



T.C.
SIVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GLUTAMAT EKŞİTOTOKSİTİTESİ OLUŞTURULAN C6
GLİOMA HÜCRELERİNDE TOFACİTİNİB'İN ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

KEVSER NASIRLI DOĞAN

ORCID 0000-0001-9150-1027

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SIVAS
OCAK 2024

T.C.
SİVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GLUTAMAT EKŞİTOTOKSİTİTESİ OLUŞTURULAN C6
GLİOMA HÜCRELERİNDE TOFACİTİNİB'İN
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

KEVŞER NASIRLI DOĞAN

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
DOÇ.DR. BİLAL ŞAHİN

SİVAS

OCAK 2024



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

ÖZET

GLUTAMAT EKŞİTOTOKSİTİTESİ OLUŞTURULAN C6 GLİOMA HÜCRELERİNDE TOFACİTİNİB'İN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Kevser Nasırlı Doğan

Department of Physiology

Yüksek Lisans Tezi

Danışman:

Doç. Dr. Bilal Şahin

2023, xi,56 Sayfa

Glutamat eksitotoksitite modellemesi oluşturulan hücrelerde farklı madde ve ilaçlar eksitotoksititeyi önlemek amacıyla araştırılmaktadır. Ancak romatolojik hastalıklarda kullanılan ve JAK/STAT yolağı üzerinden antiinflamatuvar etki gösteren, sinir sistemi üzerine olumlu etkileri çeşitli çalışmalarla kanıtlanan tofacitinib'in glutamat eksitotoksitesine olan etkisi henüz aydınlatılamamıştır. Bu çalışmada C6 glioma hücrelerinde oluşturulan glutamat eksitotoksitesine üzerine tofacitinib'in etkisi ve bu etkide oksidatif stres ve antiinflamatuvar yolların incelenmesi amaçlanmıştır.

C6 glioma hücrelerinde tofacitinib'in etkin dozu XTT testi kullanılarak 100 nM olarak bulunmuştur. Hücreler; Kontrol, Glutamat (10 mM), Tofacitinib (100 nM) ve Glutamat+Tofacitinib olmak üzere dört gruba ayrılmıştır. Tümör Nekrozis Faktör $-\alpha$ (Tnf- α), İnterlökin-1 β (IL-1 β), total antioksidan seviyesi (TAS) ve total oksidan seviyesi (TOS) ölçümü ticari kitler ile yapılmış ve COX-1 COX-2 ölçümü için immunohistokimyasal yöntemler kullanılmıştır.

Bulgular tofacitinib'in 100 nM dozda glutamat eksitotoksitesine karşı hücre canlılığını arttırdığını göstermiştir ($p<0,05$). Ek olarak, tofacitinib eklenmesi glutamat grubu hücrelerde artan TNF- α , IL-1 β , ve TOS seviyelerini azaltmıştır ($p<0,05$). İmmünohistokimyasal bulgular glutamat eksitotoksitesine artan COX-1 ve COX-2 ekspresyonunun tofacitinib ile azaldığını göstermiştir ($p<0,05$).

Sonuç olarak tofacitinib glutamat eksitotoksitesine karşı c6 glioma hücrelerinde hücre canlılığını koruyucu etki göstermiş ve bu etkide antioksidatif ve antiinflamatuvar mekanizmaların rol oynadığı ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Eksitotoksitite, Glutamat, Tofacitinib, Oksidatif Stres, , C6 Glioma Hücresi

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF TOFACITINIB ON C6 GLIOMA CELLS CAUSED BY GLUTAMATE EXCITOTOXICITY

Kevser Nasırlı Doğan

Fizyoloji Anabilim Dalı

Master's Thesis

Supervisor:

Doç. Dr. Bilal Şahin

2023, xi,56 Sayfa

Different substances and drugs are being investigated to prevent excitotoxicity in cells modeled for glutamate excitotoxicity. However, the effect of tofacitinib, which is used in rheumatological diseases and has an anti-inflammatory effect through the JAK/STAT pathway, and whose positive effects on the nervous system have been proven by various studies, on glutamate excitotoxicity has not yet been elucidated. This study aimed to examine the effect of tofacitinib on glutamate excitotoxicity in C6 glioma cells and the oxidative stress and anti-inflammatory pathways involved in this effect.

The effective dose of tofacitinib in C6 glioma cells was found to be 100 nM using the XTT assay. Cells were divided into four groups: Control, Glutamate (10 mM), Tofacitinib (100 nM) and Glutamate+Tofacitinib. Tumor Necrosis Factor α (Tnf- α), Interleukin-1 β (IL-1 β), total antioxidant level (TAS) and total oxidant level (TOS) measurements were made with commercial kits and immunohistochemical methods were used for COX-1 COX-2 measurement.

Findings showed that tofacitinib increased cell viability against glutamate excitotoxicity at a dose of 100 nM ($p<0.05$). Additionally, the addition of tofacitinib reduced the increased levels of TNF- α , IL-1 β , and TOS in glutamate group cells ($p<0.05$). Immunohistochemical findings showed that COX-1 and COX-2 expression, which increases with glutamate excitotoxicity, decreased with tofacitinib ($p<0.05$).

As a result, tofacitinib showed a protective effect on cell viability in c6 glioma cells against glutamate excitotoxicity, and it was revealed that antioxidative and anti-inflammatory mechanisms played a role in this effect.

Keywords: Excitotoxicity, Glutamate, Tofacitinib, Oxidative Stress, C6 Glioma Cell

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|-------------|
| ÖZET | iv |
| ABSTRACT | v |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | viii |
| TABLolar DİZİNİ | ix |
| 1.GİRİŞ VE AMAÇ | 1 |
| 2.GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. Glial Hücreler..... | 3 |
| 2.2. C6 Hücre Hattı | 4 |
| 2.3. Glutamat..... | 6 |
| 2.3.1. <i>Sentezi Ve Metabolizması</i> | 7 |
| 2.3.2. <i>Glutamat Reseptörleri</i> | 9 |
| 2.3.3. Glutamat Taşıyıcıları..... | 12 |
| 2.4. Glutamat Ve Eksitotoksitite | 14 |
| 2.5. Glutamat Ve Oksidatif Stres | 15 |
| 2.6. JAK/STAT Yolu | 16 |
| 2.6.1. <i>Jak/Stat Aktivasyon Mekanizması</i> | 16 |
| 2.6.2. <i>Jak (Janus Kinaz) İnhibitörleri</i> | 17 |
| 2.7. Tofacitinib..... | 18 |
| 2.7.1. <i>Tofacitinib Kimyası</i> | 18 |
| 2.7.2. <i>Tofacitinib'in Farmakodinamiği</i> | 19 |
| 3.GEREÇ VE YÖNTEM | 21 |
| 3.1. Malzeme Listesi | 21 |
| 3.2. Kullanılan Cihazlar | 22 |
| 3.3. Kimyasal Malzemeler | 23 |
| 3.4. Hücre Kültürü | 23 |
| 3.5. Hücre Süpernatantlarının Hazırlanması | 24 |
| 3.6. İlaç Tedavisi..... | 25 |
| 3.7. Hücre Canlılığı..... | 25 |
| 3.8. TNF- α ve IL-1 β Ölçümleri | 26 |
| 3.9. TAS ve TOS ölçümü..... | 27 |
| 3.10. COX-1 ve COX-2 İmmünohistokimyasal Boyamalar | 28 |
| 3.11. İstatistiksel Analiz..... | 28 |
| 4.BULGULAR | 30 |
| 4.1. Tofacitinib'in Hücre Canlılığına Etkisi..... | 30 |
| 4.2. Tofacitinib'in TNF- α ve IL-1 β Düzeylerine Etkisi..... | 31 |
| 4.3. Tofacitinib'in TAS ve TOS Düzeylerine Etkisi..... | 33 |

| | |
|---|-----------|
| 4.4. Tofacitinib'in COX-1 ve COX-2 İmmünohistokimyasal Boyamalar Üzerine Etkisi . | 35 |
| 5.TARTIŞMA | 37 |
| 6. SONUÇ..... | 42 |
| 7.KAYNAKÇA | 43 |



ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Şekil 1: Glia Hücreleri | 4 |
| Şekil 2: C6 hücreleri morfolojik görüntüleri | 5 |
| Şekil 3: Glutamatın yapısı | 7 |
| Şekil 4: Sitrik Asit(Krebs) Döngüsü..... | 8 |
| Şekil 5: Glutamat-Glutamin Döngüsü | 9 |
| Şekil 6: NMDA Reseptörleri | 11 |
| Şekil 7: AMPA Reseptörü | 11 |
| Şekil 8: Glutamat Eksitotoksitesisi | 15 |
| Şekil 9: JAK İnhibitörleri | 18 |
| Şekil 10: Tofacitinib'in Yapısı | 19 |
| Şekil 11: Deney prosedürü..... | 25 |
| Şekil 12: Tofacitinib'in XTT canlılık testinde deney grupları üzerine etkisi..... | 30 |
| Şekil 13: Tofacitinib'in glutamat eksitotoksitesisi oluşturulan C6 glioma hücrelerinde hücre canlılığına etkisi. | 31 |
| Şekil 14: Tofacitinib'in TNF- α ve IL-1 β düzeylerine etkisi. | 32 |
| Şekil 15: Tofacitinib'in TAS ve TOS düzeylerine etkisi. | 34 |
| Şekil 16: Cox-1 Cox-2 immunohistokimyasal boyama sonuçları | 36 |

TABLULAR DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Tablo 1: Çalışmada kullanılan malzemelerin listesi | 21 |
| Tablo 2: Çalışmada kullanılan cihazların listesi..... | 22 |
| Tablo 3: Kullanılan kimyasal malzemeler ve alınan yerlerin listesi | 23 |
| Tablo 4: Grupların TNF- α ve IL-1 β düzeyi verileri..... | 33 |
| Tablo 5: Grupların TAS ve TOS düzeylerine ilişkin tanımlayıcı verileri..... | 35 |
| Tablo 6: COX-1 ve COX-2 ile immunfloresans boyamalarındaki istatistiksel farklılıklar..... | 35 |



KISALTMALAR

| | |
|--------------------------------|--|
| AMPA | Alfa-amino 3-hidroksi-5-metilisokzasole-4-propionik asit |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| ATP | Adenozin Trifosfat |
| BOS | Beyin Omurilik Sıvısı |
| DMEM | Dulbecco'nun Modifiye Eagle |
| DMSO | Dimetil Sülfoksit |
| EAA | Eksitatorik Aminoasit |
| EAAT | Eksitatorik Aminoasit Taşıyıcı Kanallar |
| FBS | Fetal Bovine Serum |
| GBM | Glioblastoma Multiform |
| GSH | Glutasyon |
| IL-1β | İnterlökin-1 Beta |
| iGluR | İyonotropik Glutamat Reseptörü |
| JAK | Janus Kinaz |
| mGluR | Mekanotropik Glutamat Reseptörü |
| NMDA | N-metil-D-aspartat |
| NOS | Nitrik Oksit Sentaz |
| PBS | Phosphate Buffer Solution |
| RA | Romatoid Artrit |
| ROT | Reaktif Oksijen Türleri |
| STAT | Sinyal Dönüştürücü ve Tanskripsiyon Yolu |
| TAS | Total Antioksidan Seviyesi |
| TNF-α | Tümör Nekroz Faktör-alfa |
| TOFA | Tofacitinib |
| TOS | Total Oksidan Seviyesi |
| TYK2 | Tirozin Kinaz 2 |
| VGLUT | Veziküler Glutamat Taşıyıcı |
| XTT | 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide testi |

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Glutamat merkezi sinir sisteminin en önemli eksitatör nörotransmitter maddesi olup sinaptik plastisite, öğrenme, hafıza ve diğer bilişsel işlevleri içeren çeşitli fizyolojik süreçlerde önemli rol oynamaktadır. Esansiyel olmayan aminoasit olarak sınıflandırılan glutamat, sinir sisteminde uyarıcı fonksiyon gösteren ana nörotransmitterdir. İnsan beynindeki sinaptik bağlantıların % 90'ından fazlasını uyarıcı karakterde olan glutamaterjik nöronlar oluşturmaktadır. Aynı zamanda serebellum granül hücreleri gibi bazı lokalize beyin bölgeleri için birincil nörotransmitter görevi görmektedir (nutrition & 2000, n.d.).

Sinaptik plastisitedeki rolü nedeniyle, glutamat beyindeki öğrenme ve hafıza gibi bilişsel işlevlerde önemli rol oynamaktadır. Uzun süreli güçlenme olarak bilinen plastisite şekli, hipokampus, neokorteks ve beyin diğer kısımlarındaki glutamaterjik sinapslar aracılığıyla gerçekleşmektedir (Reiner et al., 2018). Sinaptik aktivite, sinaptik aralıkta glutamat konsantrasyonunda artışa yol açmakta fakat glutamat taşıyıcıları tarafından glutamatın geri alınımı ile ekstraselüler glutamat konsantrasyonu korunmaktadır (Maragakis et al., n.d.). Glutamat taşıyıcıları nöronal ve glial membranlarda bulunmaktadır. Bu taşıyıcılar hücreler arası boşluktan glutamatın hızla uzaklaştırmasını sağlamaktadır. Beyin hasarı gibi patolojik durumlarda, taşıyıcı sistemde meydana gelen aksaklık nedeniyle glutamat hücre dışı alanda aşırı birikebilmektedir. Bu durum kalsiyum iyonlarının N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörleri aracılığıyla hücrelere girmesine neden olmaktadır. Fazla miktarda hücre içine giren kalsiyum nöronal hasarı tetiklemekte ve hücre ölümüne yol açmaktadır (Lau & Tymianski, 2010). Bu süreç glutamata bağlı eksitotoksisite olarak adlandırılmaktadır. Glutamat beyin fonksiyonlarında önemli rol oynamasına rağmen merkezi sinir sistemindeki yüksek konsantrasyonu glutamatın nörotoksik etkisinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Alzheimer, Parkinson, Huntington, epilepsi ve multiple skleroz gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde, glutamat eksitotoksisitesi önemli bir rol oynamaktadır (Hynd et al., n.d.; Lai et al., n.d.; Pitt et al., 2000; Vincent et al., n.d.)

Jak/Stat yolağı inhibitörlerinden biri olan tofacitinib romatoid artrit hastalarında yaygın kullanımı olan ve tedavi de olumlu sonuçlar açığa çıkaran bir kimyasal maddedir. Sitokinlerin reseptörlere bağlanması JAK yolaklarını aktive eder.

Hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanan sitokin, reseptör polimerizasyonuna yol açar. Tofacitinib'in Jak/Stat yolağını modüle etmesiyle birlikte JAK'lar reseptörleri fosforile edemez ve böylece STAT'lar bağlanamaz. JAK'lar STAT'ları fosforile edemediğinden STAT dimerizasyonu oluşmaz ve hücre çekirdeğine gen transkripsiyonu için sinyal gitmez. Böylelikle, Tofacitinib JAK'ın otofosforilasyonunu ve aktivasyonunu inhibe etmiş olur.

Literatürde romatolojik hastalıklarda kullanılan ve JAK/STAT yolağı üzerinden antiinflamatuvar etki gösteren tofacitinib'in sinir sistemi üzerine olumlu etkileri çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır. Fakat glutamat eksitotoksitesisi üzerine etkisi henüz aydınlatılmamıştır. Bu tez projesindeki amacımız C6 glioma hücre hattında tofacitinib'in glutamat eksitotoksitesisi üzerine etkisini araştırmak ve bu etkide oksidatif ve inflamatuvar mekanizmaları ortaya çıkarmaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Glial Hücreler

Glia hücreleri hakkında edinilmiş bilgiler teknolojinin de gelişmesiyle günümüze kadar çoğalmıştır. 1824 yılında Dutrochet glia hücrelerinin miyelinizasyon dışındaki morfolojik özelliklerini keşfetmiştir. Virchow ise 1860 tarihinde glia hücrelerinin merkezi sinir sisteminde nöronların etrafında bulunması sebebiyle nöroglia veya 'nerve glia' kavramını dile getirmiştir.

1909 yılında Ramon J Kajal, 1919 yılında del Rio Hortega o zaman kullanılan ekipmanlarla 3 farklı hücre grubunun olduğunu öne sürmüştür (Bottenstein, 2012). Bunlar oligodendrositler, mikrogliya ve astrosit hücreleridir. 1960 yılında kullanılmaya başlanan elektron mikroskobu yardımıyla glia hücreleri hakkında daha fazla bilgi edinilmiştir. Böylelikle hücre tiplerinin tanımlanması daha ayrıntılı yapılabilmektedir (Yılmaz, 1997).

