleri sırasıyla 0,6 µg/ml, 1,1 µg/ml, 1,4 µg/ml ve 1,8 µg/ml'dir (Rxlist, 2010). Literatüre göre diyabet hastalarında ilaçla oluşan devamlı plazma konsantrasyonları 50 µM'ın altındayken ilacın kanserli hücreleri tedavide kullanılabilmesi için tedavi dozundan en az 200 kat fazla miktarların kullanılması gerektiği çünkü 10 mM'lık metformin varlığında dahi kanserli hücrelerin büyüebildiğinin gözlemlendiği belirtilmiştir (Martin-Castillo, Vasquez-Martin, Oliveras-Ferraros ve Menendez, 2010). Bizim çalışmamızda bulunan sonuçlara göre metformin tedavi dozlarında hücre canlılığında azalmaya neden olmamıştır, hatta 2 µg/ml dozunda anlamlı bir artış sağladığı (%9,63) bulunmuştur, bununla birlikte NOx seviyeleri istatistik olarak anlamlı şekilde artmıştır ($p < 0,05$).

AMPK/mTOR ilişkili metforminin istatistiksel anlamlı sitotoksik etkileri 5 mM ve 10 mM'lık konsantrasyon aralığında gözlenmiştir (Martin-Castillo, Vasquez-Martin, Oliveras-Ferraros ve Menendez, 2010). Aslında, bu alandaki birçok araştırmacı AMPK aktivasyonu ve buna karşılık mTOR aktivitesinin baskılanması ve son olarak mTOR efektörü ribozomal S6 kinaz 1 (S6K1)'in aktivitesinin azalması ile metforminin antitümoral etkilerini inceleyen bir model adapte etmişlerdir. Metforminin terapötik dozlarından oldukça yüksek dozlarda bu antitümoral etkilerin olduğu iddia edilmektedir (Martin-Castillo, Vasquez-Martin, Oliveras-Ferraros ve Menendez, 2010). Yine yapılan *in vitro* çalışmada, metforminin Akt upregülasyonu, oksidatif stresin azaltılması ve kaspaz aktivasyonu blokajı ile sisplatine maruz bırakılmış U251 hücrelerinin apoptotik ölümünü azalttığı gözlenmiştir, böylece sisplatin kullananlarda nörotoksisiteden kurtulmak için eş zamanlı verilebileceği önerilmiştir (Janjetovic ve diğerleri, 2011). Metforminin *in vitro* ve *in vivo* kanser hücreleri ve tümörlerde büyümeyi inhibe ettiği literatürde yer almasına rağmen çok az miktarda klinik veri mevcuttur. Bizim çalışmamızda özellikle ikinci hücre siklusunda 500 µg/ml ve 1000 µg/ml'lik metforminin tedavi dozlarının en az 200 katı olan konsantrasyonlarının HgCl₂ ile kombinasyonu sonucunda ciddi sitotoksik etki gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4.6.). Bu bilgiler ışığında, bizim çalışmamızda da HgCl₂ ile yüksek dozlardaki

metforminin iki mitoz bölünme siklusu sonrasında hücrelerin dramatik bir şekilde aşırı AMPK aktivasyonuna bağlı olarak öldüğü görülmüş olup metforminin antikanser etkilerini desteklediğini düşünmekteyiz.

Ayrıca, beyinde otofajinin preaktivasyonu, hücresel enerji üretimine olanak sağlar, endoplazmik retikulum stresini sınırlar ve iskemik maruziyet sırasında nöronal apoptozu engeller (Sheng, 2010). Metforminin beyinde AMPK bağımlı olarak otofajiyi indükleyerek fokal serebral iskemiyeye karşı nöroprotektif etki yaptığı sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (Jiang ve diğerleri, 2014). Bizim çalışmamızda da metforminin deney dozunda (2 µg/ml) tek başına birinci hücre siklusunda kontrole göre %9,63 ve ikinci hücre siklusunda %13,78'lik istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür ($p<0,05$). Metformin tek başına verildiğinde meydana gelen AMPK aktivasyonunun nöron hücre canlılığını desteklediği düşünülmektedir. Bununla birlikte her iki cıva grubunun eklenmesiyle de hücre canlılığındaki bu artışın ortadan kalktığı gözlemlendi. Bizim çalışmamızda, çalışılan dozlar olan 2 µg/ml ve 5 µg/ml metformin dozlarına karşılık özellikle organik cıva maruziyeti (2 µM ve 5 µM) ile MTT'deki anlamlı azalış, NOx ve Q düzeyindeki anlamlı artışların birbiriyle paralel olması NO miktarındaki artış ile AMPK aktivasyonu arasındaki ilişkiyi ortaya koymuştur ($p<0,05$). Bunun nedeninin ise AMPK'nin aşırı aktivasyonu ile NO düzeylerinin artması sonucu RNS'nin açığa çıkmasıyla hücre ölümünün gerçekleşmesi olduğu düşünülmektedir. İnorganik cıva maruziyeti ile metforminin uygulanmasında da aynı durum söz konusu olup özellikle ikinci hücre siklusunda istatistiksel olarak anlamlı olan nitrik oksit artışına paralel olarak oksidatif stres de artmıştır ($p<0,05$).

SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde yapılan bir çalışmada 10-100 µM kafein hipoksi ile indüklenmiş azalan hücre canlılığı doz bağımlı biçimde kafein ile korunmuştur (Tanaka ve diğerleri, 2013). Bizim çalışmamızda da kafeinin tek başına uygulanması ile Tanaka ve diğerleri (2013)'nin bulduğu sonuçlarla uyumlu bir sonuç bulunmuştur (Bkz. Şekil 4.4.). İnsanlarda oral yolla tüketilen 1 mg/kg (bir fincan kahveye denk) kafein 1-2 µg/ml ya da 5-10 µM plazma pik konsantrasyonuna denk gelmektedir (Sawynok, 1995). Yine benzer olarak, tek bir fincan kahve tüketimi 0,4-2,5 mg/kg doz sağlamakta olup bu da 0,25-2 mg/l ya da 1-10 µM'lık plazma pik konsantrasyonuna karşılık geldiği belirtilmiştir (Fredholm, Battig, Holmen, Nehlig ve Zvartau, 1999). Ayrıca 72 mg kafeini kapsül olarak alan bireylerde 30 dakika sonra 1,93 µM, 72 mg kafein içeren kola tüketen bireylerde ise

1,5-2 saat sonra 1,57 μM 'lık pik plazma konsantrasyonları tespit edilmiştir (Mumford ve diğerleri, 1996). Farelerde, insanda yaklaşık 5 fincan kahveye yani 500 mg günlük kafein alımına denk gelmekte olan 1,5 mg günlük kafein dozunun, AH modeli oluşturulmuş farelerde yapılan çalışmada kognitif bozukluklardan koruduğu, hippocampal A β seviyelerini düşürdüğü gözlenmiştir (Arendash ve diğerleri, 2006). ABD Gıda ve İlaç Ajansı (FDA)'nın bir çalışmasına göre günlük ortalama kafein tüketimi üç fincan kahve yaklaşık 300 mg'a karşılık gelmektedir (Somogyi, 2012). Bu çalışmalara göre 70 kg'lık bir insanın 1 fincan kahve içmesiyle bireysel farklılığa bağlı olarak plazma kafein konsantrasyonu 1-10 μM 'e ulaşabilmektedir. Kafeinin normalde insanlarda tüketimi ile oluşan konsantrasyonlarının adenozin reseptör blokajına yol açtığı bilinmektedir (Fredholm, Battig, Holmen, Nehlig ve Zvartau, 1999).

Kafeinin sisteinin hücre içine alımını destekleyerek GSH sentezini artırdığı gösterilmiştir (Aoyama ve diğerleri, 2011). Bizim çalışmamızda bulunan sonuçlara göre ise özellikle birinci hücre siklusunda 10 μM ve 20 μM kafeinin inorganik cıvanın sitotoksik etkilerini azalttığı hatta koruyucu etki gösterdiği düşünülmektedir. (Bkz. Çizelge 4.2.). 10 μM ve 20 μM kafein ilavesi ile organik cıva maruziyetinde hücre canlılığının artışı oksidatif stresin azalmasını sağlamış olup, NO $_x$ sentezi hala fazla olmasına rağmen apoptozun inhibisyonu ile hücrelerin canlılığının korunduğu düşünülmektedir (Bkz. Çizelge 4.1.). Bunlara karşılık, yapılan bir çalışma 100 μM 'a kadar olan kafein konsantrasyonlarında intrasellüler kalsiyum seviyelerinde herhangi bir artış görülmemiştir (Spyridopoulos ve diğerleri, 2008). Kafeinin düşük dozda antioksidan özelliklere sahip olduğu gösterilmiş, ancak 250 μM 'dan yüksek dozda Ca $^{+2}$ 'un hücre içine aşırı girişi sonucu kaspaz aktivasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Kang, Lee, Won, Rhee ve Gwag, 2002). Nöron hücreleri dışarıdan GSH alamadıkları için sisteinin hücre içine alımı GSH sentezi için önemlidir. Çalışmamızda, birinci hücre siklusunda kafein ilavesiyle hücre canlılıklarında kontrole göre anlamlı bir değişme gözlenmemiştir, ikinci hücre siklusunda ise hücre canlılıklarında %10'a yakın azalma olsa da bu da istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$). Bunun yanında kafeinin tek başına ilavesi nitrik oksit düzeylerinin artışını engellememiş ve oksidatif strese de özellikle 10 μM kafein ilavesi ile birinci ve ikinci siklusta anlamlı artışlar gözlenmiştir ($p<0,05$). Ancak hücre canlılığında kontrollere göre herhangi bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$).