Günümüzde glia hücreleri (Şekil 1) omurgalı sinir sistemlerinde 2 gruba ayrılmıştır. Bunlar;

1. Mikroglio
2. Makroglia

Mikrogliya hücreleri hareket edebilen fagositik hücrelerdir. Makrofajlardan köken alan bu hücreler travma, enfeksiyon gibi durumlarda görev alırlar. Makrofajlardan köken aldıkları için inflamasyonun önlenmesinde etkilidirler.

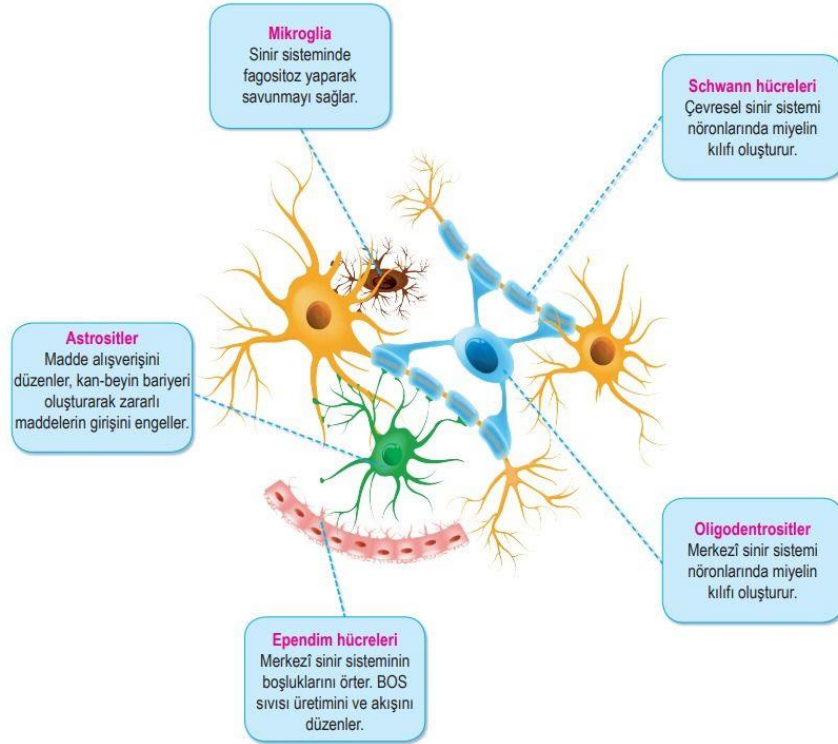
Makroglia hücreleri ise 3 ayrı gruba ayrılır. Bunlar ;

1. Oligodentrosit hücreleri
2. Astrosit hücreler
3. Schwann hücreleri

Oligodentrositler ve schwann hücreleri sayı olarak daha azlardır. Bu hücreler nöronların aksonunu saran miyelin kılıfı oluştururlar. Miyelin kılıf aksonu koruyup izole eder aynı zamanda sinir iletim hızını artırır. Oligodentrositler merkezi sinir sisteminde bulunurken Schwann hücreleri otonom sinir sisteminde bulunurlar (Bottenstein, 2012; Yılmaz, 1997).

Astroditler sayı ve görev olarak en fazla bulunan glia hücre grubudur. Bu hücrelerin farklı şekillerde hücre gövdeleri ve uzantıları vardır. Bu uzantılarla nöron hücreleri üzerinde uç ayaklar (end-feet) denilen yapıyı oluştururlar. Sinaptik alanda bulunan astroditler bazı nörotransmitterlere yüksek bağlanma eğilimi gösterirler. Bu şekilde nörotransmitterleri sinaptik aralıktan uzaklaştırırlar. End-feet denilen uç ayaklarıyla kan beyin bariyerine tutunarak nöron beslenmesine yardım ederler. Hasar alan bölgedeki atık maddeleri mikroglialarla işbirliği yaparak doku iyileşmesine yardımcı olurlar. Ayrıca artan nöron aktivitelerinde fazla salgılanan potasyumu uzaklaştırırlar (Education & 1993, n.d.).

Glia hücreleri postnatal dönemde de bölünme yeteneklerini devam ettirerek nöron hücrelerinden ayrılır. Reaktif gliosis, glial çoğalma, beyin travma cevabı, glia hücrelerinin malign transformasyonlarında bu durum gözlenir. Glial kaynaklı tümörlere verilen isim glioma' dır. Gliomalar genellikle astroditik hücrelerde görülürler (Bordey et al., 1998).



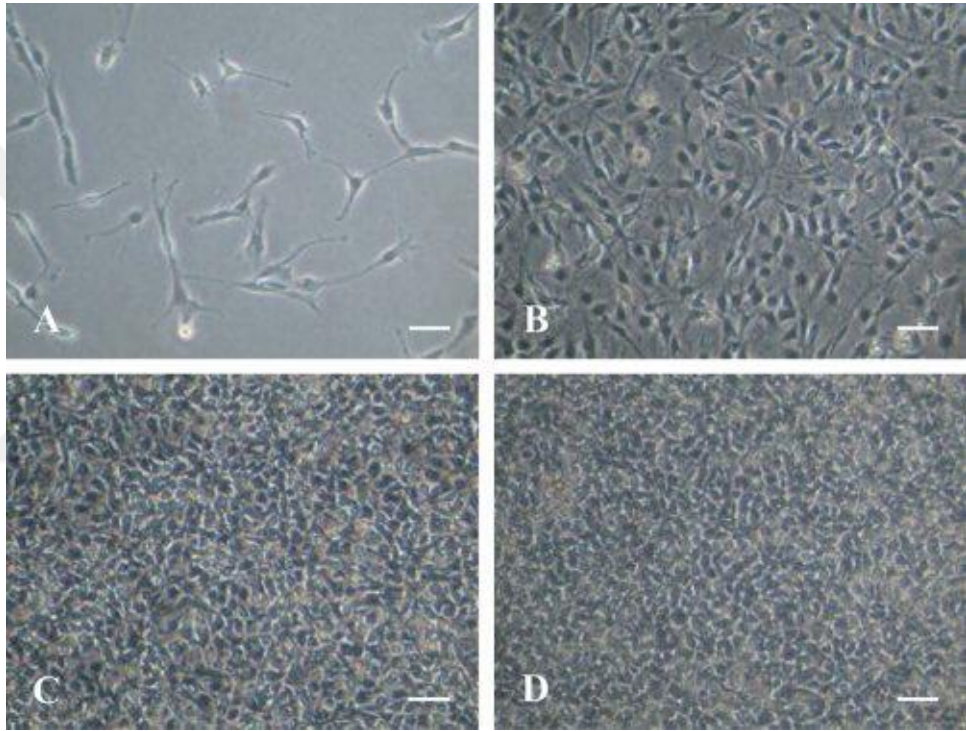
Şekil 1. Glia Hücreleri (SinirHücreleri / SinirSistemi, Akita, Düzenleme, n.d.)

2.2. C6 Hücre Hattı

C6 hücreleri ratlardan elde edilen glia hücreleridir. Morfolojileri fibroblasttır.

Hastalıklarında glioma oluşur. C6 glia hücreleri Benda ve arkadaşları tarafından bir dizi alternatif kültür ve hayvan geçişinden sonra N-Nitrometilüre ile indüklenen bir sıçan glial tümöründen klonlanmıştır.

C6 rat glioma hücre hattı astroglial kökenlidir. Hızlı çoğalabilirler. Bu sebeple araştırmalarda yapılan işlemlerinin sonucunun tespit edilmesi, glutamat eksitotoksitesisi oluşturulduğunda hücresel cevabın görülebilmesi için uygun hücre modeli oluşturduğu yapılan çalışmalarla bulunmuştur (Şekil 2) (Goya et al., n.d.; Kato et al., n.d.).



Şekil 2. C6 hücreleri morfolojik görüntüleri (Berezowski et al., 2005)

Deneylerde kullanılan ideal glioma modeli, morfolojik özellikler, invazif paterni ve yeteneği, vasküler davranışı ve immün mikro çevresi açısından insan glioblastoma multiforme (GBM) hücre hattına benzer olmalıdır. İnsan GBM'sini simüle eden ve araştırmada kullanılan çok sayıda hücre dizisi vardır. En yaygın olarak kullanılanlardan biri C6 hücre hattıdır. C6, orta derecede istilacı yeteneğe sahiptir. Her glioma modeli, farklı uzunluk ve çaptaki damarlarla kendi damar ağını oluşturabilir. Yüksek neovaskülarizasyon sergiler. Konağın orta düzeyde immün tepkisine neden olabilir. Bununla birlikte, bir tümör-immün mikro

ortamında çalışılmasına ihtiyaç duyulduğunda C6 en uygun hücredir ve insan GBM immün infiltratlarına benzer (Gieryng et al., n.d.).

C6 rat glioma hücre hattında oluşturulan glutamat eksitotoksisitenin mekanizması incelendiğinde bazı bilgiler elde edilmiştir. C6 rat glioma hücrelerinin iyonotropik glutamat reseptörleri (iGluR) eksprese ettiği gösterilmiş olmasına rağmen bu hücre hattındaki eksitotoksisiteye mekanotropik glutamat reseptörlerinin (mGluR) aracılık ettiği belirlenmiştir. İncelenen C6 hücrelerinde, glutamat ile muameleden sonra mGluR seviyelerinin azaldığı ve ölüm oranının arttığı görülmüştür. 24/48 saat sonra mGluR seviyeleri artar. C6 hücrelerinde oksidatif stresin gelişmesinden dolayı GSH (glutatyon) tükenmesi meydana gelir (Piers et al., 2012; Sun et al., 2012; Veenman et al., n.d.).

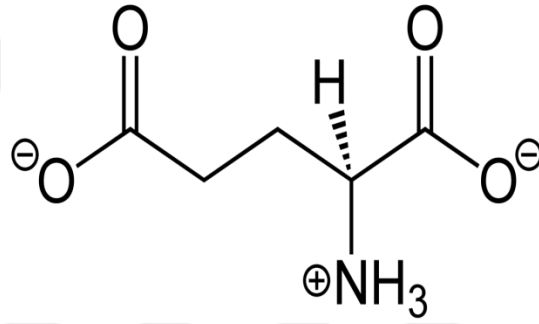
2.3. Glutamat

Glutamat esansiyel olmayan bir dikarboksilik aminoasit olup, glutaminden sentezlenmektedir (Şekil 3) (Heath & Shaw, 2002). Ayrıca Krebs döngüsü ara ürünlerinden α -ketoglutaratın indirgeyici aminasyonu ile oluşabilmektedir (nutrition & 2000, n.d.).

Glutamat hızlı uyarıcı sinapsların büyük çoğunluğunun ileticisidir. Memelilerde merkezi sinir sisteminde ve çok sayıda merkezi sinir sistemi işlevinde rol oynayan ayrıca birçok reaksiyonda hem substrat hem de ürün olarak işlev gören bir nörotransmitterdir (Conn et al., 1997). Glutamat, öğrenme ve hafıza gibi bilişsel fonksiyonlarda rol alır. Sinaptik bağlantıların yaklaşık %90'ında bulunur (Brosnan & Brosnan, 2013). Glutamat bilişsel fonksiyonlar dışında akson oluşumu, nöroplastisite, sinaptik etkinlik gibi merkezi sinir sisteminin her basamağında rol oynamaktadır (Hazell et al., 2001; M. Walker et al., n.d.).

Bunlarla birlikte önemli bir nörotoksindir. Hipoksik hasar, hipoglisemi, inme, epilepsi, depresyon ve parkinson hastalıklarında glutamat reseptörlerinin aşırı uyarımı söz konusudur. Hasar ve glutamat reseptörlerinin aşırı uyarılması arasında oldukça güçlü bir bağlantı vardır. Glutamatın nörotoksik etkisi birçok nörolojik ve psikiyatrik hastalık ile ilişkilendirilmiştir (Hynd et al., n.d.; proteins & 2013, 2013; Sapolsky ve TeachingCompany. 1996 - GoogleAkademik, n.d.).

Glutamat beyinde çoğunlukla intraselüler sıvıda bulunur. Gerekli durumlarda metabolize edilerek kullanılır. Glutamat seviyelerinin kontrol altında olması homeostazisin bozulmaması için önemlidir. Çünkü glutamat presinaptik nöronlardan salınmakta postsinaptik nöronlar ve astrositler tarafından toplanmaktadır. Bu aşamada ekstraselüler sıvının glutamat seviyesi düşük konsantrasyonlarda tutulmaya çalışılır. Eğer düşük konsantrasyonlarda tutulamazsa glutamat toksik etki oluşturacak ve homeostazis bozulmaya başlayacaktır. Bunun aksine intraselüler sıvıda glutamat metabolize edildiği ve sinaptik iletimde engel oluşturmadığı için toksik etki oluşmaz (Osen et al., 1995; Ottersen et al., n.d.; Shupliakov et al., 1993).



Şekil 3. Glutamatın Yapısı

2.3.1. Sentezi Ve Metabolizması

Memeli canlılarda çok fazla bulunan ve aminoasit yapıda olan bir nörotransmitter olan glutamat sağlıklı bireylerde beslenme ile gerekli miktarda vücuda alındığı için çoğu zaman sentezine ihtiyaç duyulmaz (Daikhin, Y. , & Yudkoff, M. 2000 - Google Akademik, n.d.).

Glutamat canlı organizmada farklı şekillerde sentezlenebilir. Bunlar;

1. Krebs (sitrik asit) döngüsünde açığa çıkan α -ketoglurattan (Şekil 4)
2. Merkezi sinir sisteminde glutaminaz enzimi tarafından glutamin- glutamat döngüsünde ürün olarak sentezlenir ("MicroRNA Expression in Rat Brain Exposed to Repeated Inescapable Shock: Differential Alterations in Learned Helplessness vs. Non-Learned Helplessness," n.d.).



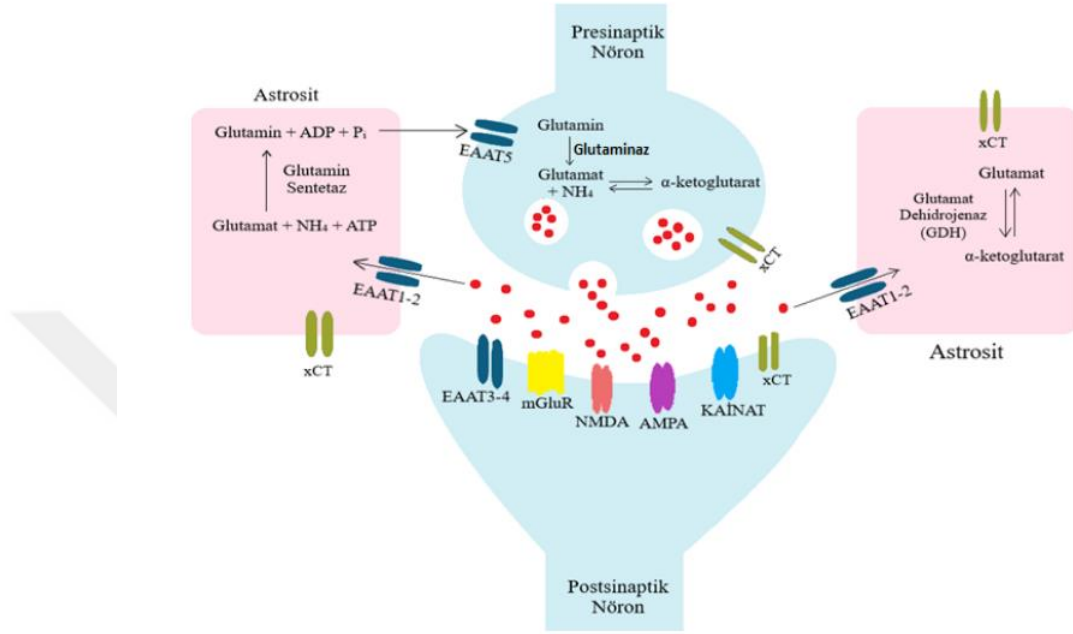
Şekil 4. Sitrik Asit(Krebs) Döngüsü

Bir diğer metabolik yolak ise N-asetil-L-aspartat-L-glutamat (NAAG)'ın astrositlerde üretilen 4 karboksipeptidaz II (GCP II) tarafından NAA ve glutamata parçalanması olayıdır (nutrition & 2000, n.d.). Glutamat krebs (sitrik asit) döngüsünde sentezlenebildiği için nonesansiyel bir aminoasittir.