Kafeinin neonatal nöronları yüksek oksijen maruziyetine karşı antioksidan kapasitesinin olması nedeniyle koruduğu öne sürülmektedir (Endesfelder, Zaak, Weichelt, Bühner, Schmitz, 2014). PH olan farelerle yapılan bir çalışmada dopaminerjik nigrostriatal nöronların patofizyolojik cevapları üzerinde kafeinin yepyeni koruyucu etkileri olduğunu gösteren veriler mevcuttur (Chen ve diğerleri, 2001). Adenozin reseptörlerinin dopaminerjik nöronlarca zengin beyin bölgesinde orta veya çok fazla eksprese olması nörotransmitter sistemler arasında etkileşimi sağlamaya yaramaktadır (Fredholm, Chen, Cunha, Svenningsson ve Vaugeois, 2005). 10 mg/kg dozlardaki kafeinin A_{2A} reseptör antagonisti gibi davrandığı bilinmektedir (Chen ve diğerleri, 2001). A_{2A} reseptör blokajı ise hippocampusta nöron koruyucu etki göstermektedir (Aoyama ve diğerleri, 2011).

Yine fareler üzerinde yapılan bir deneyde, AH'na karşılık kafeinin terapötik seviyelerini işaret edecek biçimde birçok AH transjenik tipleri ve yaşlarında akut ve kronik kafein verilmesi ile plazma ve beyin A β seviyeleri azalmaktadır (Cao ve diğerleri, 2009). Metabolomik çalışmalarda, nörotoksisite ve nöron koruyucu etki arasındaki bağlantının bulunması için (0,1 μ M ila 1 μ M) MeHgCl ve (1 μ M ila 100 μ M) kafeine karşılık çalışılmış olup farklı metabolitlerin (GABA, kolin, glutamin, kreatin ve spermin) MeHgCl uygulaması sonrasında doz bağımlı değişimler yaptığını göstermiştir (van Vliet ve diğerleri, 2008).

Birçok nörodejeneratif hastalıkta oksidatif stres ve siklooksijenaz-2 (COX-2) gibi inflamatuvar enzimlerin aktivasyonu gözlenmektedir. COX-2, inflamasyon bölgesinde, araşidonik asitleri prostaglandinlere çeviren pro-inflamatuvar bir enzimdir. (Lee ve diğerleri, 2006). COX-2'nin uyarılmasının hücre canlılığı (Lee ve diğerleri, 2006) veya hücre ölümü (Jang ve Surh, 2005) ile ilişkili olduğunu ya da nöron hasarıyla ilişkisiz olduğunu (Miettinen, 1997) bildiren çalışmalar vardır. Chu ve diğerleri (2012) kafein ile COX-2'nin uyarılmasının inhibe edildiğini göstermiştir (Chu ve diğerleri, 2012). COX-2, NMDA reseptörlerinin uyarılması ile aktive olur (Marcheselli ve Bazan, 1996; Yamagata, Andreasson, Kaufmann, Barnes ve Worley, 1993). SH-SY5Y hücrelerine artan dozlarda MeHg ilavesiyle artmış oksidatif stresin nedenlerinden biri de NMDA reseptör uyarısı ve buna bağlı COX-2 aktivasyonu olabilir. Normalde dopaminerjik nöronlarda az miktarda eksprese edilen COX-2'nin sentezi çeşitli uyaranlarla aşırı miktarda artar (Everse ve Coates, 2005; Hurley, Olschowka ve O'Banion, 2002; Minghetti, 2004; Smith, DeWitt ve Garavito, 2000; Teismann ve diğerleri, 2003). Bu nedenle nörodejeneratif hastalıklarda

COX-2'nin önemli bir oksidatif stres kaynağı olduğu düşünülmektedir (Everse ve Coates, 2005; Tesimann ve diğerleri, 2003). Balıklarda biriken MeHg'nın adenosin reseptör sistemini etkileyerek nörotoksositeye yol açtığı gösterilmiştir. A_{2A} reseptör delesyonu veya bir A_{2A} reseptör antagonisti olan kafein, MeHg hasarını azaltmaktadır (Björklund ve diğerleri, 2007). A_{2A} reseptör sinyal iletimi doğrudan veya dolaylı olarak Protein kinazA (PKA)'ya gereksinim duyar. A_{2A} reseptör sinyali A_{2A}/cAMP/PKA/NMDAR (NR1) yolağı ile iletilir. Kafein postsinaptik tüm PKA hedeflerinin bazal fosforilasyonunu azaltır ve A_{2A} reseptör antagonisti olarak NMDA reseptör aracılı glutamaterjik sinyal iletimini değiştirir (Sahin ve diğerleri, 2007). Diğer taraftan kafein protein kinaz C aracılı olarak serebrokortikal sinirlere iyonize kalsiyum girişini ve glutamat serbestleşmesini sağlayarak nöronal uyarıyı artırmaktadır. Bu etki kafeinin A_{1A} reseptörleri ile etkileşimi sonucudur (Wang, 2007). Bizim çalışmamızda birinci hücre siklusunda MeHgCl'e 10 µM ve 20 µM kafein ilavesiyle kontrole göre oksidatif stresin arttığı, HgCl₂'e aynı dozlarda kafein ilavesiyle oksidatif stresin azaldığı gözlenmiştir. İkinci hücre siklusunda MeHgCl'e kafein ilavesi kontrole göre oksidatif stresi yer yer anlamlı şekilde daha da artırmasına rağmen, HgCl₂'e aynı dozlarda kafein ilave edildiğinde ise genelde anlamlı bir artış gözlenmemişir (p>0,05). Yani kafeinin özellikle inorganik cıva toksisitesine karşı glutamaterjik sinyal iletimini sağlayarak oksidatif stresi koruyucu özellikler gösterdiğini düşünmekteyiz.

Metforminin AMPK aktivasyonuna neden olma mekanizması 2 şekilde açıklanmaktadır. Birincisi, oksidatif fosforilasyonu engelleyerek ATP sentezinin azalması ile ATP/AMP oranını düşürmesi, ikincisi ise mTOR inhibisyonu yaparak protein sentezini engellemesi şeklindedir (Duque, López, Cruz, ve Samudio, 2010). AMPK enerji gereksinimine cevap veren gelişimsel olarak korunmuş bir düzenleyici serin/treonin kinazdır. Kinaz aktivitesi için katalitik alt ünitesindeki Thr172'nin fosforile olması gerekmektedir. Ayrıca AMP/ATP'de artışı da allosterik olarak aktive olmasını sağlar. PKC ile LKB1'in Ser428'den fosforile olması da metformin aracılı AMPK aktivasyonunda önemli rol oynamaktadır (Xie, Dong, Scholz, Neumann ve Zou, 2008). AMPK intrasellüler Ca⁺² düzeyinde artma ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğu sonucu AMP/ATP oranında yükselme ile aktive olmaktadır (Cai, Yan, Li, Quazi ve Zhao, 2012). Ek olarak, insan nöroblastoma hücresi SH-SY5Y hücreleri, dopaminerjik nöronlardan eksprese olduğu bilinen 10 GABA reseptör alt ünitesinden 2 tanesini eksprese edebilmektedir (Korecka ve diğerleri, 2013). Sinaptik aktivite kritik olarak kısmen AMPK metabolik sensörü tarafından belirlenen selüler enerji seviyelerine bağlı olup nöroprotektif etki göstermekte

ve bu cevapta özellikle GABAB reseptörünün kilit düzenleyici olduğu düşünülmektedir (Kuramoto ve diğerleri, 2007). Kafeinin ise nöronlar üzerinde yapılan AMPK ile ilişkisini açıklayan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bununla birlikte, kas hücrelerinde kafeinin AMPK'yi kalsiyum bağımlı olarak aktive ederek otofajiyi artırdığı gözlenmiştir (Mathew, Ferris, Downs, Kinsey ve Baumgarner, 2014).

Öte yandan, bizim çalışmamızda ise MeHgCl₂'ün tek başına uygulandığı hücrelerde özellikle 5 µM'dan daha yüksek dozlarda 6. saatte bile hücrelerin canlılığı %56'dan daha az görülmekte olup 72. saatte bu oran %23'e düşmektedir. MeHgCl₂'e maruz bırakılan hücrelerde ikinci siklusun ardından tek başına MeHgCl₂'de hücre canlılığı %47 iken 2 µM ve 5 µM metformin tatbik edilen hücrelerde hücre canlılığı sırasıyla %73 ve %72'ye yükselmiştir.

Elde ettiğimiz bulgulara göre inorganik HgCl₂ ile metformini kombine ettiğimizde özellikle birinci siklusta metformin düşük dozlarda koruyucu etkiler göstermektedir. Bu durumda, AMPK aktivasyonu redoks düzenlemesi yaparak hücre yaşam süresini uzatır. Bu koşullarda NADPH üretimi bozulmasına rağmen AMPK alternatif yolları devreye sokarak NADPH düzeyini kontrol eder ve hücre ölümünü engeller (Jeon, Chandel ve Hay, 2012). SH-SY5Y hücrelerinde inorganik ve organik cıva maruziyetinin oksidatif stres, lipid peroksidasyonu ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna yol açtığı, organik cıvanın inorganik cıvaya göre daha toksik olduğu görülmüştür. Metallerin enerji metabolizmasını etkilediği bilinmektedir. Farelere tekrarlayan dozlarda HgCl₂ verilmesinin adipoz dokuda AMPK aktivasyonuna neden olduğu öne sürülmüştür (Kawakami ve diğerleri, 2012). Farklı dozlarda HgCl₂'e maruz kalan dopaminerjik insan nöronları olan SH-SY5Y hücrelerinde hem ilk hem de ikinci 24 saatte NO_x düzeylerinde artış gözlenmiştir. Bu artış, Kawakami ve diğerlerinin (2012) sıçan adipoz dokularında bulduklarını belirttikleri AMPK aktivasyonunu desteklemektedir (Kawakami ve diğerleri, 2012). Ortama bir AMPK aktivatörü olan metformin ilave edildiğinde NO_x düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı artma meydana geldi (p<0,05).