Merkezi sinir sisteminde glutaminerjik nöronlar glukozdan glutamat üretemezler. Bu yüzden presinaptik nöronların ihtiyaç duyduğu glutamat glutamin-glutamat döngüsüyle sağlanır. Bu işlemde glutaminaz enzimi kullanılır. Presinaptik nöronlardan çıkan glutamat 3 farklı yolla değerlendirilir. Bunlar presinaptik nörona geri alınım, postsinaptik nörona alınım, astrosit (glial) hücelere alınım şeklindedir (Bak et al., 2006).

Glutamatın çok az bir bölümünün presinaptik ve postsinaptik nöronda yıkımı gerçekleşir büyük miktarı astrosit (glial) hücelere tarafından alınır. Bu geri alınım eksitatorik aminoasit taşıyıcısı kanallar (Excitatory Amino Acid Transporter, EAAT) vasıtasıyla gerçekleştirilir. Astrosit hücelere alınan glutamatu çevre kapillerlere göndermezler. Bunun yerine glutamatu glutamine dönüştürürler. Glutaminin nöronlara bir etkisi yoktur. Glutamat, eğer kapiller dolaşıma katılacak olursa merkezi

sinir sisteminden azot ve karbon kaybı meydana gelecektir. Üretilmiş olan glutamin yeniden glutamat üretilmesi için pre-sinaptik nöronlara aktarılır ve bu nöronlarda glutaminaz enzimi ile glutamin-glutamat dönüşümü gerçekleşir (Şekil 5) (Ganel & Rothstein, 1999).



Şekil 5. Glutamat-Glutamin Döngüsü (Glioblastoma Hücrelerinde, 2021)

Glutamat belirli taşıyıcılarla kan beyin bariyerini geçebilir. Bu sayede beyin omurilik sıvısında (BOS) glutamat miktarı belirli seviyelerde tutulur (Ganel & Rothstein, 1999). Glutamat aynı zamanda inhibitörük etki gösteren bir nörotransmitter olan GABA'nın sentezinde de öncü moleküldür ve bu olayda görevli olan enzim glutamat dekarboksilazdır (Ganel & Rothstein, 1999).

2.3.2. Glutamat Reseptörleri

Glutamat reseptörleri moleküler yapıları, elektrofizyolojik ve farmakolojik özellikleri bakımından iki ana gruba ayrılırlar. Bunlar;

1. İyonotropik Reseptörler (iGluR, Ligand kapılı iyon reseptörleri)
2. Mekanotropik Reseptörler (mGluR, G protein eşlikli reseptörler)

iGluR'lar glutamatın iyon kanallarına bağlanması özelliğine sahip reseptörlerdir. İyonotropik reseptörlerin ismi iyon geçirgenliği hücre zarındaki reseptörlerle ayarlandığı için ligand kapılı iyon reseptörü olarak da

adlandırılmaktadır. mGluR'lar ise iyon kanallarıyla hücreyi etkilemezler. Bunlar G-proteinleri yoluyla etkilerini gösterirler (Rahimli et al., 2013).

2.3.2.1. İyonotropik Reseptörler

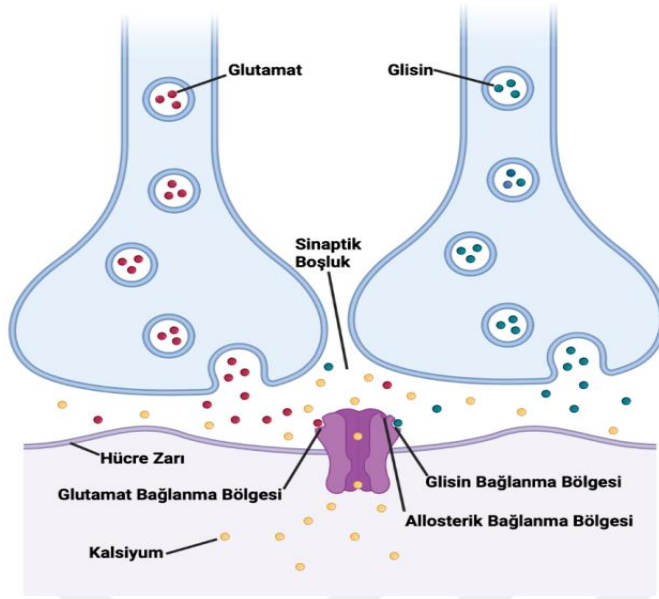
Plazma membranında yer alırlar. Reseptör alt birimlerinin farklı kombinasyonlarıyla oluşturulan bu iyon kanalları iyonların hücre içi ve dışı arasında transferini sağlarlar (Rahimli et al., 2013).

Farmakolojik özelliklerine göre iGluR'ler ikiye ayrılır. Bunlar;

1. NMDA (N-metil-D-aspartat) reseptörleri (Şekil 6)

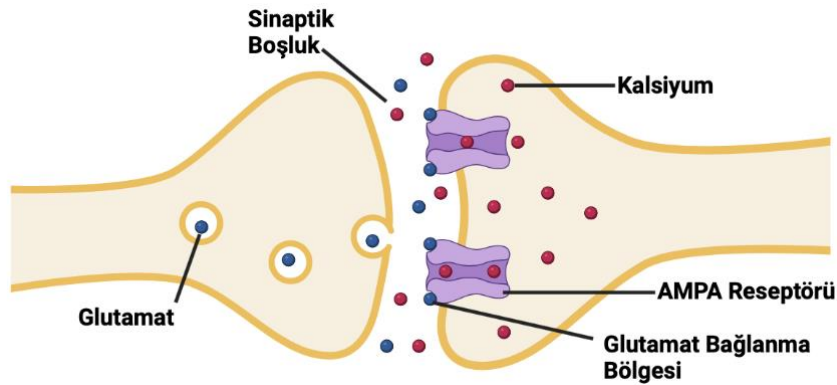
2. Non-NMDA (AMPA (Alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropiyonik asit) (Şekil 7) ve Kainat reseptörleri

NMDA reseptörleri üzerinde en fazla araştırma yapılan reseptör grubudur. Hipokampus, beyin korteksi, septum, amigdala ve striatumda yoğun olarak bulunur. NMDA reseptörleri nöronlarda post-sinaptik yerleşmiştir (Kayaalp OS, Uzbay T. (2009). Santral Sinir Sistemi... - Google Akademik, n.d.). Glutamin, Zn^{+2} , Mg^{+2} glutamat ve poliaminlere özel bağlanma alanları olan NMDA reseptörleri, aktive olduklarında hücre içi ve dışı arasındaki Ca^{+2} , Na^{+} , K^{+} iyonlarının değişimleri gerçekleştirirler (Rose et al., 2018). Glutamat bağlayıcı NMDA2 alt ünitesi ile glisin bağlayıcı NMDA1 alt ünitesinden oluşan protein kompleksi Mg^{+2} bağlanması ile bloke olur. Aynı anda glutamat ve Mg^{+2} bağlanması durumunda kanal aktive olur ve postsinaptik nöronlara Ca^{+2} akışı sağlanır. Artan hücre içi Ca^{+2} , Ca^{+2} kalmodulin bağımlı protein kinaz II (CaMKII) gibi çeşitli enzimleri aktifleştirir ve sinaptik iletimde değişikliklere yol açar (Suwanjang et al., 2013).



Şekil 6. NMDA Reseptörleri (NMDA Reseptörü - NMDA Reseptörü - Vikipedi, n.d.)

AMPA reseptörleri dört alt birimden (GluR1, GluR2, GluR3, GluR4), kainat reseptörleri ise beş alt birimden (GluR5, GluR6, GluR7, KA1, KA2) oluşur. AMPA ve kainat reseptörleri Ca^{+2} ve Na^{+} iyonlarının hücre içi ve hücre dışı sıvılar arasındaki geçişi ile glutamat taşınmasına öncülük eden reseptörlerdir (Sommer & Seeburg, 1992). Kainat ve AMPA reseptörleri yalnızca glutamat ve bunların spesifik agonistleri ile etkileşime girer ve ilişkili kanalları Na^{+} ve K^{+} 'ya Ca^{+2} 'dan daha geçirgendir (Kostandy, 2012).



Şekil 7. AMPA Reseptörü (AMPA Reseptörü - Vikipedi, n.d.)

2.3.2.2. Metabotropik Reseptörler

Bu gruptaki reseptörler iyon kanallarına sahip değildirler. Membranda bulunan G-proteinine bağlanarak ikincil mesajcı haber sistemini aktive ederler (Pin et al., n.d.). Presinaptik inhibisyon, hızlı eksitator sinaptik geçiş ve nöron eksitabilitesinin düzenlenmesinde görevlidirler (Bordi et al., n.d.). Bütün glutamat reseptörleri gibi metabotropik reseptörlerde glutamat ve diğer eksitatorik aminoasitleri (EAA) bağlama yeteneğine sahiptir. Serebral korteks, serebellum, hipokampus gibi beyin çeşitli bölgelerinde ve otonom sinir sisteminde hem presinaptik hem postsinaptik alanda yer alırlar ve ağrının algılanması, bellek gelişimi, hafıza, öğrenme gibi çok sayıda görev üstlenirler (Bates et al., n.d.).

Sekiz farklı mGluR tipi vardır (mGluR1-8) ve yapılarına ve fizyolojik aktivitelerine göre üç ana gruba ayrılır (grup I, II ve III) (Özdemir et al., 2016). Grup I; mGluR1 ve mGluR5 reseptörlerini içerirken, grup II; mGluR3 ve mGluR2 reseptörlerini, grup III ise; mGluR4, mGluR6, mGluR7 ve mGluR8 reseptörlerini içermektedir. Grup I, mGluR'nin fosfolipaz C'yi aktive ederek siklik adenosin monofosfat (cAMP) oluşumunu tetiklediği; grup II ve III mGluR'nin ise, adenilat siklazı ve cAMP'ı inhibe ettiği yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (Hammond et al., 2014).

2.3.3. Glutamat Taşıyıcıları

Ekstraselüler ortamda yüksek konsantrasyonda bulunan glutamat, toksik etki oluşturacağı için ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Presinaptik nöronlardan ekstraselüler ortama salınan glutamata postsinaptik nöronlar ve astrosit (glia) hücreleri tarafından alınmasını sağlayacak protein yapıda çok sayıda glutamat taşıyıcı bulunmaktadır. Glutamat taşıyıcıları, glutamata temelde bir zar boyunca transfer olmasını sağlayan kanallardır. Astrosit (glia) hücre zarı veya intraselüler vezikül zarı bunlardan ikisidir ("Structure, Function and Regulation of Glutamate Transporters," 2020)

Glutamat taşıyıcıları;

1. Eksitator amino asit taşıyıcı (EAAT) ailesi

2. Veziküler glutamat taşıyıcı (VGLUT) ailesi olarak ikiye ayrılır.

Beyinde EAAT ailesinin temel görevi glutamata sinaptik boşluktan

uzaklaştırarak nöronal ve glial hücreler tarafından geri alınımını sağlamaktır. VGLUT ailesinin temel görevi ise sitoplazmadan veziküllere glutamat geçişini sağlamaktır. Glutamat taşıyıcıları, glutamat dışında aspartat ve diğer glutaminerjik maddelerin taşınımından sorumludur. Beyin dışında da birçok farklı doku da bulunurlar. Bu dokular da glutamat ve glutaminerjik maddelerin fizyolojik etkilerinden sorumludurlar. Bu dokuların bazıları kalp, karaciğer, kemik, testis ve pankreas adacık hücreleridir (Ganel & Rothstein, 1999).

EAAT'ler zar yüzeyinde bulunan çoğunlukla Na⁺ bağımlı sekonder aktif transport sağlayan kanallardır (Ganel & Rothstein, 1999). Bu taşıyıcılar ekstraselüler glutamat konsantrasyonunu düzenlemekte rol oynarlar (Zerangue et al., n.d.). Bu kanallar ile sinaptik aralığa bırakılan glutamat, kısa bir sürede sinaptik aralıktan uzaklaştırılır. Bu sayede sinyal iletiminin sonlanmasına yardımcı olurlar (Zerangue et al., n.d.). Bu kanalların çalışmasında azalma meydana gelirse sinaptik aralıkta biriken glutamat toksik etki oluşturur. Postsinaptik sinapslara gönderilen sürekli uyarılar ve beraberinde meydana gelen biyokimyasal olaylar sonucu eksitoksite meydana gelir (Zou et al., n.d.) Ayrıca bu kanallar glutamatın tekrar sentezine ve kullanılmasına olanak sağlamaktadır.

2.3.3.1. Glutamat Taşıyıcısı EAAT Ailesi

Glutamat taşıyıcı ailelerinden biri olan EAAT ailesi Na⁺ iyonlarının hücre içi ve hücre dışında elektrokimyasal geçişine bağlı olarak çalışsa da K⁺ ve H⁺ iyonlarının konsantrasyonlarına da bağlılık gösterirler. Bu sebeple EAAT ailesi “sodyum potasyum bağımlı glutamat taşıyıcıları” olarak da adlandırılırlar (“Structure, Function and Regulation of Glutamate Transporters,” 2020). EAAT'lerin farklı alt tipleri bulunmaktadır. Bu tipler arasında sodyum bağımlı çalışanlar yüksek afiniteli glutamat taşıyıcılarıdır. EAAT'ler 1 molekül glutamat ve H (hidrojen) hücre içine alırken, 3 molekül Na⁺ ve 1 molekül K⁺ molekülünü hücre dışına çıkarırlar (Principles of Neural Science, 2000).

İnsan hücrelerinde EAAT ailesinin 5 alt tipi mevcuttur. Bunlar;

1. EAAT 1: Glial (astrosit) hücrelerin yüzeyinde bulunurlar.
2. EAAT 2 (diğer adı GLT1 (Glial Glutamat Transporter)) : Glial hücrelerin yüzeyinde ve hipokampal cornu ammanis 3 (CA3) nöronlarının akson

terminallerinde bulunurlar. Glutamat geri alınımının %90'ından sorumludur.

3. EAAT 3: Sadece nöronlarda bulunurlar.

4. EAAT 4: Sadece nöronlarda bulunurlar.

5. EAAT 5: Retinadaki bipolar nöronlarda ve fotoreseptörlerde bulunurlar.

(Arriza et al., 1997; Rothstein et al., n.d.)

2.3.3.2. Glutamat Taşıyıcısı VGLUT Ailesi

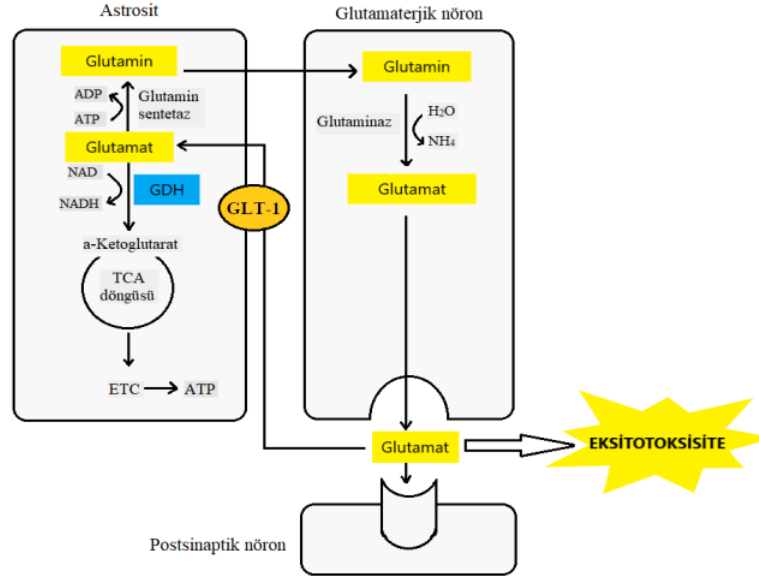
Bu taşıyıcıların bilinen temel görevi hücre içine alınan glutamatın sinaptik veziküllere taşınmasını sağlamak ve sinaptik boşluğa salınması için depolamaktır. Veziküler glutamat taşıyıcılarının VGLUT1, VGLUT2, VGLUT3 olmak üzere 3 alt tipi bulunmaktadır (Naito et al., n.d.). Glutamata olan geçirgenlikleri EAAT ailesine göre daha düşüktür (Manev et al., n.d.). VGLUT ailesi arasında tüm yönleriyle en fazla tanınan VGLUT3 alt birimidir (Gras et al., 2002). VGLUT3 alt birimi işitme sistemindeki hızlı glutaminerjik eksitasyonda görev almaktadır (Ruel et al., n.d.). Ayrıca ağrı iletimi, anksiyete, uyku döngüsü, seksüel davranışlar, vücut ısısının ayarlanması gibi davranışsal ve fizyolojik görevlerinin olduğu bilim insanlarınca düşünülmektedir (Muroyama et al., 2004).

2.4. Glutamat Ve Eksitotoksitite

Eksitotoksitite; sinaptik boşluğa aşırı salınımı sonucu biriken glutamatın taşıyıcı kanallarla geri alınımının gerçekleştirilememesi nedeniyle oluşan homeostatik denge bozukluğudur. Genellikle hücre ölümüyle sonlanır (Szatkowski et al., n.d.). Bu homeostatik dengenin korunması için Ca^{+2} çok önemlidir. Ca^{+2} seviyelerinin hücre içi ve dışında dengede tutulması, hücre içi ve dışı transportunun sağlanması, depolanması, yerleşimi, kontrolünün sağlanması gerekmektedir. Nöronal hücrelerde eksitotoksitite normal olmayan düzeyde Ca^{+2} transportuna neden olmaktadır. Bu durum proteaz, lipaz, nitrik oksit sentaz (NOS), reaktif oksijen türlerinde (ROT) artışa sebep olup sonuç ise hücre ölümü olmaktadır. Ayrıca AMPA reseptörlerinin GluR1 alt biriminin aktivite artışı inflamasyona sebep olmaktadır (Liu et al., 2019).

Glutamat sinaptik veziküllerde ya da nöron hücresi sitoplazmasında depolanır. Enerjinin azaldığı ya da üretilmediği durumlarda (anoksi, iskemi vb.) glutamat hücre dışına salınır. Bu sebeple ATP üretilmeyen durumlarda glutamatın hücre

dışında birikimi sonucu eksitoksite oluşabilmektedir (Şekil 8).



Şekil 8. Glutamat Eksitotoksitesisi (Glioblastoma Hücrelerinde, 2021)

2.5. Glutamat Ve Oksidatif Stres

Yapılan in vitro çalışmalar, oksijen radikalleri oluşumunun glutamat uyarılması ile ilişkili olan nöronlarla etkileştiklerini göstermiştir. Oluşan serbest radikaller, hem glutamat salınımına hem de geri alınımının baskılanmasına yol açarlar. Hüresel ve mitokondriyal serbest radikallerin seviyesinde artış hücre ölümüne neden olur. Ortamda artmış olan serbest radikaller hızlı bir Ca^{+2} akışına, hücre içi Ca^{+2} aşırı yüklenmesine ve mitokondriyal zar depolarizasyonuna neden olur. Bu olay daha fazla serbest radikal üretimine ve sonunda nöronal hücre ölümünü tetikleyen ikincil haberci / enzim aktivasyonuna yol açar (Fleury et al., n.d.; Okuyama, 1992).

Hücre ölümünü indükleyen faktörün mitokondriden sitozole salınması ve translokasyonu, Bax ve Bcl-2'nin aşağı ve yukarı regülasyonu, sitokrom c'nin salınması, kaspaz-3'ün aktivasyonu ve poli (ADP-riboz) polimeraz 1'in (PARP-1) bölünmesi dahil olmak üzere hücre ölümüyle ilgili sonraki olayları başlatır. Merkezi sinir sistemi düşük antioksidan enzim aktivitesi nedeniyle dejenerasyona ve oksidatif strese karşı çok duyarlı olmasından dolayı kaçınılmaz olarak nöronal hücre ölümü gerçekleşir (Ha et al., n.d.).

2.6. JAK/STAT Yolu

JAK/STAT yolu en iyi çözümlendirilmiş sinyal iletim yollarından biridir. Sitokinler inflamasyon ve doku yıkımının önemli araçlarıdır. İnterlökin-6 (IL-6), interferonlar (IFN'ler), granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) ve ortak gama zincir sitokin ailesi gibi çeşitli sitokinler, Janus kinaz (JAK) ve sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon (STAT) yolunun aktivatörü aracılığıyla etki gösterir. JAK-STAT yolları dört JAK kinazdan (JAK1-3 ve tirozin kinaz 2 (TYK2)) ve yedi sinyal transdüserinden ve transkripsiyon aktivatöründen (STAT1-6, homologlar STAT5A ve STAT5B dahil) oluşur. Sinyal kaskadı, trans-fosforilasyon yoluyla JAK aktivasyonunu mümkün kılan bir sitokinin reseptörüne bağlanmasıyla başlatılır. Daha sonra JAK'lar, dimerize olan reseptörü ve STAT'ları fosforile eder ve hedef genlerin ekspresyonunu düzenlemek için çekirdeğe yer değiştirir. Her sitokin reseptörü, JAK kinazların spesifik bir kombinasyonunu kullanır. IL-6, JAK1 ve JAK2/TYK2 yoluyla sinyal verir ve ortak gama zinciri sitokinleri JAK1 ve JAK3 aracılığıyla sinyal verir. JAK-STAT sinyal yolu sıkı bir düzenleme altındadır; sitokin sinyalleme (SOCS) ailesi SOCS1-3 baskılayıcı proteinleri ve Src homoloji 2 (SH2) içeren protein (CIS1) sitokinle indüklenebilir (Palmroth et al., 2021). JAK1, JAK3 ve biraz daha az oranda JAK2'yi inhibe eden tofacitinib'in sitokin sinyalini ve farklı bağışıklık hücrelerinin ve sinoviyal fibroblastların efektör fonksiyonlarını in vitro ve artritli hayvan modellerinde inhibe ettiği gösterilmiştir. Ancak tofacitinib'in RA hastalarında JAK-STAT yollarının aktivitesi üzerindeki in vivo etkilerine ilişkin bilgi şu anda eksiktir ve in vitro çalışmalara dayanan sonuçlardan farklı olabilir (Palmroth et al., 2021).

2.6.1. Jak/Stat Aktivasyon Mekanizması

JAK/STAT aktivasyon mekanizması bilinen modelinde sitokin reseptör bağlantılarıyla ilişkili JAK kombinasyonunu tetikler bu da sırasıyla fosforilize ve dimerize olan, spesifik dizileri bağlamak için çekirdeğe hareket eden bir STAT'ın alımına izin vermek için reseptör sitoplazmik alanını tutar ve gen ekspresyonunu başlatır. Sitokin reseptörlerinin sitoplazma alanları membrana yakın bulunan JAK bağlanma bölgeleriyle JAK'larla birleşir (Behrmann et al., n.d.). Bunların yanı sıra reseptörlerin hücre yüzeyinde taşınmasında JAK'ların rolü, JAK reseptör

etkileşiminin temeli, reseptör hücre içi alanlarının sitokin bağlanması üzerine nasıl yeniden yönlendiği ve fosforilasyon modifikasyonunu almak için JAK ile fiziksel olarak nasıl temas kurduğu hakkında aydınlatıcı bir bilgi yoktur.

Reseptörün JAK aracılı fosforilasyonu, STAT'lerin (SH2) alanları için bağlanma bölgeleri yaratır. STAT alımını tirozin ve bazı durumlarda çekirdeğe geçişe yol açan anahtar kalıntılar (JAK'ler ve diğer yakından ilişkili kinazlar tarafından) üzerindeki fosforilasyonu takip eder (J. O'Shea et al., n.d.). Belirli bir reseptör için bir SH2 15 alanının tercih edilmesinin ayrıntılı yapısal temeli henüz anlaşılmamıştır ve diğer JAK olmayan kinazların reseptörlere nasıl alındığı ve STAT'leri fosforile ettiği konusunda da çok az bilgi bulunmaktadır.

2.6.2. Jak (Janus Kinaz) İnhibitörleri

JAK ailesi JAK1, JAK2, JAK3 ve tirozin kinazdan (TYK2) oluşur. Bu sitoplazmik protein ailesinden tirozin kinazların çeşitli pro-inflamatuar sitokinlerin transdüksiyon yolunda önemli bir rolü vardır. İnterlökin (IL) 2, 4, 7,9, 13, 15, 17, 21 ve 23'ün yanı sıra interferonlar ve büyüme faktörleri ve bağlanmaya JAK1 ve JAK3 aracılık eder. Sitokinler hücre yüzeyine bağlandığında ligand reseptörleri dimerize olur, sonuçta JAK moleküllerinin fosforilasyonu sağlanır. Bu daha sonra hücre içi sinyal iletimini ve transkripsiyonunu tetikler. JAK inhibitörleri fosforilasyonu engeller. Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatör proteini (STAT) böylece sentezini azaltır. Pro-inflamatuar proteinler bu geniş spektrumlu anti-inflamatuar aktivitenin yanı sıra, JAK inhibitörleri, diğerleriyle karşılaştırıldığında çeşitli avantajlar sunar.

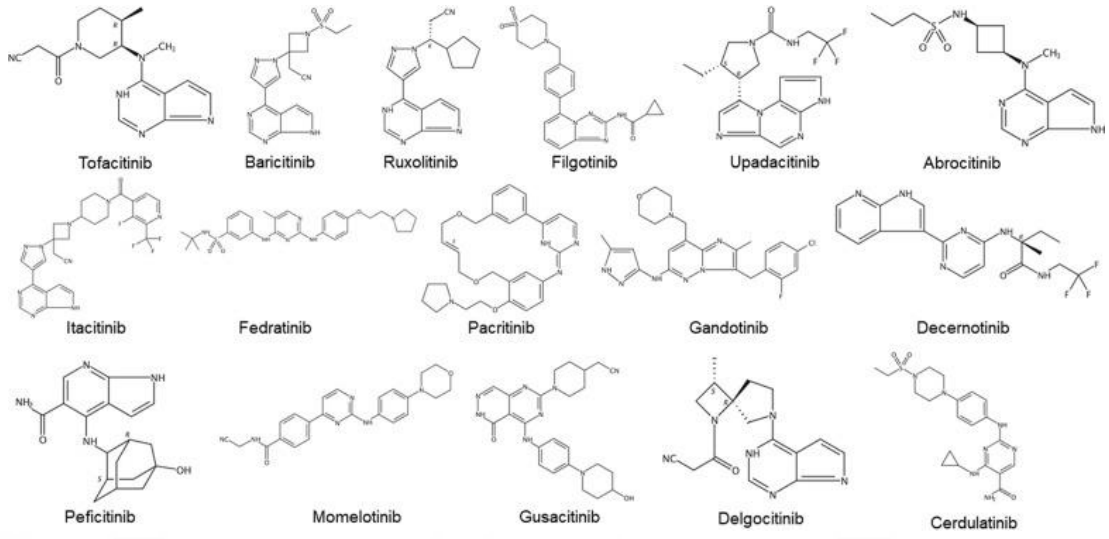
Monoklonal antikolar:

(a) oral uygulama

(b) öngörülebilir farmakokinetik mekanizması azaltılmış plazma yarılanma ömrü, hızlı etki başlangıcı ve hızlı temizlenme olarak kendini gösterir (ciddi enfeksiyon ve ameliyat ihtiyacı durumlarında faydalıdır)

(c) hücre içini hedef alır

(d) immünojenite eksikliği (Magro & Estevinho, 2020)



Şekil 9.JAK İnhibitörleri (Hu et al., 2021)

2.7.Tofacitinib

Tofacitinib, Janus kinazların (JAK) oral inhibitörüdür. Romatoid artrit tedavisi için onaylıdır, erişkinlerde psoriatik artrit ve ülseratif kolit tedavilerinde de kullanılır (Şentürk, 2022). Tofacitinib, JAK1 ve JAK3'ün güçlü bir inhibitörü olarak aynı zamanda şunları gösterir:

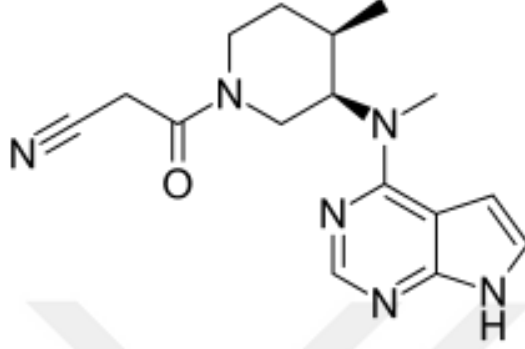
1. JAK2 ve tirozin kinaz (Tyk2)'e karşı kısmi aktivite gösterir ve patogenezinde rol oynayan birçok faktörü etkiler
2. Proinflamatuvar mediatörlerin salgısını azaltırken JAK1 yoluyla proliferasyonu ve aktivasyonu da baskılar.
3. Tofacitinib düşük dozlarda bağışıklık sistemini modüle eder.
4. JAK1 ve JAK3 yoluyla ise yüksek dozlarda etkiler.
5. JAK2 aracılığıyla eritropoietinin baskılanmasıyla hematopoez sinyalizyonunu sağlar. (Şentürk, 2022)

Tofacitinib bugüne kadar onaylanmış benzersiz bir JAK inhibitörüdür. Her ne kadar bu küçük molekül JAK3'e özgü bir inhibitör olacak şekilde geliştirildiyse de aynı zamanda bir panJAK inhibitörü olduğundan JAK1 ve JAK2'ye de afinitesi vardır (Magro & Estevinho, 2020).

2.7.1. Tofacitinib Kimyası

TOFA, piperidin içeren bir baş grubu ve bir siyanoasetamid yan zinciri olan

pirolopirimidin bazlı bir moleküldür. Biyolojik DMARD'lardan farklı olarak TOFA, oral doza izin veren düşük moleküler ağırlıklı bir kimyasal bileşiktir (Vaddi & Luchi, 2012). Kimyasal adı 3-(3R,4R)-4- metil-3- [metil (7H-pirrolo[2,3-d] pirimidin-4-il) amino] piperidin-1-il}-3 oksopropannitril`dir (Şekil 10) (Flanagan et al., 2010)



Şekil 10.Tofacitinib'in Yapısı

2.7.2. Tofacitinib'in Farmakodinamiği

Tofacitinib diğer kinazlar üzerinde neredeyse hiçbir etkisi olmaması sebebiyle JAK ailesinin seçici bir inhibitörü olarak kabul edilir. İnsanlar üzerinde JAK'lara karşı nanomolar etki göstermiştir ve güçlü bir şekilde JAK3 ve JAK1'i ve daha az bir ölçüde JAK2'yi inhibe etmiştir. JAK3, IL2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 ve IL-21 için ortak bir reseptör alt birimi olan ortak IL-2R γ zincirine (g-zinciri) yapısal olarak bağlanır. Bu nedenle JAK3, öncelikle immün yanıtlar için önemlidir. Tersine, JAK1 ve JAK2, konak savunması ve hematopoezden büyüme ve nöral gelişime kadar değişen rollerle geniş işlevlere sahiptir (J. J. O'Shea et al., 2013; Vaddi & Luchi, 2012).

JAK1, G zinciri sitokinleri, IL-6 ailesi, IL-10, IL-13, IL-22, granülosit koloni uyarıcı faktör ve interferonlar (INF'ler) ile ilişkilidir (J. J. O'Shea et al., 2013).

Tofacitinib, romatoid artrit (RA) patogenezinde önemli bir rol oynayan çoklu sitokinlerle etkileşime girer (Vaddi & Luchi, 2012). Bu bulgularla uyumlu olarak, tofacitinib, RA'nın hayvan modellerinde enflamasyon ve eklem hasarında doza bağlı olarak önemli bir azalmaya yol açmıştır (Ghoreschi et al., n.d.; Labranche et al., 2012; Milici et al., 2008). Fare 19 kollajeninin neden olduğu artritteki etkinlik hem JAK1 hem de JAK3 sinyal yollarının inhibisyonu ile koreledir, bu da tofacitinib'in

anti-inflamatuar aktivitesi için sadece JAK1 ve JAK3 inhibisyonunun gerekli olduğunu düşündürmüştür (Ghoreschi et al., n.d.).

Sıçan adjuvanının neden olduğu artritte, tofacitinib, osteoklast aracılı artritlik eklem yapısal hasarını baskılamış: bu etki, insan osteoklastları ve T lenfositleri kullanılarak daha fazla araştırıldığında, nükleer faktör-kB ligand (RANKL) üretiminin azalmış reseptör aktivatörüne ikincil olarak ortaya çıkmıştır (Labranche et al., 2012).