NO_x düzeylerinin artmasına bağlı olarak oksidatif stres de anlamlı olarak artmıştır (p<0,05). Diğer taraftan MeHgCl₂'e ve metformine birlikte maruz kalan hücrelerde hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı düşme meydana gelmiştir. Bu durum aşırı NO_x üretimi ile birlikte sistein içeren proteinlerde meydana gelen modifikasyonlar (Hess, Lin,

Freeman, ve Norden, 1994) ve oksidan-antioksidan dengenin bozulmasından kaynaklanabilir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde dünyada tedavisi ve korunma yolları tam olarak bilinmemekle birlikte nörodejeneratif hastalıklar ve demans gibi nöronal bozukluklar oldukça yaygın olarak görülmekte ve giderek artmaktadır. Nörodejeneratif hastalıkların gelişmesinde etkili olabileceğini düşündüğümüz bir ağır metal olan cıvanın iki farklı formu olan MeHgCl ve HgCl₂'ün nörotoksikite mekanizması insan nöroblastoma hücreleri SH-SY5Y üzerinde incelenmiştir.

Bulunan sonuçlara göre, daha önce yapılan çalışmalarla uyumlu olarak, bizim çalışmamızda da bir ağır metal olan MeHgCl (Toimela ve diğerleri, 2004) ve HgCl₂'ün (Xu ve diğerleri, 2012) nörotoksik etki gösterdiği; insan nöroblastoma hücreleri SH-SY5Y üzerinde çalışılan dozlarda organik form olan MeHgCl'ün hücrelere daha toksik olduğu tespit edilmiştir.

Metforminin insanlardaki tedavi dozlarından 2000 mg'lık doza karşılık gelen 2 µg/ml metforminin ise tek başına uygulamasının AMPK'nin aktivasyonu ile nöronal hücre canlılığını koruyucu etkileri olduğu ortaya çıkmıştır.

Bununla birlikte, organik MeHgCl varlığında metforminin her iki dozunda (2 µg/ml ve 5 µg/ml) da birinci hücre siklusundan itibaren nitrik oksit bağımlı olarak oksidatif stresi artırdığı görülmüştür. Bu sonuca göre, metforminin nöronları patolojik olarak uyaran bir nörotoksin varlığında AMPK'nın aşırı aktive olduğu ve bunun sonucunda nitrik oksit radikallerinin açığa çıkmasıyla nöron hasarı ve ölümüne yol açtığı bulunmuştur. Metforminin inorganik HgCl₂ varlığında ise organik MeHgCl'e göre daha az oksidatif stres meydana getirdiği tespit edilmiştir. Her iki cıva bileşiği de tedavi dozlarında metforminin nöron koruyucu etkisini ikinci hücre siklusunda ortadan kaldırmaktadır. Bu etkinin büyük olasılıkla AMPK aracılı geç oksidatif strese bağlı hücre ölümü ile sonuçlandığı düşünülmektedir.

Kafeinin ise günlük kullanım dozlarında verildiğinde 10 µM ve 20 µM dozlarda nöroblastoma hücrelerinde hücre canlılığında anlamlı bir değişme yapmadığı görülmüştür. Organik MeHgCl varlığında bir A_{2A} reseptör antagonisti olan kafein uygulamasının ise

MeHgCl'ün toksik etkilerini azalttığı bulunmuştur. Burada özellikle birinci hücre siklusunda nitrik oksit düzeyi ve oksidatif stres artmış olmasına rağmen kafeinin sisteini hücre içerisine alarak hücrelerin redoks homeostazını sağladığı ve böylece hücre canlılıklarındaki azalma yüzdesini tek başına MeHgCl'e maruziyete göre azalttığı görülmüştür.

En çarpıcı sonuç ise, inorganik HgCl₂'ye maruz bırakılan hücrelere kafein ilavesiyle elde edilmiş olup kafeinin 10 µM ve 20 µM dozlarında hücre canlılığında artış olduğu, nitrik oksit düzeyleri ve dolayısıyla oksidatif stresin kontrol düzeylerine indiği gözlenmiştir. Buna bağlı olarak, kafeinin inorganik HgCl₂ maruziyetine karşı nöronları koruyucu etkisi olduğu ve bu etkinin hücre içine sistein alınımı ile hücrelerin antioksidan kapasitesinin artırıldığı düşünülmektedir. Ek olarak, NMDA reseptörlerinin aktivasyonunun kafein varlığında azalmasının da oksidatif stres kaynağı olan COX-2'yi inhibe etmiş olabileceği düşünülmektedir.

Öncelikli olarak cıva maruziyeti ve onun toksik etkilerinden korunmak için, cıvanın en önemli kaynağı olan beslenmedeki balık tüketimini, doğru çeşit balık seçimi ile düzenlenmesi maruziyeti azaltabilir. Çünkü, balığın hamilelik sırasında fetüsün ve küçük çocukların beyin gelişimine katkısı olan besin öğelerini de barındırdığından tamamen beslenmeden çıkarılması doğru bir yaklaşım değildir (Groth, 2012).

Sonuç olarak günlük yaşamda, ağır metallerden en önemlisi olan cıvaya kaçınılmaz biçimde maruz kalmakta olduğumuz gerçeğiyle birlikte, bu maruziyetten korunmanın mümkün olabileceği düşünülmektedir. Antioksidan kapasiteyi arttırıcı ve oksidatif stresini azaltıcı kafeinin çalışmamızda kullandığımız dozlarda organik ve inorganik cıvaya maruziyette nöron hücrelerini koruyucu olduğunu düşünmekteyiz. Bu çalışmanın, konuyla ilgili ileri çalışmalara temel olabileceği düşünülmektedir. Diğer taraftan günümüzde en sık kullanılan antidiyabetik ilaç olan metforminin cıva gibi ağır metallere maruziyet de göz önünde bulundurularak nörotoksisite çalışmalarının yapılması büyük önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Allen, J. W., Mutkus, L. A and Aschner, M. (2001). Mercuric chloride, but not methylmercury, inhibits glutamine synthetase activity in primary cultures of cortical astrocytes. *Brain Research*, 891, 148–157.
- Anderson, M. E. (1998). Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chemico-Biological Interactions*, 111-112, 1-14.
- Aoyama, K., Watabe, M. and Nakaki, T. (2008). Regulation of neuronal glutathione synthesis. *Journal of Pharmacological Sciences*, 108(3), 227-238.
- Aoyama, K., Matsumura, N., Watabe, M., Wang, F., Kikuchi-Utsumi, K. and Nakaki, T. (2011). Caffeine and uric acid mediate glutathione synthesis for neuroprotection. *Neuroscience*, 181, 206-215.
- Arendash, G. W., Schleif, W., Rezai-Zadeh, K., Jackson, E. K., Zacharia, L. C., Cracchiolo, J. R., Shippy, D. and Tan, J. (2006). Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain beta-amyloid production. *Neuroscience*, 142(4), 941-52.
- Aschner, M., Yao, C. P., Allen, J. W. and Tan, K. H. (2000). Methylmercury alters glutamate transport in astrocytes. *Neurochemistry International*, 37, 199–206.
- Aschner, M., Syversen, T., Souza, D.O., Rocha, J.B.T. and Farina, M. (2007). Involvement of glutamate and reactive oxygen species in methylmercury neurotoxicity. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 40, 285-291.
- Atchison, W. D. and Hare, M. F. (1994). Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity. *The FASEB Journal*, 8(9), 622-629.
- İnternet: Aurobindo Pharma Limited. (2010). Summary of Product Characteristics of Metformin 500 mg Tablets. South Ruislip: Aurobindo Pharma Limited. İnternetten -URL:
http://www.medicines.org.uk/emc/medicine/23244/SPC/Metformin+500mg+tablets/#PHARMACODYNAMIC_PROPS, Son Erişim Tarihi: 18.06.2015.
- Baeyens, W., Leermakers, M., Papina, T., Saprykin, A., Brion, N., Noyen, J., De Gieter, M., Elskens and M., Goeyens, L. (2003). Bioconcentration and biomagnification of mercury and methylmercury in North Sea and Scheldt estuary fish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 45, 498– 508.
- Bakir, F., Rustam, H., Tikriti, S., Al-Damluji, S. F. and Shihristani, H. (1980). Clinical and epidemiological aspects of methylmercury poisoning. *Postgraduate Medical Journal*, 56(651), 1–10.
- Basu, N., Scheuhammer, A. M., Rouvinen-Watt, K., Grochowina, N., Evans, R. D., O'Brien, M., Chan, H. M. (2007). Decreased N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptor levels are associated with mercury exposure in wild and captive mink. *Neurotoxicology*, 28(3), 587-93.