İlginç bir şekilde, JAK-STAT yolunun, sağlıklı deneklerin ve osteoartrit veya spondiloartriti olan hastaların sinoviyumu ile karşılaştırıldığında aktif RA'lı hastaların sinoviyumunda yüksek oranda eksprese edildiği bulunmuştur (R. Walker et al., 2006). Aktif RA'lı hastaların sinoviyum ve periferik kanından kaynaklanan aktive CD4+ T hücrelerinin tofacitinib tedavisi, doza bağımlı bir şekilde IL-17 ve INF-g üretimini ve bu hücrelerin proliferasyonunu doğrudan baskılamıştır (Maeshima et al., 2012). Ayrıca tofacitinib, CD4+ T hücrelerinin inhibisyonu yoluyla dolaylı bir şekilde sinovyal fibroblastlar tarafından IL-6 üretimini ve CD4+ monositleri tarafından IL-8 üretimini inhibe etmiştir (Maeshima et al., 2012). Başka bir deyişle tofacitinib'in esas olarak CD4+ T hücreleri üzerinde etki gösterdiği ve ardından hücre proliferasyonunu ve inflamatuvar sitokinlerin üretimini baskıladığı görülmüştür (Maeshima et al., 2012).

Ayrıca tofacitinib, RA sinovyal dokusundan izole edilen TNF ile uyarılan fibroblast benzeri sinoviyositler tarafından lenfosit çeken birkaç kemokinin ekspresyonunu inhibe ederek, T hücrelerinin ve diğer infiltre lökositlerin toplanmasını sınırlandırmıştır (Rosengren et al., n.d.).

Son olarak tofacitinib diğer bağışıklık hücrelerini, özellikle de JAK'ları eksprese eden ve RA patogeneğinde rol oynayan B hücreleri ve mast hücrelerini hedef alabilir (Maeshima et al., 2012). Birlikte ele alındığında, bu veriler tofacitinib'in RA'lı hastalarda sinovyal inflamasyonu azaltma ve eklemlerin yapısal hasarını önleme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Öte yandan, JAK'ların inhibisyonu, enfeksiyonlar, anemi ve nötropeni ve lipid düzeylerindeki artışlar dahil olmak üzere ilaca bağlı AE'lerin olası bir nedenidir (J. J. O'Shea et al., 2013).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Malzeme Listesi

Tablo 1. Çalışmada Kullanılan Malzemelerin Listesi

| | Malzemeler |
|----|---------------------------------------|
| 1 | C6 (Sıçan Beyni Glioma Hücre Hattı) |
| 2 | Tofacitinib (5 mg) |
| 3 | Flask 25 cm ³ |
| 4 | 15 ml'lik falkon |
| 5 | 200 µl'lik steril pipet ucu |
| 6 | 5 ml'lik steril serolojik pipet |
| 7 | XTT hücre proliferasyon ölçüm kiti |
| 8 | Tnf-α Elisa Kiti |
| 9 | Il-1β Elisa Kiti |
| 10 | Total Antioksidan Ölçümü Assay Kiti |
| 11 | Total Oksidan Ölçümü Assay Kiti |
| 12 | 2 ml'lik ependorf |
| 13 | 96'lık Plate |

3.2.Kullanılan Cihazlar

Tablo 2. Çalışmada Kullanılan Cihazların Listesi

| | Cihaz Adı |
|----|----------------------------------|
| 1 | Vorteks |
| 2 | İnkübatör |
| 3 | Su Banyosu |
| 4 | Santrifüj |
| 5 | Laminar Flow Hücre Kültür Kabini |
| 6 | Buzdolabı (+4 °C ve -20 °C) |
| 7 | Derin Dondurucu (-86 °C) |
| 8 | Hassas Terazi |
| 9 | Inverted Mikroskop |
| 10 | Mikroplak Okuyucu |

3.3. Kimyasal Malzemeler

Tablo 3. Kullanılan Kimyasal Malzemeler Ve Alınan Yerlerin Listesi

| Kimyasal Malzeme | Alınan Marka ve Adı |
|------------------------------------|--------------------------------------|
| Dulbecco'nun Modifiye Eagle (DMEM) | Biological Industries, İsrail |
| Fetal Sığır Serum (FBS) | Sigma Aldrich Co., St Louis, MO, ABD |
| L-Glutamin | Sigma Aldrich Co., St Louis, MO, ABD |
| Penisilin/Streptomisin | Sigma Aldrich Co., St Louis, MO, ABD |
| Fosfat Tampon Çözeltisi | Thermo Fisher Scientific, ABD |
| Tofacitinib | Sigma Aldrich Co., St Louis, MO, ABD |
| Dimetil Sülfoksit (DMSO) | Sigma Aldrich Co., St Louis, MO, ABD |
| Tripsin | Lonza, B-4800 Verviers, Belçika |

3.4. Hücre Kültürü

Hücre kültürü çalışmaları Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Merkezi (CÜTFAM) laboratuvarlarında yapılmıştır. Proje desteği Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (Proje no: T-2023-992) tarafından sağlanmıştır.

C6 Glioma hücre hatları American Type Culture Collection (ATCC)' dan elde edilmiştir. Hücreler; 25 cm² 'lik flasklarda, % 10 Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma Aldrich Co, St Louis, MO, USA), %1 l-glutamin (Sigma-Aldrich Co, St Louis, MO, ABD) ve % 1 penisilin/streptomisin (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, ABD) içeren Dulbecco'nun modifiye Eagle ortamında (DMEM:F12) (HyClone, Logan, UT, USA) (Thermo Fisher Scientific, Altrincham, UK) kültürlenmiştir. Hücre yoğunluğu yaklaşık %80-90'a ulaşana kadar 37°C'de sıcaklıkta %5 CO₂ ile nemlendirilmiş ortamda inkübe edilmiştir.

C6 glioma hücrelerinde glutamat toksitesi için önceki çalışmalarda belirlenen 10 mM doz ve 24 saat inkübasyon süresi kullanılmıştır. Tofacitinib için kullanılacak dozlar: 12,5; 25; 50 ve 100 nM olarak belirlenmiştir ("Impact of Tofacitinib Treatment on Human B-Cells in Vitro and in Vivo," n.d.).

3.5.Hücre Süpernatantlarının Hazırlanması

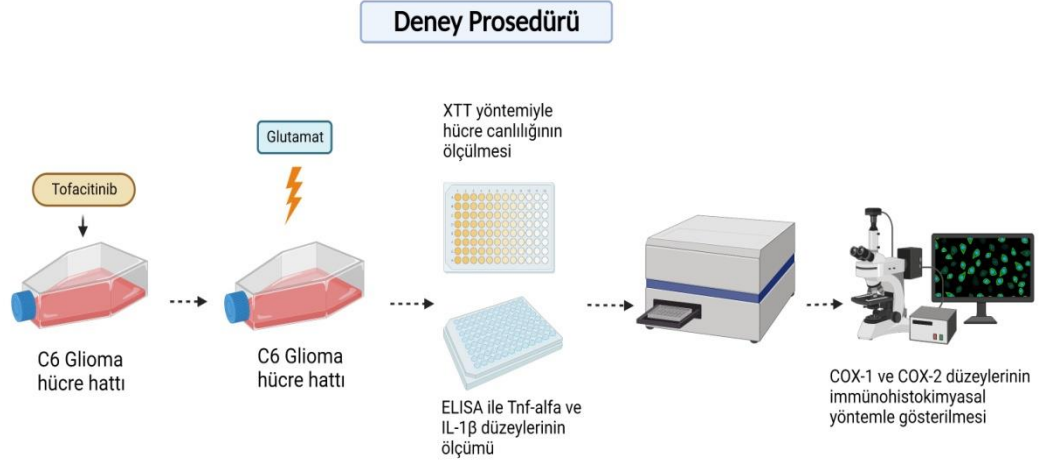
Hücreler 4 ayrı 25 cm² 'lik flaska ekildi ve istenilen yoğunluğa gelene kadar takip edildi. Flaska ekilen hücreler gruplara ayrıldı.

Gruplar:

1. Kontrol Grubu
2. Glutamat (10 mM)
3. Tofacitinib (100 nM)
4. Tofacitinib + Glutamat

Uygulama Prosedürü:

1. Kontrol grubuna ve glutamat grubuna 2,5 ml şeffaf DMEM eklendi.
2. Tofacitinib (100 nM) grubuna ve Tofacitinib + Glutamat grubuna 2,5 ml Tofacitinib eklendi.
3. Bütün gruplar 1 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra kontrol ve Tofacitinib grubuna 2,5 ml şeffaf DMEM eklendi.
4. Glutamat ve Tofacitinib+Glutamat grubuna 2,5 ml glutamat eklendi. Bir gün inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonrasında tüm grupların besi yerleri ayrı ayrı alınarak 15 ml'lik 4 ayrı falkona konuldu. Flaskta kalan hücreler için 1,5 ml tripsin eklenerek hücreler kaldırıldı ve kalkan hücrelerde falkonun üzerine eklendi.
6. Falkonlar 900 rpm'da 5 dk santrifüj edildi. Sonrasında üst faz atıldı.
7. Elde edilen pellete 10⁶ hücre/ml formülü baz alınarak 1ml PBS eklendi.
8. Çözdüğümüz hücreler her falkon ayrı ependorf olacak şekilde ependorflara eklendi.
9. Hücrelere üç kez donma-çözülme yapılarak hasar verildi. Hücreler +4°C'lik sıcaklıkta 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve hücre süpernatantları toplandı.



Şekil 11. Deney prosedürü

3.6.İlaç Tedavisi

Tofacitinib (Abcam, USA) tarafından sağlanmıştır. Stok çözeltiler dimetil sülfoksit (DMSO) içinde hazırlanarak -20 °C'de saklandı. İlaçlar her deneyden önce taze mediumda seyreltildi ve nihai DMSO konsantrasyonları % 0,1'den daha azdı.

3.7.Hücre Canlılığı

Tofacitinib'in hücre canlılığı üzerine etkisi XTT (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide) (Roche Diagnostic, MA, USA) testi kullanılarak belirlenmiştir.

Yöntem, metabolik olarak aktif olan hücrelerin bir tetrazolyum tuzu olan XTT'yi turuncu formazan bileşenlerine dönüştürmeleri esasına dayanmaktadır. Oluşan boya suda çözünebilir özelliktedir ve boya yoğunluğu bir spektrofotometre yardımıyla verilen dalga boylarında okutulabilmektedir. Boya yoğunluğu (turuncu renk), metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile doğru orantılıdır.

XTT testi aşamaları şu şekildedir;

1. Planlamalar 4 grup şeklinde yapıldı. Bunlar: Kontrol Grubu, Glutamat Grubu, Tofacitinib Grubu ve Glutamat+Tofacitinib Grubu. Her bir grup ve tofacitinib'in farklı dozları için 3 tekrarlı şekilde kuyucuklara ekim yapıldı.

2. Eksitotoksitite için Hücreler 96 kuyucuklu plakaya, 100-µL DMEM'de kuyucuk başına 1×10^4 hücre yoğunluğunda ekildi.

3. Hücreler 24 saat inkübe edildi. 24 saat sonunda besi yeri uzaklaştırıldı.

Ardından kuyucuklar phosphate buffer solution (PBS) (Cytiva HyClone, ABD) ile yıkandı. PBS uzaklaştırıldı.

4. Tofacitinib DMSO içinde çözdürülerek şeffaf DMEM ile farklı konsantrasyonlarda (12,5; 25; 50; 100 nM) olacak şekilde Tofacitinib ve Tofacitinib+Glutamat grubuna uygulandı. Kontrol Grubu ve Glutamat Grubuna şeffaf DMEM eklendi. Her kuyucuğa 50 µL olacak şekilde uygulama yapıldı. Hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı.

5. Bir saat sonra Glutamat Grubu ile Glutamat + Tofacitinib Grubuna 10 mM glutamat yoğunluğu bulunan DMEM uygulandı. Kontrol Grubu ve Tofacitinib Grubuna şeffaf DMEM uygulandı. Her kuyucukta toplam 100 µL olacak şekilde uygulama yapıldı. Hücreler 24 saat tekrar inkübasyonda bırakıldı.

6. İnkübasyon sonrası yine besi yeri uzaklaştırıldı ve kuyucuklar PBS (Phosphate buffered saline) ile yıkandı ve PBS uzaklaştırıldı.

7. Her kuyucuğa 100 µL şeffaf DMEM ve 50 µL XTT solüsyon karışımı eklendi ve 4 saat 37°C'de inkübe edildi.

8. Son olarak plakaların absorbans değeri, 450 nm'de ELISA mikro plaka okuyucu (Thermo Fisher Scientific, Altrincham, UK) kullanılarak saptandı.

9. Kontrol grubunun hücre canlılık oranı %100 olarak kabul edilip % Hücre canlılık = (Konsantrasyon O.D./Kontrol O.D.) X 100 formülünden yararlanarak hesaplandı.

3.8. TNF- α ve IL-1 β Ölçümleri

Hücrelere işlem sonrası tofacitinib'in proinflamatuvar sitokinler üzerine etkilerini değerlendirmek için TNF- α , IL-1 β Her grup için ticari kitler kullanıldı. ELİSA ticari ölçüm kitleri kullanılmıştır. Uygulanan prosedür üretici firmanın

Ölçüm Basamakları:

1-Kitin içerisinde yer alan standart solüsyon çıkarıldı. İçerdiği madde miktarını bildiğimiz bu dilüsyon solüsyonunu ependorfların içine her seferinde madde miktarı bir öncekinin yarısı olacak şekilde 5 kez dilüe edildi. Böylelikle standartlar oluşturuldu.

2-Kitin içinde bulunan 96' lık plakanın içerisindeki ilk kuyucuk kör olarak kullanılarak ikinci kuyucuktan itibaren hazırlanmış olan standart solüsyon 50 µl

olacak şekilde farklı kuyucuklara konuldu. Bu kuyucuklara hücre süpernatantlarından da 50 µl eklendi. Hücre süpernatantları ve standart solüsyonların üzerine 10 µl antikor solüsyonu konuldu. Bundan sonra bütün kuyucuklara 50 µl streptavidin-HRP solüsyonu eklendi. Sonrasında plate 60 dakika 37 °C’de inkübasyona bırakıldı.

3-Kitin içinde yer alan 30X olan yıkama solüsyonu, distile su ile 1X olacak şekilde dilüe edilerek yıkama işlemi için hazırlandı.

4-İnkübasyondan sonra 1X yıkama solüsyonuyla plaka 3 defa yıkandı.

5-Yıkama işlemi bitiminde her kuyucuğa 50 µL kromojen solüsyon A ve 50 µL kromojen solüsyon B boyama solüsyonları konuldu.

6-Plaka tekrardan 15 dakika 37°C’de inkübasyona bırakıldı.

7-İnkübasyonun ardından yıkama yapılmadan kuyucuklara 50 µL stop solüsyonu eklendi.

8-Mikro Plak ELISA okuyucusu (Thermo Fisher Scientific, Altrincham, UK) yardımıyla plaka 450 nm dalga boyunda 2 kez okutuldu. Bu okumaların ortalamaları alınarak kaydedildi.

9-Standartlara karşılık gelen absorbans değerleri kullanılarak doğrusal bir grafik çizildi.

Doğrusal grafiğin denklemi ile örneklerin miktarları belirlendi.

3.9. TAS ve TOS ölçümü

C6 rat glioma hücrelerinde TOFA uygulanan ve uygulanmayan gruptaki TOS ve TAS değerleri sırasıyla Total Oxidant Status Assay Kiti (Rel Assay Diagnostics, Türkiye) ve Total Antioxidant Status Assay Kiti (Rel Assay Diagnostics, Türkiye) ile belirlendi. C6 rat glioma hücreleri, 24 saat boyunca 100 nM konsantrasyonda TOFA’ya maruz bırakıldı ve üreticinin yönergeleri takip edildi. Sonuçlar TOS için µmol H₂O₂ Eq/g protein ve TAS için ise µmol Trolox Eq/g protein olarak verildi.

Reaktif örnekleri ve standartların hazırlanması prosedürleri şu şekildedir;

1. Hazırlanan numunelere enzimle etiketlenmiş antikorlar eklendi. Reaksiyona girme süresi 60 dakika boyunca 37°C’de inkübasyona bırakıldı.

2.İnkübasyondan alınan planelere kitin içinde yer alan 30X olan yıkama solüsyonu, distile su ile 1X olacak şekilde dilüe edilerek yıkama işlemi için

hazırlanan dilüe edilmiş solüsyonla 3 defa yıkandı.

3. Platelere kromojen solüsyonu A (50 µL) ve B (50 µL) eklendi. 10 dakika 37°C’de inkubasyona bırakıldı.

4. İnkubasyondan sonra yıkama olmadan 50 µL durdurma solüsyonu eklendi.

5. Boş kuyucuğu sıfır olarak kabul edip ve 450 nm dalga boyu altında optik yoğunluk ölçüldü; bu işlem, durdurma solüsyonunun eklenmesinden sonra 15 dakika içinde gerçekleştirildi.

3.10. COX-1 ve COX-2 İmmünohistokimyasal Boyamalar

Hücreler -20° C’de 5 dakika süreyle metanol ile fikse edilerek PBS ile yıkandı. Daha sonra oda ısısında 0.1% Triton X-100 içeren PBS ile 15 dakika bekletildi. Yıkama işleminden sonra 2%’lik BSA içeren PBS ile 60 dakika oda ısısında inkubasyona bırakıldı. Tekrar yıkama işleminden sonra monoclonal COX-1 (Santacruz, Katalog no. sc-19998) ve polyclonal anti COX-2 (Abcam, Katalog no. ab-15191) primer antikorları ile 1/200 dilüsyon oranında +4°C’de bir gece inkubasyona bırakıldı. PBS ile yıkanan hücreler kullanılan primer antikorlarla uyumlu olacak şekilde goat anti-mouse FITC sekonder antikor (Jackson ImmunoResearch, Catalogno. 115-095-003) ve goat anti-rabbit FITC sekonder antikor (Jackson ImmunoResearch, Catalogno. 111-095-003) ile 1/50 dilüsyon oranında 1 saat süreyle oda ısısında karanlık ortamda inkubasyona bırakıldı. Son olarak yıkanan hücrelerin üzerine 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) damlatılarak floresans mikroskopta (ZeissAxio) incelendi. İncelemede hücrelerdeki floresans pozitifliklerinin yoğunluğu semikantitatif olarak yok (-), hafif (1), orta (2) ve şiddetli (3) olarak değerlendirildi.

3.11. İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmesi SPSS 23.0 paket programıyla yapıldı. TAS, TOS, Tnf-α, IL-1β ve XTT verileri Shapiro-Wilk testiyle normal dağılıma uygunluk göstermesinden dolayı gruplar arası karşılaştırmada varyans analizi (One way ANOVA) kullanıldı. Gruplar arası farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını tespit edilmesi amacıyla Tukey testi (post-hoc test) uygulandı. Gruplara ait veriler ortalama ± standart hata (ort. ± SH) olarak ifade edildi. İstatistiksel anlamlılık düzeyi p<0,05 olarak kabul edildi. COX-1 COX-2

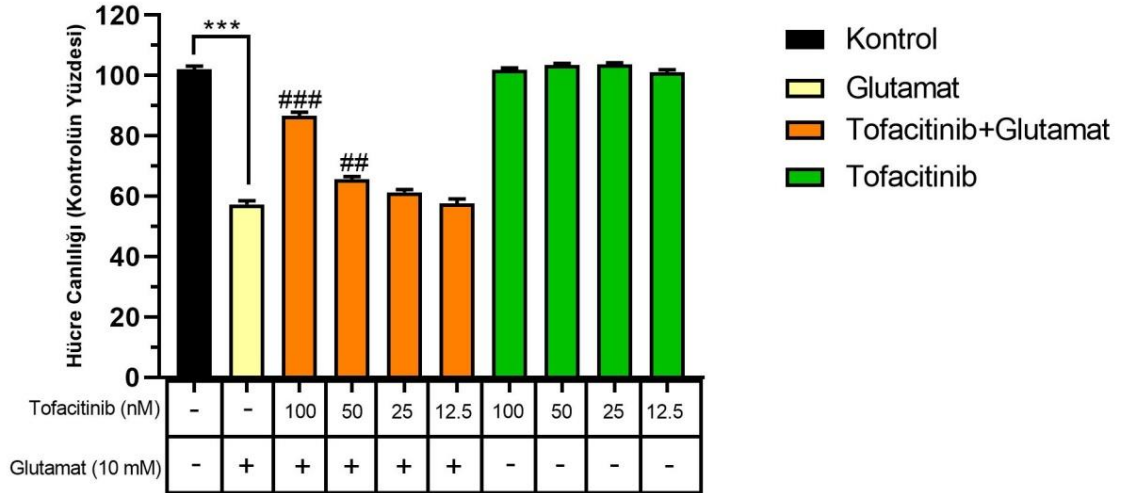
immunhistokimyasal boyamalar sonucu elde edilen veriler SPSS 20.00 programı ile analiz edildi. Gruplar arasındaki farklılık nonparametrik testlerden olan Kruskal Wallis ile farklılığı oluşturan grup ise Mann Whitney U testi ile belirlendi. ($p < 0.05$).



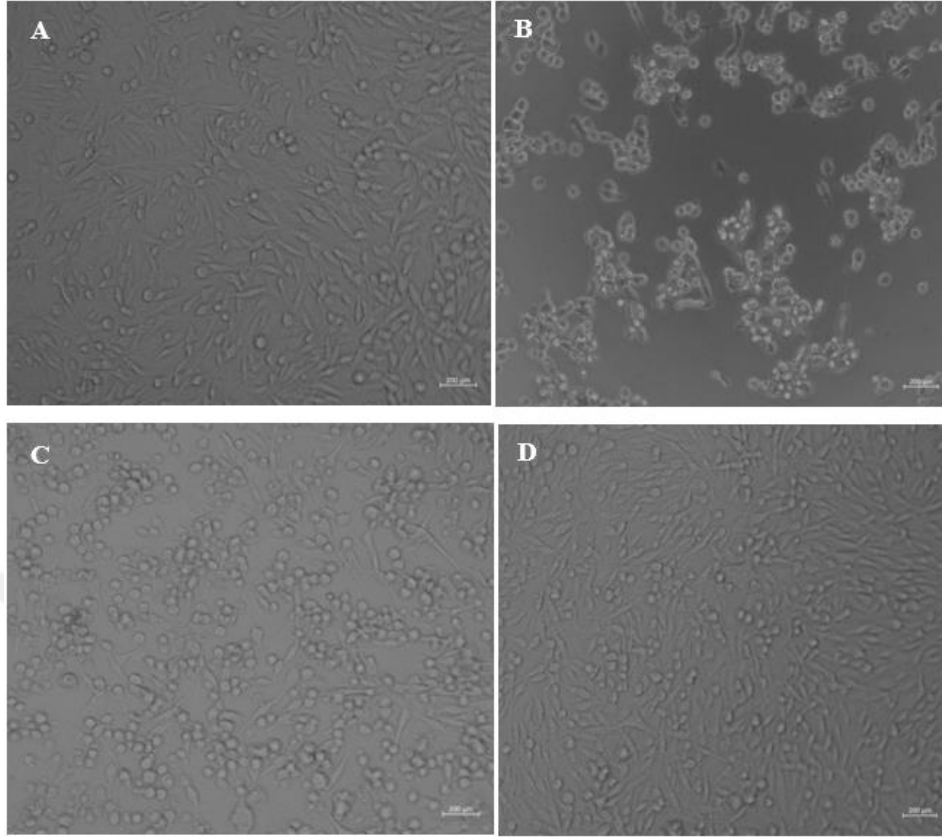
4.BULGULAR

4.1. Tofacitinib'in Hücre Canlılığına Etkisi

Tofacitinib'in etkin dozunun bulunabilmesi için XTT yöntemi uygulandı. Tofacitinib grubuna ve Tofacitinib+ Glutamat grubuna 12,5;25;50 ve 100 nM miktarlarında tofacitinib uygulandı. Hücre canlılığı ortalama değerleri glutamat grubunda (10 mM) kontrole göre karşılaştırıldığında istatistik olarak anlamlı oranda azalma gösterdi ($p < 0,05$). Bununla birlikte, glutamat ile azalan hücre canlılığında tofacitinib (100 nM) verildiğinde glutamat grubuna göre anlamlı bir artış tespit edildi ($p < 0,05$). XTT testi ile elde edilen değerler ELISA mikroplak okuyucudan geçirilerek absorbans değerleri yüzde canlılık olarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlar SPSS 23.0 ile değerlendirildi. Buna göre, XTT testinde tofacitinib için etkin doz 100 nM olarak bulundu (Şekil 12-13).



Şekil 12. Tofacitinib'in XTT Canlılık Testinde Deney Grupları Üzerine Etkisi
##($p < 0,05$), ###($p < 0,01$), ***($p < 0,01$)

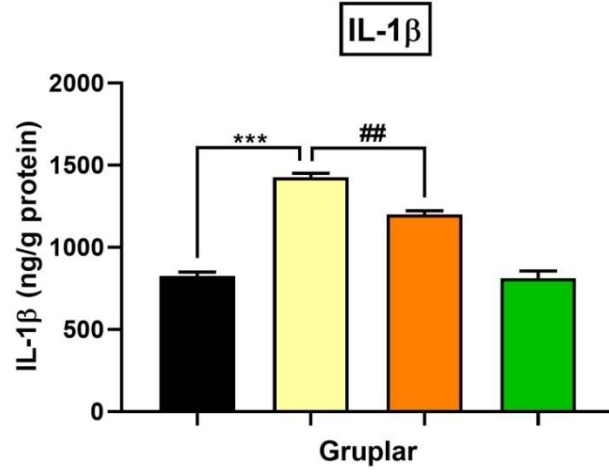
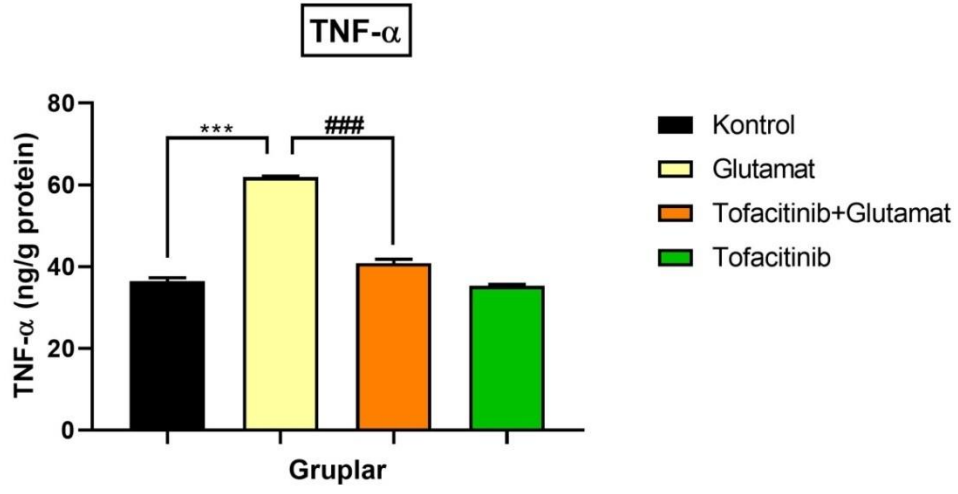


Şekil 13.Tofacitinib'in Glutamat Eksitotoksitesini Oluşturulan C6 Glioma Hücrelerinde Hücre Canlılığına Etkisi. A;Kontrol Grubu, B; Glutamat Grubu, C;Tofacitinib+Glutamat Grubu, D; Tofacitinib Grubu. Mikroskop Görüntüleri 20X Büyütme İle Gösterilmiştir.

4.2. Tofacitinib'in TNF- α ve IL-1 β Düzeylerine Etkisi

ELİSA test sonuçları eksitotoksitesite oluşturulmuş glutamat grubundaki TNF- α düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda arttığını göstermiştir ($p < 0,05$). Tofacitinib+glutamat verilen grupta ise TNF- α düzeylerinde glutamat grubuna göre anlamlı bir azalma olduğu gözlemlenmiştir ($p < 0,05$).

Elde edilen test verileri glutamat grubundaki IL-1 β düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı oranda arttığını göstermiştir ($p < 0,05$). Bununla birlikte, tofacitinib (100nM) + glutamat grubunun IL-1 β düzeyinde glutamat grubuna göre anlamlı bir azalma tespit edilmiştir ($p < 0,05$).



Şekil 14:Tofacitinib'in TNF- α ve IL-1 β düzeylerine etkisi. Veriler ortalama \pm standart sapma (ort \pm SS) ile ifade edilmiştir. ***p < 0.05, kontrol grubuna göre ve ### p < 0.05, glutamat grubuna göre karşılaştırıldığında.

Grupların TNF- α ve IL-1 β düzeylerine ilişkin tanımlayıcı verileri tabloda verilmiştir.

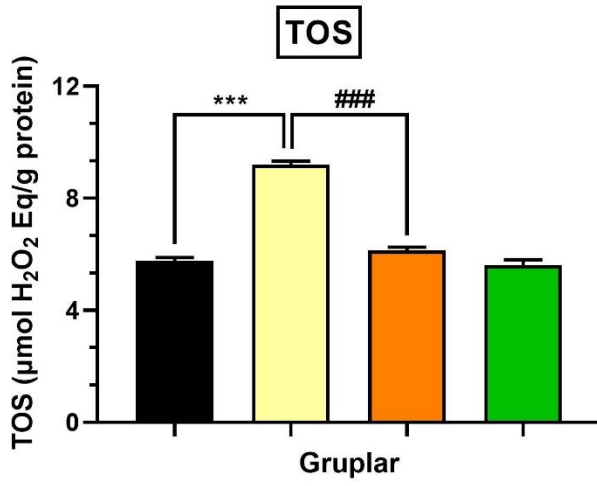
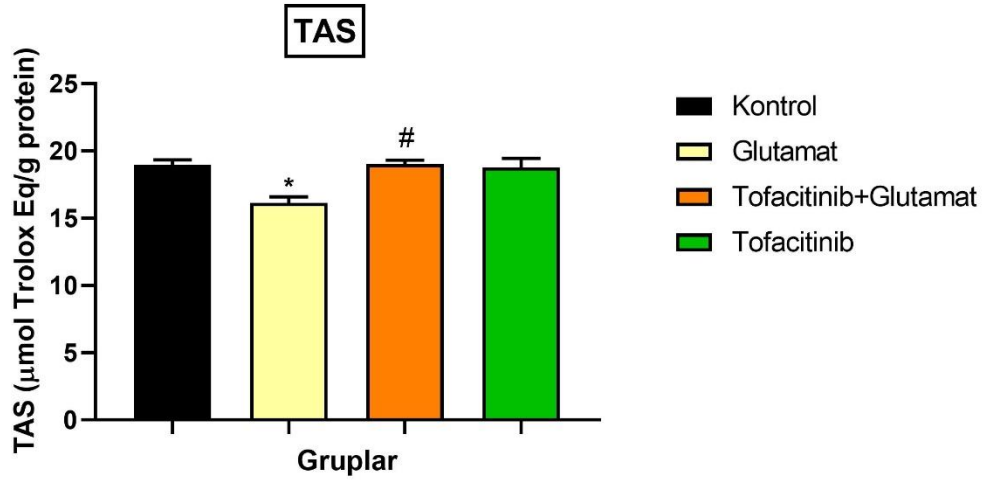
Tablo 4. Grupların TNF-A Ve IL-1 β Düzeyi Verileri

| TNF- α ve IL-1 β | | | | |
|-------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Gruplar | Ortalama Değer (TNF- α) | Standart Hata (TNF- α) | Ortalama Değer (IL-1 β) | Standart Hata (IL-1 β) |
| Kontrol | 36,49 | 0,2538 | 823,5 | -601,6 |
| Glutamat | 61,88 | 0,9737 | 1425 | 42,84 |
| Tofacitinib+Glutamat | 40,85 | 0,9737 | 1199 | 42,84 |
| Tofacitinib | 35,32 | 0,9737 | 812,8 | 42,84 |

4.3. Tofacitinib'in TAS ve TOS Düzeylerine Etkisi

C6 rat glioma hücrelerinde tofacitinib uygulanan ve uygulanmayan gruplardaki TAS değerleri Total Antioxidant Status Assay Kiti (Rel Assay Diagnostics, Türkiye) ile belirlendi. Tofacitinib grubu ve Tofacitinib+Glutamat grubuna ayrı ayrı tek doz 100 nM tofacitinib uygulandı. Elde edilen sonuçlarda anlamlılık bulunamadı. ($p>0,005$)

C6 rat glioma hücrelerinde Tofacitinib uygulanan ve uygulanmayan gruplardaki TOS değerleri Total Oxidant Status Assay Kiti (Rel Assay Diagnostics, Türkiye) ile belirlendi. Tofacitinib ve tofacitinib + glutamat gruplarına ayrı ayrı tek doz 100 nM tofacitinib uygulandı. Elde edilen sonuçlarda kontrol grubuna kıyasla glutamat grubunda total oksidan seviyelerinde anlamlı artış bulunmuştur. Tofacitinib + glutamat grubu ise glutamat grubuna kıyasla total oksidan seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalma görülmüştür ($p<0,05$). Öte yandan glutamatın TAS düzeylerini kontrol grubuna göre azalttığı, tofacitinib uygulanmasının ise TAS seviyelerini kontrol düzeylerine geri çevirdiği görülmüştür ($p<0,05$).