- Becker, A. and Soliman, K. F. A. (2009). The role of intracellular glutathione in inorganic mercury-induced toxicity in neuroblastoma cells. *Neurochemical Research*, 34(9), 1677–1684.
- Betteridge, D. J. (2000) What is oxidative stress? *Metabolism*, 49(2), 3-8.
- Björklund, O., Kahlström, J., Salmi, P., Ogren, S. O., Vahter, M., Chen, J. F., Fredholm, B. B., Daré, E. (2007). The effects of methylmercury on motor activity are sex- and age-dependent, and modulated by genetic deletion of adenosine receptors and caffeine administration. *Toxicology*, 241(3), 119-33.
- Björkman, L., Lundekvam, B. F., Laegreid, T., Bertelsen, B., Morild, I., Lilleng, P., Lind, B., Palm, B. and Vahter, M. (2007). Mercury in human brain, blood, muscle and toenails in relation to exposure: an autopsy study. *Environmental Health*, 6(30), 1-14.
- Bolanos, J. P., Heales, S. J., Peuchen, S., Barker, J. E., Land, J. M. and Clark, J. B. (1996). Nitric oxide-mediated mitochondrial damage: a potential neuroprotective role for glutathione. *Free Radical Biology & Medicine*, 21, 995–1001.
- Bridges, H. R., Jones, A. J. Y., Pollak, M. N. and Hirst, J. (2014). Effects of metformin and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria. *Biochemical Journal*, 462, 475–487.
- Brito, M. A., Vaz, A. R., Silva, S. L., Falcão, A. S., Fernandes, A., Silva, R. F. and Brites, D. (2010). N-methyl-aspartate receptor and neuronal nitric oxide synthase activation mediate bilirubin-induced neurotoxicity. *Molecular Medicine*, 16(9-10), 72-80.
- Brookes, N. (1992). In vitro evidence for the role of glutamate in the CNS toxicity of mercury. *Toxicology*, 76, 245-256.
- Burbacher, T. M., Rodier, P. M. and Weiss, B. (1990). Methylmercury developmental neurotoxicity: a comparison of effects in humans and animals. *Neurotoxicology and Teratology*, 12, 191–202.
- Burbacher, T. M., Grant, K. S., Mayfield, D. B., Gilbert, S. G. and Rice, D. C. (2005). Prenatal methylmercury exposure affects spatial vision in adult monkeys. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 208, 21–28.
- Cai, Z., Yan, L.J., Li, K., Quazi, S.H. and Zhao, B. (2012). Roles of AMP-activated protein kinase in Alzheimer's disease. *Neuromolecular Medicine*, 14(1), 1-14.
- Cao, C., Cirrito, J. R., Lin, X., Wang, L., Verges, D. K., Dickson, A., Mamcarz, M., Zhang, C., Mori, T., Arendash, G. W., Holtzman, D. M. and Potter, H. (2009). Caffeine suppresses amyloid-beta levels in plasma and brain of Alzheimer's disease transgenic mice. *Journal of Alzheimer's Disease*, 17(3), 681-67.
- Cauli, O. and Morelli, M. (2005). Caffeine and the dopaminergic system. *Behavioural Pharmacology*, 16, 63-77.

- Ceccatelli, S., Daré, E. and Moors, M. (2010). Methylmercury-induced neurotoxicity and apoptosis. *Chemico-Biological Interactions*, 188(2), 301-308.
- Cedrola, S., Guzzi, G., Ferrari, D., Gritti, A., Vescovi, A. L., Pendergrass, J. C. and La Porta, C. A. M. (2003). Inorganic mercury changes the fate of murine CNS stem cells. *The FASEB Journal*, 17, 869–71.
- Chen, J. F., Xu, K., Petzer, J. P., Staal, R., Xu, Y. H., Beilstein, M., Sonsalla, P. K., Castagnoli, K., Castagnoli, N., Schwarzschild, M. A. (2001). Neuroprotection by caffeine and A(2A) adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson's disease. *The Journal of Neuroscience*, 21(10), 1-6.
- Choi, B.H., Yee, S. and Robles, M. (1996) The effects of glutathione glycoside in methylmercury poisoning. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 141, 357– 364.
- Choi, H. K. and Curhan, G. (2007). Coffee, tea, and caffeine consumption and serum uric acid level: the third national health and nutrition examination survey. *Arthritis & Rheumatology*, 57(5), 816-21.
- Chu, Y. F., Chang, W. H., Black, R. M., Liu, J. R., Sompol, P., Chen, Y., Wei, H., Zhao, Q., Cheng, I. H. (2012). Crude caffeine reduces memory impairment and amyloid β (1-42) levels in an Alzheimer's mouse model. *Food Chemistry*, 135(3), 2095-102.
- Chu, Y. F., Brown, P. H., Lyle, B. J., Chen, Y., Black, R. M., Williams, C. E., Lin, Y. C., Hsu, C. W., Cheng, I. H. (2009). Roasted coffees high in lipophilic antioxidants and chlorogenic acid lactones are more neuroprotective than green coffees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(20), 9801-8.
- Clarkson, T. W., Magos, L. and Myers, G.J., (2003). The toxicology of mercury — current exposures and clinical manifestations. *The New England Journal of Medicine*, 349, 1731-1737.
- Clarkson, T. W. and Magos, L. (2006). The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Critical Reviews in Toxicology*, 36, 609–662.
- Cognato, G. .P, Agostinho, P. M., Hockemeyer, J., Müller, C. E., Souza, D. O. and Cunha, A. R. (2010) Caffeine and an adenosine A2A receptor antagonist prevent memory impairment and synaptotoxicity in adult rats triggered by a convulsive episode in early life. *Journal of Neurochemistry*, 112(2), 453–462.
- Crespo-López, M. E., Macêdo, G. L., Pereira, S. I., Arrifano, G. P., Picanço-Diniz, D. L., do Nascimento, J. L., Herculano, A. M. (2009). Mercury and human genotoxicity: critical considerations and possible molecular mechanisms. *Pharmacological Research*, 60(4), 212-20.
- Culmsee, C., Monnig, J., Kemp, B. E. and Mattson, M. P. (2001). AMP-activated protein kinase is highly expressed in neurons in the developing rat brain and promotes neuronal survival following glucose deprivation. *Journal of Molecular Neuroscience*, 17, 45-58.

- Das, S., Nageshwar, R. B., Satish, R. B. S. (2011). Mangiferin attenuates methylmercury induced cytotoxicity against IMR-32, human neuroblastoma cells by the inhibition of oxidative stress and free radical scavenging potential. *Chemico-Biological Interactions*, 193(2), 129-40.
- Dawson, V. L. and Dawson, T. M. (1996). Nitric oxide neurotoxicity. *The Journal of Chemical Neuroanatomy*, 10, 179-190.
- Davis, L.E., Kornfeld, M., Mooney, H.S., Fiedler, K.J., Haaland, K.Y., Orrison, W.W., Cernichiari, E. and Clarkson, T.W. (1994). Methylmercury poisoning: Long-term clinical, radiological, toxicological, and pathological studies of an affected family. *Annals of Neurology*, 35, 680-688.
- Demir, U., Koehler, A., Schneider, R., Schweiger, S. and Klocker, H. (2014). Metformin anti-tumor effect via disruption of the MID1 translational regulator complex and AR downregulation in prostate cancer cells. *BMC Cancer*, 14(52), 1-9.
- Dickinson, D. A. and Forman, H. J. (2002). Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical Pharmacology*, 64(5-6), 1019-26.
- Dulovic, M., Jovanovic, M., Xilouri, M., Stefanis, L., Harhaji-Trajkovic, L., Kravic-Stevovic, T., Paunovic, V., Ardah, M. T., El-Agnaf, O. M. A., Kostic, V., Markovic, I. and Trajkovic, V. (2014). The protective role of AMP-activated protein kinase in alpha-synuclein neurotoxicity in vitro. *Neurobiology of Disease*, 63, 1-11.
- İnternet: Duque, J. E., López, C., Cruz, N. and Samudio, I. (August, 2010). Antitumor mechanisms of metformin: Signaling, metabolism, immunity and beyond: *Universitas Scientiarum*, Vol. 15 (2). URL: <http://revistas.javeriana.edu.co/index.php/scientarium/article/view/1368/html>, Son Erişim Tarihi: 17.06.2015.
- El-Mir, M. Y., Daille, D., R-Villanueva, G., Delgado-Esteban, M., Guigas, B., Attia, S., Fontaine, E., Almeida, A. and Leverve, X. (2008). Neuroprotective role of antidiabetic drug metformin against apoptotic cell death in primary cortical neurons. *The Journal of Molecular Neuroscience*, 34, 77-87.
- Emerit, J., Edeas, M. and Bricaire, F. (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 58, 39-46.
- Endesfelder, S., Zaak, I., Weichelt, U., Bührer, C., Schmitz, T. (2014). Caffeine protects neuronal cells against injury caused by hyperoxia in the immature brain. *Free Radical Biology and Medicine*, 67, 221-34.
- Engin, A. B. (2015). *C1q ve kompleman düzenleyici protein CD59'un hiperglisemi koşullarında SH-SY5Y hücre canlılığı üzerine etkisinin araştırılması*, Yayınlanmamış Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Eskelinen, M. H., Ngandu, T., Tuomilehto, J., Soininen, H., Kivipelto, M. (2009). Midlife coffee and tea drinking and the risk of late-life dementia: a population-based CAIDE study. *Journal of Alzheimer's Disease*, 19, 85-91.