Şekil 15: Tofacitinib'in TAS Ve TOS Düzeylerine Etkisi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak ifade edilmiştir. ***($p < 0,05$) kontrol grubuna göre glutamat seviyesinin artışı ; ### ($p < 0,05$) glutamat grubuna göre tofacitinib grubunun anlamlı azalışını göstermektedir.

Grupların TAS ve TOS düzeylerine ilişkin tanımlayıcı verileri tabloda verilmiştir.

Tablo 5. Grupların TAS Ve TOS Düzeylerine İlişkin Tanımlayıcı Verileri

| TAS ve TOS | | | | |
|----------------------|----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| Gruplar | Ortalama Değer (TAS) | Standart Hata (TAS) | Ortalama Değer (TOS) | Standart Hata (TOS) |
| Kontrol | 18,97 | 0,8416 | 5,770 | 0,3423 |
| Glutamat | 16,13 | 0,6629 | 9,193 | 0,2021 |
| Tofacitinib+Glutamat | 19,04 | 0,6629 | 6.133 | 0,2021 |
| Tofacitinib | 18,79 | 0,6629 | 5,614 | 0,2021 |

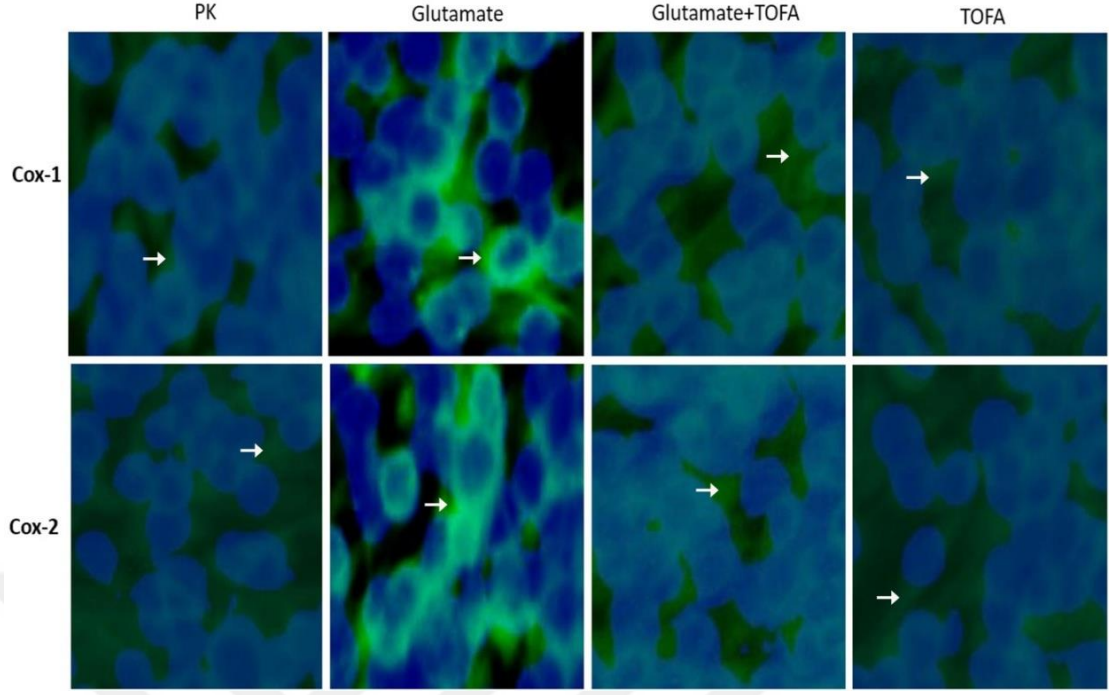
4.4. Tofacitinib'in COX-1 ve COX-2 İmmünohistokimyasal Boyamalar Üzerine Etkisi

COX-1 ve COX-2 ile yapılan immunfloresans boyamalarda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklı tespit edildi (Tablo 1, $p < 0.05$).

Tablo 6. COX-1 Ve COX-2 İle İmmunfloresans Boyamalardaki İstatistiksel Farklılıklar. (*, **, *** Gruplar Arası Farklılığı Göstermektedir, $P < 0.05$)

| Gruplar | COX-1 | COX-2 |
|----------------------|--------------|--------------|
| Kontrol | 1,00±0,00* | 1,00±0,00* |
| Glutamat | 3,00±0,40** | 2,83±0,40** |
| Tofacitinib+Glutamat | 2,16±0,40*** | 2,00±0,00*** |
| Tofacitinib | 1,33±0,51* | 1,16±0,40* |

COX-1 ve COX-2 yönünden yapılan immunfloresans boyamalarda Kontrol ve TOFA grubunda hafif düzeyde pozitifliklere rastlandı. Diğer uygulama gruplarından Glutamat grubunda şiddetli pozitiflikler tespit edilirken Glutamat ile birlikte TOFA verilen grupta pozitifliklerin orta düzeye indiği tespit edildi (Şekil 13).



Şekil 16. Kontrol grubunda hafif, Glutamat grubunda şiddetli, TOFA+Glutamat grubunda orta, TOFA grubunda hafif düzeyde floresans pozitiflikleri (→). IF.

5.TARTIŞMA

Glutamat eksitotoksitesinin neden olduğu patolojileri önlemek için çok fazla çalışma yapılmıştır. Bu tez proje çalışmamızda tofacitinib'in c6 glioma hücrelerinde glutamat eksitotoksitesine etkisine ve bu etkide inflamasyon ve oksidatif stres yolları ELISA ve imminohistokimyasal boyama yöntemleriyle araştırılmıştır. Çok sayıda antiinflamatuvar, antioksidan, antiproliferatif özelliği olan madde eksitotoksitesinin çeşitli mekanizmalarla önlenmesi için yapılan çalışmalarda kullanılmasına rağmen literatürde daha önce tofacitinib'in glutamat eksitotoksitesine olan etkisiyle ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamız bir ilk olma özelliği taşımaktadır.

Yaptığımız çalışma için elde edilen verilerle glutamatın glial hücrelere 10 mM uygulanması hücre canlılığını önemli oranda azaltmıştır. Bununla birlikte yaptığımız çalışmanın başlangıcında tofacitinib'in toksik ve apoptotik etkilere neden olabilecek, bir hücre kültürü çalışmasına göre yüksek denilebilecek dozlarda uygulanmasının aksine antioksidatif ve proliferatif etkilerinin görülmesi için en uygun dozun belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için XTT Hücre canlılık testini kullanarak tofacitinib grubuna ve tofacitinib + glutamat grubuna 12,5, 25, 50 ve 100 nM dozlarda tofacitinib uygulanarak etkin doz 100 nM olarak bulunmuştur. Tofacitinib'in 100 nM uygulanan dozu hücre canlılığında önemli artışa sebep olmuştur. Bunlara ek olarak TNF- α , IL-1 β , TAS, TOS, Cox-1, Cox-2 ölçümlerinde glutamat grubu kontrol grubuna göre yüksek, tofacitinib + glutamat grubu ise glutamat grubuna göre düşük bulunmuştur. C6 glioma hücrelerinde oluşturulan glutamat eksitotoksitesinde hem inflamatuvar olduğu ve hem de oksidatif stresi azalttığı aynı zamanda hücrelerde apoptozu baskıladığı görülmüştür.

Tofacitinib bugüne kadar onaylanmış benzersiz bir JAK inhibitörüdür. Proinflamatuvar mediatörlerin salgısını azaltırken JAK1 yoluyla proliferasyonu ve aktivasyonu da baskılar. Tofacitinib düşük dozlarda bağışıklık sistemini modüle eder. JAK1 ve JAK3 yoluyla ise yüksek dozlarda etkiler. JAK2 aracılığıyla eritropoietinin baskılanmasıyla hematopoez sinyalizyonunu sağlar. Bunlarla birlikte glutamat eksitotoksitesi üzerinde inflamasyon ve oksidatif stres üzerine etkileri çalışılmamıştır.

Janus kinaz/sinyal transdüksiyonu ve transkripsiyon aktivatörü (JAK-STAT)

sinyal yolu, romatoid artrit, sedef hastalığı ve inflamatuvar barsak hastalığı dahil inflamatuvar ve otoimmün hastalıkların patogeneğinde rol oynar. Otoimmün ve inflamatuvar hastalıkların patogeneğinde yer alan birçok sitokin, hücre içi sinyalleri iletmek için JAK'ları ve STAT'ları kullanır. JAK ve STAT genlerindeki mutasyonlar çok sayıda immün yetmezlik sendromuna neden olur ve bu genlerdeki polimorfizmler otoimmün hastalıklarla ilişkilidir. Küçük molekülü JAK inhibitörlerinin (Jakinibler) romatolojik hastalıkların tedavisindeki başarısı, hücre içi sinyal yollarının otoimmüniteyi tedavi etmek için terapötik olarak hedeflenebileceğini göstermektedir. İlk romatolojik Jakinib olan Tofacitinib, romatoid artrit için ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmıştır ve şu anda diğer otoimmün hastalıklar için araştırılmaktadır. Diğer birçok Jakinib, klinik öncesi geliştirme aşamasındadır veya klinik denemelerin çeşitli aşamalarında (Banerjee et al., 2017).

Yapılan bir çalışmada Janus Kinaz (JAK) inhibitörü olan tofacitinib'in omurilik yaralanması sonrası fonksiyonel iyileşmeye yardımcı olduğu görülmüştür. Tofacitinib tedavisinin in vivo terapötik etkilerini değerlendirmek için sıçanda omurilik yaralanması modeli oluşturulmuştur. Omurilik yaralanmasından sonra farklı zaman noktalarında histolojik ve davranışsal analizler yapılmış ve İn vitro, tofacitinib'in primer mikroglia ve BV2 hücrelerinin proinflamatuvar aktivasyonu üzerindeki etkileri western blot analizi, floresan boyama, qPCR ve akış sitometrisi ile analiz edilmiştir. Tofacitinib'in nörolojik koruması, birincil nöronlar ve mikroglia içeren bir ortak kültür sistemi kullanılarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak TOFA sıçanlarda omurilik yaralanmasının neden olduğu motor fonksiyon bozukluklarını etkili bir şekilde iyileştirebilir ve inflamasyonun erken evresinde TOFA uygulaması, nöronal apoptozu ve skar dokusu oluşumunu etkili bir şekilde engelleyebildiği ve aksonların ve sinir liflerinin onarımını destekleyebildiği bulunmuştur. Daha ileri çalışmalarda, TOFA'nın, mikroglia'nın in vivo ve in vitro proinflamatuvar fenotipe aktivasyonunu inhibe ederek omurilik hasarının neden olduğu inflamasyonu baskıladığını göstermiştir. Ek olarak, sonuçlarda TOFA'nın in vitro inflamasyon sırasında üstün nöronal koruma sergilediği ilginç bir olgu ortaya çıkmıştır (Ma et al., 2023).

Tofacitinib, organ allogreft reddinin önlenmesi ve inflamatuvar otoimmün

hastalıkların tedavisi için bir immünosupresif ajan olarak geliştirilmiştir (Vaddi & Luchi, 2012). Tedavi edilemeyen otoimmün ensefalit vakalarını tedavi etmek için kan-beyin bariyerini (KBB) geçen yeni immünoterapiye olan ihtiyaç artıyor. Tofacitinib, KBB'ye etkili bir şekilde nüfuz eden dirençli bağışıklık aracılı hastalıkları tedavi etmek için kullanılan bir Janus kinaz (JAK) inhibitörüdür. Bu çalışmada tofacitinib'in, dirençli otoimmün ensefalitli hastalar için yeni bir seçenek olabileceği ortaya çıkarılmıştır. Tofacitinib ile tedavi edilen hastalar, Nisan 2019'dan Temmuz 2020'ye kadar otoimmün ensefalit için Seul Ulusal Üniversite Hastanesi kohortundan seçilmiş. Multimodal geleneksel immünoterapilere yetersiz yanıt veren otoimmün ensefalitli hastalarda tofacitinib'in etkinliğini retrospektif olarak analiz edilmiş. Tofacitinib günde iki kez 5 mg dozunda oral olarak uygulanmış. Toplam sekiz hasta tofacitinib ile tedavi edilmiş; ikisi iyi yanıtlar vermiş (klinik genel izlenim iyileştirme puanı [CGI-I] = 1 veya 2), üçü kısmi yanıtlar verdi (CGI-I = 3) ve üçü, yanıt olarak anlamlı bir iyileşme göstermedi (CGI-I = 4). İyi yanıt veren iki kişi, kronik otoimmün meningoensefalitte iyileşme olduğunu ve daha önce anesteziye ve diğer immünoterapilere dirençli olan anti-miyelin oligodendrosit glikoprotein (MOG) ile ilişkili bozuklukta yeni başlayan dirençli status epileptikusun durdurulduğunu göstermiş. Hiçbir hastada ciddi yan etki görülmemiş. Bulgular, tofacitinib'in merkezi sinir sistemi otoimmün hastalıkları için terapötik bir seçenek olarak potansiyelini ortaya koymaktadır (Jang et al., 2021).

Bir diğer çalışmada ise tofacitinib'in oksidatif stres ve inflamatuvar etkilerini görüyoruz. Septik akut böbrek hasarı (AKI), yoğun bakım ünitesinde (YBÜ) en sık görülen AKI sendromudur ve AKI vakalarının yaklaşık yarısını oluşturur. Tofacitinib (TOFA), romatoid artritte güçlü anti-inflamatuvar aktivite sergileyen bir pan-Janus kinaz (JAK) inhibitörüdür. Bu çalışmada TOFA'nın septik AKI üzerindeki koruyucu etkilerini ve altta yatan mekanizmaları araştırılmış. Lipopolisakkarit (LPS)'in (10 mg/kg) intraperitoneal enjeksiyonu yoluyla C57BL/6 farelerinde lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen bir AKI modeli oluşturulmuş. LPS tehdidinden bir saat sonra farelere, 24. saatte kurban edilene kadar her 6 saatte bir oral olarak TOFA (5, 10 veya 15 mg/kg) uygulanmış. TOFA'nın LPS kaynaklı renal histopatolojik değişiklikleri ve fonksiyon bozukluğunu önemli ölçüde iyileştirdiğini bulunmuş. TOFA ayrıca böbrek dokularında proinflamatuvar sitokinlerin (TNF- α ,

IL-1 β , IL-6 ve IFN- γ) ekspresyon seviyelerini ve oksidatif stres parametrelerini (MDA, GSH, SOD ve CAT) baskılamış. Bu sonuçlar, TOFA'nın, LPS tehdidiyle önemli ölçüde aktive edilen JAK-STAT1/STAT3 yolu üzerindeki inhibitör etkisi ile ilişkili olabileceğini göstermiştir (Yun et al., 2021).

Tofacitinib dışında diğer JAK inhibitörü ilaçlarının da farklı hastalıklar üzerine inflamatuvar olarak koruyucu olduğu çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur.

Bir çalışmada JAK2 inhibisyonunun iskemik felç üzerinde nöroprotektif etkisinin olup olmadığını araştırılmıştır. İnflamatuvar yanıtlar serebral iskemik inme (IS) patogeneğinde çok fazla bir rol oynar. Seçici bir oral JAK 1/2 inhibitörü olan Ruxolitinib (Rux), JAK2/STAT3 yoluyla inflamatuvar yanıtları azaltır. Anti-inflamatuvar ve immünoşüpresif etkilerine dayanarak felce karşı koruyucu bir etkiye sahip olabileceğini varsayılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda MCAO farelerinde Rux tarafından JAK2 inhibisyonu, STAT3 fosforilasyonunu azaltmış, böylece aşağı yöndeki proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu ve NLRP3 inflamatuvar ekspresyonunun aşağı regülasyonuna yol açmıştır (Zhu et al., 2021).