- Eto, K. (2000). Minamata disease. *Neuropathology*, 20, 14–19.
- Everse, J. and Coates, P.W. (2005). Role of peroxidases in Parkinson disease: a hypothesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 38, 1296–1310.
- Farina, M., Campos, F., Vendrell, I., Berenguer, J., Barzi, M., Pons, S. and Sunol, C. (2009). Probucol increases glutathione peroxidase-1 activity and displays long-lasting protection against methylmercury toxicity in cerebellar granule cells. *Toxicological Sciences*, 112, 416–426.
- Farina, M., Avila, D. S., da Rocha, J. B. and Aschner, M. (2013). Metals, oxidative stress and neurodegeneration: a focus on iron, manganese and mercury. *Neurochemistry International*, 62(5), 575–94.
- Fitzgerald, W. F., and Clarkson, T. W. (1991). Mercury and monomethylmercury: Present and future concerns. *Environmental Health Perspectives*, 96, 159–166.
- Forman, H.J., Zhang, H., Rinna, A. (2009). Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30, 1–12.
- Foster, T.C. (2007). Calcium homeostasis and modulation of synaptic plasticity in the aged brain. *Aging Cell*, (6), 319–325.
- Förstermann, U. and Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*, 33(7), 829–37.
- Franco, J. L., Braga, H. C., Stringari, J., Missau, F. C., Posser, T., Mendes, B. G., Leal, R. B., Santos, A. R., Dafre, A. L., Pizzolatti, M. G., Farina, M. (2007). Mercurial-induced hydrogen peroxide generation in mouse brain mitochondria: protective effects of quercetin. *Chemical Research in Toxicology*, 20, 1919–1926.
- Franco, R. and Cidlowski, J. A. (2009). Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death and Differentiation*, 16, 1303–1314.
- Fredholm, B. B., Battig, K., Holmen, J., Nehlig, A. and Zvartau, E. E. (1999). Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacological Reviews*, 51(1), 84–125.
- Fredholm, B. B., Chen, J. F., Cunha, R. A., Svenningsson, P., Vaugeois, J. M. (2005). Adenosine and brain function. *International Review of Neurobiology*, 63, 191–270.
- Friberg, L. ve Mottet, N. K. (1989). Accumulation of methylmercury and inorganic mercury in the brain. *Biological Trace Element Research*, 21, 201–206.
- Fridovich, I. (1997). Superoxide Anion Radical (O_2^-), Superoxide Dismutases, and Related Matters. *The Journal of Biological Chemistry*, 272 (30), 18515–18517.
- Galindo, M. F., Ikuta, I., Zhu, X., Casadesus, G. and Jordan, J. (2010). Mitochondrial biology in Alzheimer's disease pathogenesis. *Journal of Neurochemistry*, 114, 933–945.

- Garg, T. K. ve Chang, J. Y. (2006). Methylmercury causes oxidative stress and cytotoxicity in microglia: attenuation by 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2. *Journal of Neuroimmunology*, 171, 17–28.
- Gassó, S., Cristòfol, R. M., Selema, G., Rosa, R., Rodríguez-Farré, E., Sanfeliu, C. (2001). Antioxidant compounds and Ca^{+2} pathway blockers differentially protect against methylmercury and mercuric chloride neurotoxicity. *Journal of Neuroscience Research*, 66(1), 135-45.
- Ghosh, D., Levault, K. R. and Brewer, G. J. (2014). Relative importance of redox buffers GSH and NAD(P)H in age-related neurodegeneration and Alzheimer disease-like mouse neurons. *Aging Cell*, 13(4), 631–640.
- Gilgun-Sherki, Y., Melamed, E. and Offen. D. (2001). Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology*, 40 (8), 959–975.
- Graff, R. D., Falconer, M. M., Brown, D. L. and Reuhl, K.R. (1997). Altered sensitivity of posttranslationally modified microtubules to methylmercury in differentiating embryonal carcinoma-derived neurons, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 144, 215–224.
- Grandjean, P., Weihe, P., White, R. F., Debes, F., Araki, S., Murata, K., Sørensen, N., Dahl, R., Jørgensen, P. J. (1997). Cognitive deficit in 7-year old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicology and Teratology*, 19, 417-428.
- Groth, E. (2012). An overview of epidemiological evidence on the effects of methylmercury on brain development, and a rationale for a lower definition of tolerable exposure. *Groth Consulting Services*, Pelham, New York, 1-12.
- Guilford, F. T. and Hope, J. (2014). Deficient glutathione in the pathophysiology of mycotoxin-related illness. *Toxins (Basel)*, 6(2), 608-23.
- Gulland, A. (2012). Number of people with dementia will reach 65.7 million by 2030, says report. *British Medical Journal*, 344, e2604.
- Guzzi, G. and La Porta, C. A. M. (2008). Molecular mechanisms triggered by mercury. *Toxicology*, 244, 1–12.
- Haass, C. and Selkoe, D. J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(2), 101-112.
- Halliwell, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *The American Journal of Medicine*, 91(3), 14-22.
- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H. and Mizushima, N. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*, 441(7095), 885-889.

- Hardie, D. G. (2004). The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *Journal of Cell Science*, 117, 5479-87.
- Hardie, D. G. and Frenguelli, B. G. (2007). A Neural Protection Racket: AMPK and the GABAB Receptor. *Neuron*, 53(2), 159-162.
- Hardie, D. G. (2008). AMPK: a key regulator of energy balance in the single cell and the whole organism. *International Journal of Obesity*, 32, 7-12.
- Hardie, D. G., Ross, F. A. and Hawley, S. A. (2012). AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13, 251-262.
- Hess, D. T., Lin, L. H., Freeman, J. A. and Norden, J. J. (1994). Modification of cysteine residues within G(o) and other neuronal proteins by exposure to nitric oxide. *Neuropharmacology*, 33(11), 1283-92.
- Hock, C., Drasch, G., Golombowski, S., Müller-Spahn, F., Willershausen-Zönnchen, B., Schwarz, P., Hock, U., Growdon, J.H. and Nitsch, R.M. (1998). Increased blood mercury levels in patients with Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, 105, 59-68.
- Hroudova, J., Singh, N. and Fisar, Z. (2014). Mitochondrial dysfunctions in neurodegenerative diseases: relevance to Alzheimer's Disease. *BioMed Research International*, 2014, 1-9.
- Huang, C. F., Liu, S. H., Hsu, C. J., Lin-Shiau, S. Y. (2011). Neurotoxicological effects of low-dose methylmercury and mercuric chloride in developing offspring mice. *Toxicology Letters*, 201(3), 196-204.
- Hundal, R. S., Krssak, M., Dufour, S., Laurent, D., Lebon, V., Chandramouli, V., Inzucchi, S. E., Schumann, W. S., Petersen, K. F., Landau, B. R. and Shulman, G. I. (2000). Mechanism by Which Metformin Reduces Glucose Production in Type 2 Diabetes. *Diabetes*, 49, 2063-2069.
- Hurley, S. D., Olschowka, J. A. and O'Banion, M. K. (2002). Cyclooxygenase inhibition as a strategy to ameliorate brain injury. *Journal of Neurotrauma*, 19, 1-15.
- Hussain, S., Rodgers, D. A., Duhart, H. M. and Ali, S.F. (1997). Mercuric chloride-induced reactive oxygen species and its effect on antioxidant enzymes in different regions of rat brain. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 32, 395-409.
- Internet: IMS Health. (2012). National Prescription Audit, Top 25 Medicines by Dispensed Prescriptions (U.S.). URL: [http://www.imshealth.com/deployedfiles/imshealth/Global/Content/Corporate/Press%20Room/2012 U.S/Top 25 Medicines Dispensed Prescriptions U.S..pdf](http://www.imshealth.com/deployedfiles/imshealth/Global/Content/Corporate/Press%20Room/2012%20U.S/Top%2025%20Medicines%20Dispensed%20Prescriptions%20U.S..pdf), Son Erişim Tarihi: 18.06.2015.

- Jain, A., Mårtensson, J., Stole, E., Auld, P. A. and Meister, A. (1991). Glutathione deficiency leads to mitochondrial damage in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(5), 1913-7.
- Jang, J.H. and Surh, Y.J. (2005). Beta-amyloid-induced apoptosis is associated with cyclooxygenase-2 up-regulation via the mitogen-activated protein kinase-NF-kappaB signaling pathway. *Free Radical Biology and Medicine*, 38, 1604–1613
- Janjetovic, K., Vucicevic, L., Misirkic, M., Vilimanovich, U., Tovilovic, G., Zogovic, N., Nikolic, Z., Jovanovic, S., Bumbasirevic, V., Trajkovic, V. and Harhaji-Trajkovic, L. (2011). Metformin reduces cisplatin-mediated apoptotic death of cancer cells through AMPK-independent activation of Akt. *European Journal of Pharmacology*, 651(1-3), 41-50.
- Jedrychowski, W., Jankowski, J., Flak, E., Skarupa, A., Mroz, E., Sochacka-Tatara, E., Lisowska-Miszczuk, I., Szpanowska-Wohn, A., Rauh, V., Skolicki, Z., Kaim, I., Perera, F. (2006). Effects of prenatal exposure to mercury on cognitive and psychomotor function in one-year-old infants: epidemiologic cohort study in Poland. *Annals of Epidemiology*, 16(6), 439-47.
- Jeon, S. M., Chandel, N. S. and Hay, N. (2012). AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress. *Nature*, 485(7400), 661-5.
- Jiang, T., Yu, J. T., Zhu, X. C., Wang, H. F., Tan, M. S., Cao, L., Zhang, Q. Q., Gao, L., Shi, J. Q., Zhang, Y. D., Tan, L. (2014). Acute metformin preconditioning confers neuroprotection against focal cerebral ischaemia by pre-activation of AMPK-dependent autophagy. *British Journal of Pharmacology*. 171(13), 3146-57.
- Kang, S. H., Lee, Y. A., Won, S. J., Rhee, K. H. and Gwag, B. J. (2002). Caffeine-induced neuronal death in neonatal rat brain and cortical cell cultures. *Neuroreport*, 13(15), 1945-50.
- Kaster, M. P., Machado, N. J., Silva, H. B., Nunes, A., Ardaiz, A. P., Santana, M., Baqi, Y., Müller, C. E., Rodrigues, A. L., Porciúncula, L. O., Chen, J. F., Tomé, Â. R., Agostinho, P., Canas, P. M., Cunha, R. A. (in press). Caffeine acts through neuronal adenosine A2A receptors to prevent mood and memory dysfunction triggered by chronic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Kaur, P., Aschner, M. and Syversen, T. (2006). Glutathione modulation influences methyl mercury induced neurotoxicity in primary cell cultures of neurons and astrocytes. *NeuroToxicology*, 27, 492–500.
- Kawakami, T., Hanao, N., Nishiyama, K., Kadota, Y., Inoue, M., Sato, M., Suzuki, S. (2012). Differential effects of cobalt and mercury on lipid metabolism in the white adipose tissue of high-fat diet-induced obesity mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 258(1), 32-42.
- Kaya, S., Aliyev, V., Iritas, S. B. and Soylemezoglu, T. (2009). Determination of mercury and lead levels in autopsy brain tissue samples. *Abstracts / Toxicology Letters* 189S.

- Kern, J. K., Geier, D. A., Audhya, T., King, P. G., Sykes, L. K., Geier, M. R. (2012). Evidence of parallels between mercury intoxication and the brain pathology in autism. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 72(2), 113-53.
- İnternet: Kimyasal Maddelerle Çalışmalarda Sağlık ve Güvenlik Hakkında Yönetmelik. (2013).URL:
<http://mevzuat.basbakanlik.gov.tr/Metin.Aspx?MevzuatKod=7.5.18709&MevzuatIliski=0&sourceXmlSearch=kimyasal> Son Erişim Tarihi: 17 Haziran 2015.
- Korecka, J. A., van Kesteren, R. E., Blaas, E., Spitzer, S. O., Kamstra, J. H., Smit, A. B., Swaab, D. F., Verhaagen, J. and Bossers, K. (2013). Phenotypic characterization of retinoic acid differentiated SH-SY5Y cells by transcriptional profiling. *PLoS One*, 8(5), 1-17.
- Kuner, T., Wollmuth, L. P., Karlin, A., Seeburg, P. H. and Sakmann, B. (1996). Structure of the NMDA receptor channel M2 segment inferred from the accessibility of substituted cysteines. *Neuron*, 17, 343-352.
- Kuramoto, N., Wilkins, M.E., Fairfax, B.P., Revilla-Sanchez, R., Terunuma, M., Tamaki, K., Iemata, M., Warren, N., Couve, A., Calver, A., Horvath, Z., Freeman, K., Carling, D., Huang, L., Gonzales, C., Cooper, E., Smart, T. G., Pangalos, M. N., Moss, S. J. (2007). Phospho-dependent functional modulation of GABA(B) receptors by the metabolic sensor AMP-dependent protein kinase. *Neuron*, 53, 233–247.
- Łabuzek, K., Suchy, D., Gabryel, B., Bielecka, A., Liber, S. and Okopień, B. (2010). Quantification of metformin by the HPLC method in brain regions, cerebrospinal fluid and plasma of rats treated with lipopolysaccharide. *Pharmacological Reports*, 62, 956–965.
- Lang, R., Dieminger, N., Beusch, A., Lee, Y. M., Dunkel, A., Suess, B., Skurk, T., Wahl, A., Hauner, H. and Hofmann, T. (2013). Bioappearance and pharmacokinetics of bioactives upon coffee consumption. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(26), 8487-503.
- Lau, D., Bading, H. (2009). Synaptic activity-mediated suppression of p53 and induction of nuclear calcium-regulated neuroprotective genes promote survival through inhibition of mitochondrial permeability transition. *The Journal of Neuroscience*, 29(14), 4420-4429.
- Lauderback, C. M., Hackett, J. M., Huang, F. F., Keller, J. N., Szweda, L. I., Markesbery, W. R. and Butterfield, D. A. (2001). The glial glutamate transporter, GLT-1, is oxidatively modified by 4-hydroxy-2-nonenal in the Alzheimer's disease brain: the role of Abeta1-42. *Journal of Neurochemistry*, 78, 413– 416.
- LeBel, C. P., Ali, S. F., McKee, M., Bondy, S. C. (1990). Organometal-induced increases in oxygen reactive species: the potential of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate as an index of neurotoxic damage, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 104, 17–24.

- Lee, J., Kosaras, B., Aleyasin, H., Han, J.A., Park, D.S., Ratan, R.R., Kowall, N.W., Ferrante, R.J., Lee, S.W. and Ryu, H. (2006). Role of cyclooxygenase-2 induction by transcription factor Sp1 and Sp3 in neuronal oxidative and DNA damage response *FASEB Journal*, 20, 2375–2377.
- Lelo, A., Miners, J. O., Robson, R. and Birkett, D. J. (1986). Assessment of caffeine exposure: caffeine content of beverages, caffeine intake, and plasma concentrations of methylxanthines. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 39, 54–59.
- Lin, M. T., Beal, M. F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 443, 787–795.
- Lipton, S. A., Choi, Y. B., Takahashi, H., Zhang, D., Li, W., Godzik, A., Bankston, L. A. (2002). Cysteine regulation of protein function-as exemplified by NMDA-receptor modulation. *Trends in Neurosciences*, 25, 474-480.
- Liu, X., Smith, B. J., Chen, C., Callegari, E., Becker, S. L., Chen, X., Cianfrogna, J., Doran, A. C., Doran, S. D., Gibbs, J. P., Hosea, N., Liu, J., Nelson, F. R., Szewc, M. A., Van Deusen, J. (2006). Evaluation of cerebrospinal fluid concentration and plasma free concentration as a surrogate measurement for brain free concentration. *Drug Metabolism and Disposition*, 34(9), 1443-7.
- Lu, T., Hsieh, S., Yen, C., Wu, H., Chen, K., Hung, D., Chen, C., Wu, C., Su, Y., Chen, Y., Liu, S. and Huang, C. (2011). Involvement of oxidative stress-mediated ERK1/2 and p38 ctivation regulated mitochondria-dependent apoptotic signals in methylmercury-induced neuronal cell injury. *Toxicology Letters*, 204, 71–80.
- Ma, T. C., Buescher, J. L., Oatis, B., Funk, J. A., Nash, A. J., Carrier, R. L., Hoyt, K. R. (2007). Metformin therapy in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neuroscience Letters*, 411, 98–103.
- Majewska, M. D., Bell, J. A., London, E. D. (1990). Regulation of the NMDA receptor by redox phenomena: inhibitory role of ascorbate. *Brain Research*, 537, 328-332.
- Marcheselli, V. L. and Bazan, N. G. (1996). Sustained induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by seizures in hippocampus. Inhibition by a platelet-activating factor antagonist. *The Journal of Biological Chemistry*, 27, 24794–24799.
- Martin-Castillo, B., Vazquez-Martin, A., Oliveras-Ferraros, C. and Menendez, J. A. (2010). Metformin and cancer: doses, mechanisms and the dandelion and hormetic phenomena. *Cell Cycle*, 9(6), 1057-64.
- Marty, M. S. and Atchison, W. D. (1997). Pathways mediating Ca²⁺ entry in rat cerebellar granule cells following in vitro exposure to methyl mercury, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 147, 319–330.
- Marty, M. S. and Atchison, W. D. (1998). Elevations of intracellular Ca²⁺ as a probable contributor to decreased viability in cerebellar granule cells following acute exposure to methylmercury, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 150, 98–105.

- Masliyah, E., Terry, R. D., Deteresa, R.M. and Hansen, L. A. (1989). Immunohistochemical quantification of the synapse-related protein synaptophysin in Alzheimer disease. *Neuroscience Letters*, 103(2), 234–239.
- Mathew, T. S., Ferris, R. K., Downs, R. M., Kinsey, S. T., Baumgarner, B. L. (2014). Caffeine promotes autophagy in skeletal muscle cells by increasing the calcium-dependent activation of AMP-activated protein kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 453(3):411-8.
- Matyja, E. and Albrecht, J. (1993). Ultrastructural evidence that mercuric chloride lowers the threshold for glutamate neurotoxicity in an organotypic culture of rat cerebellum. *Neuroscience Letters*, 158, 155-158.
- Meldrum, B. S. (2000). Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *The Journal of Nutrition*, 130S, 1007–15.
- Meraz-Ríos, M. A., Franco-Bocanegra, D., Toral-Rios, D. and Campos-Peña, V. (2014). Early onset Alzheimer's disease and oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 1-14.
- Miettinen, S., Fusco, F.R., Yrjänheikki, J., Keinänen, R., Hirvonen, T., Roivainen, R., Närhi, M., Hökfelt, T. and Koistinaho, J. (1997). Spreading depression and focal brain ischemia induce cyclooxygenase-2 in cortical neurons through N-methyl-d-aspartic acid-receptors and phospholipase A2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 6500–6505.
- Minghetti, L. (2004). Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 63, 901–910.
- 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: Biology and Chemistry*. 5(1), 62-71.
- Miyamoto, K., Nakanishi, H., Moriguchi, S., Fukuyama, N., Eto, K., Wakamiya, J., Murao, K., Arimura, K., Osame, M. (2001). Involvement of enhanced sensitivity of Nmethyl-d-aspartate receptors in vulnerability of developing cortical neurons to methylmercury neurotoxicity. *Brain Research*, 901, 252–258.
- Moncada, S., Higgs, A. and Furchgott, R. (1997). International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacological Reviews*, 49(2), 137-142.
- Moneim, A. E. A. (in press). The neuroprotective effect of berberine in mercury-induced neurotoxicity in rats. *Metabolic Brain Disease*.
- Monnet-Tschudi, F., Zurich, M. G., Boschhat, C., Corbaz, A. and Honegger, P. (2006). Involvement of environmental mercury and lead in the etiology of neurodegenerative diseases. *Reviews on Environmental Health*, 21(2), 105-17.

- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55–63.
- Mumford, G. K., Benowitz, N.L., Evans, S. M., Kaminski, B. J., Preston, K. L., Sannerud, C. A., Silverman, K., Griffiths, R. R. (1996). Absorption rate of methylxanthines following capsules, cola and chocolate. *The European Journal of Clinical Pharmacology*, 51, 319–25
- Musi, N., Hirshman, M.F., Nygren, J., Svanfeldt, M., Bavenholm, P., Rooyackers, O., Zhou, G., Williamson J. M., Ljunqvist, O., Efendic, S., Moller, D. E., Thorell, A. and Goodyear, L. J. (2002). *Diabetes*, 51, 2074-2081.
- Mutter, J., Naumann, J., Sadaghiani, C., Schneider, R., and Walach, H. (2004). Alzheimer disease: Mercury as pathogenic factor and apolipoprotein E as a moderator. *Neuroendocrinology Letters*, 25, 331–339.
- Nakamura, T and Lipton, S. A. (2010). Preventing Ca²⁺-mediated nitrosative stress in neurodegenerative diseases: Possible pharmacological strategies. *Cell Calcium*, 47(2), 190–197.
- Internet: National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). (1994a). Mercury compounds [except (organo) alkyls] (as Hg) URL: <http://www.cdc.gov/niosh/idlh/7439976.htm>, Son Erişim Tarihi: 17.06.2015.
- Internet: National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). (1994b). Mercury (organo) alkyl compounds (as Hg). URL: <http://www.cdc.gov/niosh/idlh/merc-hg.html>, Son Erişim Tarihi: 17.06.2015.
- Nawrot, P., Jordan, S., Eastwood, J., Rotstein, J., Hugenholtz, A. and Feeley, M. (2003). Effects of caffeine on human health. *Food Additives and Contaminants*, 20 (1), 1–30.
- Nehlig, A., Daval, J. L., Debry, G. (1992). Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Research Reviews*, 17(2), 139-70.
- Newland, M. C. and Reile, P. A. (1999). Blood and brain mercury levels after chronic gestational exposure to methylmercury in rats. *Toxicological Science*, 50, 106–16.
- Newland, M. C., Paletz, E. M. and Reed, M. N. (2008). Methylmercury and nutrition: adult effects of fetal exposure in experimental models. *Neurotoxicology*, 29(5), 783-801.
- Nomura, Y. (2004). Neuronal apoptosis and protection: effects of nitric oxide and endoplasmic reticulum-related proteins. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(7), 961-63.
- Olivieri, G., Brack, C., Müller-Spahn, F., Stähelin, H.B., Herrmann, M., Renard, P., Brockhaus, M. and Hock., C. (2000). Mercury induces cell cytotoxicity and oxidative stress and increases b-amyloid secretion and tau phosphorylation in SHSY5Y neuroblastoma cells. *Journal of Neurochemistry*, 74 (1), 231-236.

- Occupational Safety & Health Administration. (1976a). *Interpretation of Allowable Airborne Concentrations of Mercury*. Washington, USA: U.S. Department of Labor.
- Occupational Safety & Health Administration. (1978b). *Inorganic Mercury and its Compounds*. Washington, USA: United States Department of Labor.
- Oyama, Y., Yamazaki, Y., Okada, Y., Takahama, K., Satoh, M. and Hayashi, . H. (2000). Toxicity of methylmercury conjugated with l-cysteine on rat thymocytes and human leukemia K562 cells in comparison with that of methylmercury chloride. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 9, 49–55.
- Patrick, L. (2002). Mercury Toxicity and Antioxidants: Part I: Role of Glutathione and alpha-Lipoic Acid in the Treatment of Mercury Toxicity. *Alternative Medicine Review*, 7, 456-471.
- Pieper, I., Wehe, C.A., Bornhorst, J., Ebert, F., Leffers, L., Holtkamp, M., Hösel, P., Weber, T., Mangerich, A., Bürkle, A., Karst, U. and Schwerdtle, T. (2014). Mechanisms of Hg species induced toxicity in cultured human astrocytes: genotoxicity and DNA-damage response. *Metallomics*, 6, 662-671.
- Poels, J., Spasić, M.R., Callaerts, P. and Norga, K.K. (2009). Expanding roles for AMP-activated protein kinase in neuronal survival and autophagy. *Bioessays*, 31, 944–952.
- Pong, K. (2003). Oxidative stress in neurodegenerative diseases: therapeutic implications for superoxide dismutase mimetics. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 3(1), 127-39.
- Prasanthi, J. R. P., Dasari, B., Marwarha, G., Larson, T., Chen, X., Geiger, J. D., Ghribi, O. (2010). Caffeine protects against oxidative stress and Alzheimer's disease-like pathology in rabbit hippocampus induced by cholesterol-enriched diet. *Free Radical Biology and Medicine*, 49, 1212-1220.
- Internet: Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., Dhama, K. (January, 2014). Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: *The Interplay*, Vol. 2014. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3920909/pdf/BMRI2014-761264.pdf>, Son Erişim Tarihi: 14.06.2015.
- Ramamurthy, S., Chang, E., Cao, Y., Zhu, J. and Ronnett, G.V. (2014). AMPK activation regulates neuronal structure in developing hippocampal neurons. *Neuroscience*, 259, 13-24.
- Risher, J., Dewoskin, R. (1999). Toxicological profile for Mercury. *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*, Georgia, 1-617.
- Ronnett, G. V., Ramamurthy, S., Kleman, A. M., Landree, L. E. and Aja, S. (2009). AMPK in the brain: its roles in energy balance and neuroprotection. *Journal of Neurochemistry*, 109, 17-23.

- Ross, G. W., Abbott, R. D., Petrovitch, H., White, L. R. and Tanner, C. M. (2000). Relationship between caffeine intake and parkinson's disease. *The Journal of American Medical Association*, 283, 2674–2679.
- Rossi, A. D., Viviani, B., Zhivotovsky, B., Manzo, L., Orrenius, S., Vahter, M. and Nicotera, P. (1997). Inorganic mercury modifies Ca^{2+} signals, triggers apoptosis and potentiates NMDA toxicity in cerebellar granule neurons. *Cell Death and Differentiation*, 4(4), 317-24.
- Ruszkiewicz, J. and Albrecht, J. (in press). Changes in the mitochondrial antioxidant systems in neurodegenerative diseases and acute brain disorders. *Neurochemistry International*.
- İnternet: Rxlist. (2010). Glucophage, Glucophage XR, Clinical Pharmacology. URL: <http://www.rxlist.com/glucophage-drug/clinical-pharmacology.htm>, Son Erişim Tarihi: 15.06.2015.
- Sahin, B., Galdi, S., Hendrick, J., Greene, R. W., Snyder, G. L. and Bibb, J. A. (2007). Evaluation of neuronal phosphoproteins as effectors of caffeine and mediators of striatal adenosine A2A receptor signaling. *Brain Research*, 1129(1), 1-14.
- Salminen, A., Kaarniranta, K., Haapasalo, A., Soininen, H. and Hiltunen, M. (2011). AMP-activated protein kinase: a potential player in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 118(4), 460-474.
- Santos, C., Costa, J., Santos, J., Vaz-Carneiro, A. and Lunet, N. (2010). Caffeine intake and dementia: systematic review and meta-analysis. *Journal of Alzheimer's Disease*, 20(1), 187-204.
- Sarafian, T. A. and Verity, M. A. (1991). Oxidative mechanisms underlying methyl mercury neurotoxicity. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 9 147–153.
- Sarafian, T. A. (1993). Methyl mercury increases intracellular Ca^{2+} and inositol phosphate levels in cultured cerebellar granule neurons. *The Journal of Neurochemistry*, 61, 648–657.
- Sas, K., Robotka, H., Toldi, J. and V´ecsei, 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.
- Sawynok, J. (1995). Pharmacological rationale for the clinical use of caffeine. *Drugs*, 49, 37–50.
- Schwarzschild, M. A., Xu, K., Oztaş, E., Petzer, J. P., Castagnoli, K., Castagnoli N. Jr. and Chen, J. F. (2003). Neuroprotection by caffeine and more specific A2A receptor antagonists in animal models of Parkinson's disease. *Neurology*, 61, 55-61.

- Sheng, R., Zhang, L. S., Han, R., Liu, X. Q., Gao, B., Qin, Z. H. (2010). Autophagy activation is associated with neuroprotection in a rat model of focal cerebral ischemic preconditioning. *Autophagy*, 6, 482–494.
- Shenker, B. J., Guo, T. L., I. O., Shapiro, I. M. (1999). Induction of apoptosis in human T-cells by methyl mercury: temporal relationship between mitochondrial dysfunction and loss of reductive reserve. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 157, 23–35.
- Shanker, G., Syversen, T., Aschner, J. L. and Aschner, M. (2005). Modulatory effect of glutathione status and antioxidants on methylmercury-induced free radical formation in primary cultures of cerebral astrocytes. *Molecular Brain Research*, 137, 11–22.
- Sieger, F.A.S., Silva, G.A.D., Ardila, G.P. and García, R.G. (2012). Mercury chronic toxicity might be associated to some cases of hydrocephalus in adult humans?. *Medical Hypotheses*, 79, 13–16.
- Smith, W. L., DeWitt, D. L. and Garavito, R. M. (2000). Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *The Annual Review of Biochemistry*, 69, 145–182.
- Somogyi, L. P. (2010). Caffeine intake by the U.S. population. *The Food and Drug Administration*, Kensington, California, 1-90.
- Song, J. and Choi, B. (2013). Mercury induced the accumulation of amyloid beta (A β) in PC12 cells: The role of production and degradation of A β . *Official Journal of Korean Society of Toxicology*, 29(4), 235-240.
- Spyridopoulos, I., Fichtlscherer, S., Popp, R., Toennes, S. W., Fisslthaler, B., Trepels, T., Zerneck, A., Liehn, E. A., Weber, C., Zeiher, A. M., Dimmeler, S. and Haendeler, J. (2008). Caffeine enhances endothelial repair by an AMPK-dependent mechanism. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28(11), 1967-74.
- Stark, R., Ashley, S. E. and Andrews, Z. B. (2013). AMPK and the neuroendocrine regulation of appetite and energy expenditure. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 366(2), 215-23.
- Steinberg, G.R., Kemp, B.E. (2009). AMPK in Health and Disease. *Physiological Reviews*, 89(3), 1025–1078.
- Stern, S., Cox, C., Cernichiari, E., Balys, M. and Weiss, B. (2001). Perinatal and lifetime exposure to methylmercury in the mouse: blood and brain concentrations of mercury to 26 months of age. *Neurotoxicology*, 22, 467–477.
- Szücs, A., Angiello, C., Salánki, J., Carpenter, D. O. (1997). Effects of inorganic mercury and methylmercury on the ionic currents of cultured rat hippocampal neurons. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 17(3), 273-88.
- Tanaka, K., Ishitsuka, Y., Kurauchi, Y., Yamaguchi, K., Kadowaki, D., Irikura, M., Katsuki, H., Irie, T. (2013). Comparative effects of respiratory stimulants on hypoxic neuronal cell injury in SH-SY5Y cells and in hippocampal slice cultures from rat pups. *Pediatrics International*, 55(3), 320-327.

- Teismann, P., Vila, M., Choi, D. K., Tieu, K., Wu, D. C., Jackson-Lewis, V., Przedborski, S. (2003). COX-2 and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 991, 272–277.
- Toimela, T., Maenpaa, H., Mannerstroöm, M. and Tahti, H. (2004). Development of an in vitro blood–brain barrier model—cytotoxicity of mercury and aluminum. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 195, 73–82.
- Turnley, A.M., Stapleton, D., Mann, R.J., Witters L.A., Kemp, B.E. and Bartlett, P.F. (1999). Cellular distribution and developmental expression of AMP-activated protein kinase isoforms in mouse central nervous system. *Journal of Neurochemistry*, 72, 1707–1716.
- Ullah, I., Ullah, N., Naseer, M. I., Lee, H. Y. and Kim, M. O. (2012). Neuroprotection with metformin and thymoquinone against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in prenatal rat cortical neurons. *BMC Neuroscience*, 13, 1-11.
- İnternet: United States Environmental Protection Agency - Integrated Risk Information System. (1987). Methylmercury (MeHg) (CASRN 22967-92-6). URL: <http://www.epa.gov/iris/subst/0073.htm>, Son Erişim Tarihi: 17.06.2015.
- İnternet: United States Environmental Protection Agency - Integrated Risk Information System. (1995). Methylmercury (MeHg) (CASRN 22967-92-6). URL: <http://www.epa.gov/iris/subst/0073.htm>, Son Erişim Tarihi: 17.06.2015.
- Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P. and Mahajan, R. T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuroparmacology*, 7(1), 65–74.
- Vahter, M.E., Mottet, N.K., Friberg, L.T., Lind, S.B., Charleston, J.S. and Burbacher, T.M. (1995). Demethylation of methyl mercury in different brain sites of *Macaca fascicularis* monkeys during long-term subclinical methyl mercury exposure. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 134, 273-284.
- van Vliet, E., Morath, S., Eskes, C., Linge, J., Rappsilber, J., Honegger, P., Hartung, T., Coecke, S. (2008). A novel in vitro metabolomics approach for neurotoxicity testing, proof of principle for methyl mercury chloride and caffeine. *Neurotoxicology*, 29(1), 1-12.
- Vingtdeux, V., Chandakkar, P., Zhao, H., d'Abramo, C., Davies, P. and Marambaud, P. (2011). Novel synthetic small-molecule activators of AMPK as enhancers of autophagy and amyloid-beta peptide degradation. *The Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25, 219–231.
- Wang, S. J. (2007). Caffeine facilitation of glutamate release from rat cerebral cortex nerve terminals (synaptosomes) through activation protein kinase C pathway: an interaction with presynaptic adenosine A1 receptors. *Synapse*. 61(6), 401-11.

- 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. *The Journal of Neuroscience*, 29, 2997–3008.
- Williams, T., Courchet, J., Viollet, B., Brenman, J. E. and Polleux, F. (2011). AMP-activated protein kinase (AMPK) activity is not required for neuronal development but regulates axogenesis during metabolic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 5849–5854.
- World Health Organization. (1990). *Environmental Health Criteria 101: Methylmercury*. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- World Health Organization. (1992). *The ICD-10 classification of mental and behavioural disorders: Clinical descriptions and diagnostic guidelines*. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- World Health Organization (2013). *WHO Model List of Essential Medicines—18th List*. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- Wyrembek, P., Szczuraszek, K., Majewska, M. D. and Mozrzymas, J. W. (2010). Intermingled modulatory and neurotoxic effects of thimerosal and mercuric ions on electrophysiological responses to GABA and NMDA in hippocampal neurons. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 61(6), 753–758.
- Xie, Z., Dong, Y., Scholz, R., Neumann, D. and Zou, M. H. (2008). Phosphorylation of LKB1 at serine 428 by protein kinase C- ζ is required for metformin-enhanced activation of the AMP-activated protein kinase in endothelial cells. *Circulation*, 117(7), 952–62.
- Xu, K., Xu, Y. H., Chen, J. F. and Schwarzschild, M. A. (2002). Caffeine's neuroprotection against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity shows no tolerance to chronic caffeine administration in mice. *Neuroscience Letters*, 322, 13–16.
- Xu, F., Farkas, S., Kortbeek, S., Zhang, F.X., Chen, L., Zamponi, G.W. and Syed, N.I. (2012). Mercury-induced toxicity of rat cortical neurons is mediated through N-Methyl-D-Aspartate receptors. *Molecular Brain*, 5 (30), 1–14.
- Yamagata, K., Andreasson, K. I., Kaufmann, W. E. Barnes, C. A. and Worley, P. F. (1993). Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron*, 11, 371–386.
- Yee, S. and Choi, B. H. (1994). Methylmercury poisoning induces oxidative stress in the mouse brain, *Experimental and Molecular Pathology*, 60, 188–196.
- Yee, S. and Choi, B. H. (1996). Oxidative stress in neurotoxic effects of methylmercury poisoning. *Neurotoxicology*, 17, 17–26.

- Yin, Z., Milatovic, D., Aschner, J. L., Syversen, T., Rocha, J. B., Souza, D. O., Sidoryk, M., Albrecht, J., Aschner, M. (2007). Methylmercury induces oxidative injury, alterations in permeability and glutamine transport in cultured astrocytes. *Brain Research*, 1131, 1–10.
- Yoshimura, H. (2005). The Potential of Caffeine for Functional Modification from Cortical Synapses to Neuron Networks in the Brain. *Current Neuropharmacology*, 3, 309-316.
- Zahir, F., Rizwi, S. J., Haqb, S.K. and Khanb, R.H. (2005). Low dose mercury toxicity and human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 20, 351–360.
- Zakikhani, M., Dowling, R., Fantus, I. G., Sonenberg, N. and Pollak, M. (2006). Metformin is an AMP kinase-dependent growth inhibitor for breast cancer cells. *Cancer Research*, 66(21), 10269-10273.
- Zhang, P., Xu, Y., Sun, J., Li, X., Wang, L. and Jin, L. (2009). Protection of pyrroloquinoline quinone against methylmercury-induced neurotoxicity via reducing oxidative stress. *Free Radical Research*, 43(3), 224-33.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : KARAKISA, Damla
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 24.11.1987 - Altındağ
 Medeni hali : Bekar
 Telefon : 05067314916
 Faks : -
 e-mail : pharmdamla@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji ABD	Devam ediyor
Lisans	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	14.06.2010
Lise	Kocatepe Mimar Kemal Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi	10.06.2005

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
07.2014-Devam ediyor	NEPHA TIBBİ CİHAZLAR SAN. VE TİC. A.Ş.	Ruhsatlandırma ve Farmakovijilans Yetkilisi
10.2010-06.2014	KEYMEN İLAÇ SAN. VE TİC. A.Ş.	Ruhsatlandırma Uzmanı & Farmakovijilans Yetkilisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

-

Hobiler

Resim çizmek, seyahat etmek



GAZİ GELECEKTİR..