Bir diğer çalışmada ise JAK inhibitörü olan Ruxolitinib'in (RUXO) ferroptoz inhibitörü Ferrostatin-1'in (Fer-1) pozitif kontrol olarak kullanıldığı travmatik beyin hasarı (TBI) kaynaklı ferroptoz üzerindeki etkisini incelenmiş. İlk olarak TBI'dan sonra farklı zaman noktalarında ferroptoz ile ilişkili belirteçlerin protein düzeyinde ekspresyon modellerini incelenmiş. Bu belirteçlerin ifade değişikliklerine dayanarak Ruxo'nun ferroptoz üzerindeki etkisini kanıtlamak için TBI'dan 12 saat sonrayı seçilmiş. Fer-1 tedavisinden sonra elde edilen sonuçlarla paralel olarak, Ruxo'nun ferroptoz üzerinde yoğun önleyici etkisini bulunmuş. Ek olarak, bu iki tedavi hem beyin suyu içeriğini hem de TBI'nın akut fazındaki nörodejenerasyonun derecesini hafifletmiş. Son olarak, sırasıyla tel kavrama testi, Morris su labirenti ve açık alan testi yoluyla Ruxo veya Fer-1'in nöroprotektif etkisini daha da doğrulanmış. Daha sonra lezyon hacmi ve demir birikimi de TBI'nın uzun vadeli sonuçları üzerindeki etkilerini belgelemek için ölçülmüş. Sonuçlar sonuçta ferroptozun inhibe edilmesinin nöroproteksiyon sağladığını ve bunun Ruxo'nun TBI üzerindeki başka bir nöroprotektif mekanizması olduğunu göstermektedir (Chen et al., 2021).

Bir başka çalışmada ise bir diğer JAK inhibitörü olan Baricitinib'in romatoid artritli bir fare modelinde kan-beyin bariyerinin zayıf olduğu bir bölgede mikroglia ve

STAT3 üzerindeki inhibitör etkisi araştırılmıştır. RA'lı hastalarda baricitinib sadece artrit semptomlarının şiddetini iyileştirmekle kalmaz, aynı zamanda hastaların depresyon ve yorgunluk gibi nöropsikolojik semptomlarını da iyileştirir. Ancak baricitinib'in sinirsel aktiviteyi etkileyebildiği hücresel mekanizmalar henüz keşfedilmemiştir. Bu ilacın kan-beyin bariyeri (BBB) geçirgenliği belirsizliğini korurken, Janus kinaz inhibitörleri (JAKi), zayıf bir BBB fonksiyonuna sahip benzersiz bir beyin bölgesi olan postrema bölgesine ulaşabilir. Bu çalışmada postrema bölgesinde deneysel artrit sırasında mikrogial aktivasyonu görülmüş. Bu nedenle, CIA fare modelini kullanarak baricitinib'in postrema bölgesindeki mikrogia üzerindeki etkisini değerlendirmeye çalışılmış. Sonuç olarak baricitinib'in zayıf BBB'ye sahip beyin bölgesindeki beyin hücrelerini, özellikle de mikrogia'yı etkileyebildiğini ve otoimmün artrit sırasındaki anormal davranışları hafifletebildiğini görülmüştür; bu da JAKi'nin RA'yı destekleyen beyin patolojileri üzerindeki potansiyel terapötik etkisine işaret etmektedir (Matsushita et al., 2023).

Tofacitinib'in glutamat eksitotoksitesisi üzerine etkilerini gösteren yeterli çalışma yoktur. Bizim yaptığımız çalışmayla kıyaslayacak kadar in vitro çalışma bulunamamıştır. Yakın çalışmalar göz önüne alındığında ilacımızın anti-inflamatuar etkileri ve antioksidan etkileri glutamat eksitotoksitesisine karşı koruyuculuğu saptanmıştır. Tofacitinib'in otoimmün hastalıklar, iskemik ve travmatik beyin hasarlarında protektif etkileri mevcuttur.

Bizim çalışmamızda elde edilen veriler ışığında ilacımızın yeterli dozlarda canlılarda glutamat eksitotoksitesisi üzerine etkilerinin aydınlatılması için daha fazla sayıda in vitro ve vivo çalışmaya ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ

C6 glioma hücrelerinde oluşturulan glutamat eksitotoksitesinde tofacitinib etkilerini araştırdığımız bu çalışmamızda aşağıdaki sonuçlar bulunmuştur;

- Fazla miktarda glutamat hücrede eksitotoksititeye ve sonrasında hücre ölümüne sebep olmaktadır.
- Hücre canlılığını gösteren XTT sonuçlarına göre glutamat ile azalan hücre canlılığında tofacitinib'in 100 nM dozunda uygulanması ile hücre canlılığı anlamlı düzeyde artmıştır.
- ELİSA test sonuçları proinflamatuvar sitokinler olan TNF- α ve IL-1 β protein düzeylerinin glutamat ile önemli oranda yükseldiğini buna karşın tofacitinib uygulanması ile bu protein düzeylerinde anlamlı bir azalma olduğunu ortaya çıkarmıştır.
- Tofacitinib'in total oksidatif stresi azaltarak ve total antioksidatif stresi artırarak oksidatif stres mekanizmaları üzerinden glutamat eksitotoksitesini önlediği görülmüştür.
- Hücrede inflamasyon oluşumunu gösteren COX-1 COX-2 immünohistokimyasal boyama sonuçlarına göre tofacitinib'in glutamat grubunda inflamasyona bağlı olarak yoğun görülen boyamaları azalttığı orta seviyeye çektiği görülmüştür.

Sonuç olarak tofacitinib'in 100 nM dozunda C6 hücrelerinde oluşturulan glutamat eksitotoksitesine karşı protektif etkiye sahip olduğu ortaya konmuştur. Tofacitinib'in bu etkiyi inflamatuvar ve oksidatif yollar üzerinden gerçekleştirdiği gösterilmiştir.

7.KAYNAKÇA

AMPA reseptörü - *Vikipedi*. (n.d.). Retrieved December 9, 2023, from

Arriza, J. L., Eliasof, S., Kavanaugh, M. P., & Amara, S. G. (1997). Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(8), 4155–4160.

Bak, L., ... A. S.-J. of, & 2006, undefined. (2006). The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *Wiley Online Library* LK Bak, A Schousboe, HS Waagepetersen *Journal of Neurochemistry*, 2006 • *Wiley Online Library*, *98*(3), 641–653.

Banerjee, S., Biehl, A., Gadina, M., Hasni, S., & Schwartz, D. M. (2017). JAK-STAT Signaling as a Target for Inflammatory and Autoimmune Diseases: Current and Future Prospects. *Drugs*, *77*(5), 521–546.

Bates, B., Xie, Y., Taylor, N., Johnson, J., Wu, L., ... S. K.-M. brain, & 2002, undefined. (n.d.). Characterization of mGluR5R, a novel, metabotropic glutamate receptor 5-related gene. *Elsevier*. Retrieved December 9, 2023, from

Behrmann, I., Smyczek, T., ... P. H.-J. of B., & 2004, undefined. (n.d.). Janus Kinase (Jak) Subcellular Localization Revisited: The exclusive membrane localization of endogenous janus kinase 1 by cytokine receptor interaction. *ASBMB*. Retrieved December 10, 2023, from

Berezowski, V., Hartung, T., Boveri, M., Price, A., Slupek, S., Lenfant, A.-M., Benaud, C., Cecchelli, R., Prieto, P., & Dehouck, M.-P. (2005). Induction of blood-brain barrier properties in cultured brain capillary endothelial cells: Comparison between primary glial cells and C6 cell line. *Wiley Online Library* M Boveri, V Berezowski, A Price, S Slupek, AM Lenfant, C Benaud, T Hartung, R Cecchelli *Glia*, 2005 • *Wiley Online Library*, *51*(3), 187–198.

Bordey, A., neurophysiology, H. S.-J. of, & 1998, undefined. (1998). Electrophysiological properties of human astrocytic tumor cells in situ: enigma of spiking glial cells. *Journals.Physiology.Org* A Bordey, H Sontheimer *Journal*

of Neurophysiology, 1998•journals.Physiology.Org.

Bordi, F., neurobiology, A. U.-P. in, & 1999, undefined. (n.d.). Group I metabotropic glutamate receptors: implications for brain diseases. *Elsevier*. Retrieved December 17, 2023, from

Bottenstein, J. (2012). *Cell culture in the neurosciences*.

Brosnan, J. T., & Brosnan, M. E. (2013). Glutamate: A truly functional amino acid. *Amino Acids, 45*(3), 413–418.

Chen, X., Gao, C., Yan, Y., Cheng, Z., Chen, G., Rui, T., Luo, C., Gao, Y., Wang, T., Chen, X., & Tao, L. (2021). Ruxolitinib exerts neuroprotection via repressing ferroptosis in a mouse model of traumatic brain injury. *Experimental Neurology, 342*.

Conn, P., and, J. P.-A. review of pharmacology, & 1997, undefined. (1997). Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annualreviews.OrgPJ Conn, JP PinAnnual Review of Pharmacology and Toxicology, 1997•annualreviews.Org, 37, 205–237*.

Daikhin, Y. , & Yudkoff, M. 2000 - Google Akademik. (n.d.). Retrieved November 19, 2023, from

Education, R. N.-J. of P. T., & 1993, undefined. (n.d.). Principles of Neural Science, ed 3. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. Elsevier, New York, 1991, cloth, 1135 pp, illus, \$69. *Journals.Lww.Com*. Retrieved November 25, 2023, from

Flanagan, M. E., Blumenkopf, T. A., Brissette, W. H., Brown, M. F., Casavant, J. M., Shang-Poa, C., Doty, J. L., Elliott, E. A., Fisher, M. B., Hines, M., Kent, C., Kudlacz, E. M., Lillie, B. M., Magnuson, K. S., McCurdy, S. P., Munchhof, M. J., Perry, B. D., Sawyer, P. S., Strelevitz, T. J., ... Changelian, P. S. (2010). Discovery of CP-690,550: A potent and selective janus kinase (JAK) inhibitor for the treatment of autoimmune diseases and organ transplant rejection. *Journal of Medicinal Chemistry, 53*(24), 8468–8484.

Fleury, C., Mignotte, B., Biochimie, J. V.-, & 2002, undefined. (n.d.). Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Elsevier*. Retrieved December 9, 2023, from

- Ganel, R., & Rothstein, J. D. (1999). *Glutamate Transporter Dysfunction and Neuronal Death*. 471–493.
- Ghoreschi, K., Jesson, M., Li, X., ... J. L.-T. J. of, & 2011, undefined. (n.d.). Modulation of innate and adaptive immune responses by tofacitinib (CP-690,550). *Journals.Aai.Org*. Retrieved December 14, 2023, from
- Gieryng, A., Pszczolkowska, D., Bocian, K., reports, M. D.-S., & 2017, undefined. (n.d.). Immune microenvironment of experimental rat C6 gliomas resembles human glioblastomas. *Nature.Com* A Gieryng, D Pszczolkowska, K Bocian, M Dabrowski, WD Rajan, M Kloss, J Mieczkowski *Scientific Reports*, 2017 • *nature.Com*. Retrieved December 2, 2023, from
- Glioblastoma Hücrelerinde, Y. (2021). *GLT-1 (glutamat transporter-1) yıkım yolağının glioblastoma hücrelerinde incelenmesi*.
- Glutamat Nörotoksitesisi Oluşturulan Sıçanlarda...* - Google Akademik. (n.d.). Retrieved December 9, 2023, from oksisitesi+Oluşturulan++Sıçanlarda+Metforminin+Olası+Nöroprotektif++Etki sinde+Glukojen+Sentaz+Kinaz-3-Betanin++Rolü&btnG=
- Goya, L., Feng, P., Aliabadi, S., of, P. T.-I. journal, & 1996, undefined. (n.d.). Effect of growth factors on the in vitro growth and differentiation of early and late passage C6 glioma cells. *Elsevier*. Retrieved December 2, 2023, from
- Gras, C., Herzog, E., Bellenchi, G. C., Ronique Bernard, V., Ravassard, P., Pohl, M., Gasnier, B., Giros, B., & Mestikawy, S. El. (2002). A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *Soc Neuroscience* C Gras, E Herzog, GC Bellenchi, V Bernard, P Ravassard, M Pohl, B Gasnier, B Giros *Journal of Neuroscience*, 2002 • *Soc Neuroscience*.
- Ha, J., letters, S. P.-N., & 2006, undefined. (n.d.). Glutamate-induced oxidative stress, but not cell death, is largely dependent upon extracellular calcium in mouse neuronal HT22 cells. *Elsevier*. Retrieved December 9, 2023, from
- Hammond, J. C., Shan, D., Meador-Woodruff, J. H., & McCullumsmith, R. E. (2014). Evidence of glutamatergic dysfunction in the pathophysiology of schizophrenia. *Synaptic Stress and Pathogenesis of Neuropsychiatric*

Disorders, 265–294.

- Hazell, A. S., Rama Rao, K. V., Danbolt, N. C., Pow, D. V., & Butterworth, R. F. (2001). Selective down-regulation of the astrocyte glutamate transporters GLT-1 and GLAST within the medial thalamus in experimental Wernicke's encephalopathy. *Journal of Neurochemistry*, 78(3), 560–568.
- Heath, P. R., & Shaw, P. J. (2002). Update on the glutamatergic neurotransmitter system and the role of excitotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle and Nerve*, 26(4), 438–458.
- Hu, X., li, J., Fu, M., Zhao, X., & Wang, W. (2021). The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1).
- Hynd, M., Scott, H., international, P. D.-N., & 2004, undefined. (n.d.). Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Elsevier*. Retrieved November 27, 2023, from
- Impact of tofacitinib treatment on human B-cells in vitro and in vivo. (n.d.). *Elsevier*. Retrieved January 1, 2024, from
- Jang, Y., Lee, W. J., Lee, H. S., Chu, K., Lee, S. K., & Lee, S. T. (2021). Tofacitinib treatment for refractory autoimmune encephalitis. *Epilepsia*, 62(4), e53–e59.
- Kato, S., Higashida, H., Higuchi, Y., research, S. H.-B., & 1984, undefined. (n.d.). Sensitive and insensitive states of cultured glioma cells to glutamate damage. *Elsevier*. Retrieved December 2, 2023, from
- Kayaalp OS, Uzbay T. (2009). Santral sinir sistemi... - Google Akademik.* (n.d.). Retrieved December 9, 2023, from
- Kostandy, B. B. (2012). The role of glutamate in neuronal ischemic injury: The role of spark in fire. *Neurological Sciences*, 33(2), 223–237.
- Labranche, T. P., Jesson, M. I., Radi, Z. A., Storer, C. E., Guzova, J. A., Bonar, S. L., Thompson, J. M., Happa, F. A., Stewart, Z. S., Zhan, Y., Bollinger, C. S., Bansal, P. N., Wellen, J. W., Wilkie, D. P., Bailey, S. A., Symanowicz, P. T., Hegen, M., Head, R. D., Kishore, N., ... Meyer, D. M. (2012). JAK inhibition

- with tofacitinib suppresses arthritic joint structural damage through decreased RANKL production. *Arthritis and Rheumatism*, 64(11), 3531–3542.
- Lai, L., Protesescu, L., ... M. K.-P. C., & 2014, undefined. (n.d.). Sensitized solar cells with colloidal PbS–CdS core–shell quantum dots. *Pubs.Rsc.Org*. Retrieved November 27, 2023, from
- Lau, A., & Tymianski, M. (2010). Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 460(2), 525–542.
- Liu, Y., Wang, S., Kan, J., Zhang, J., Zhou, L., Huang, Y., & Zhang, Y. (2019). Chinese Herbal Medicine Interventions in Neurological Disorder Therapeutics by Regulating Glutamate Signaling. *Current Neuropharmacology*, 18(4), 260–276.
- Ma, H., Wang, C., Han, L., Kong, F., Liu, Z., Zhang, B., Chu, W., Wang, H., Wang, L., Li, Q., Peng, W., Yang, H., Han, C., & Lu, X. (2023). Tofacitinib Promotes Functional Recovery after Spinal Cord Injury by Regulating Microglial Polarization via JAK/STAT Signaling Pathway. *International Journal of Biological Sciences*, 19(15), 4865–4882.
- Maeshima, K., Yamaoka, K., Kubo, S., Nakano, K., Iwata, S., Saito, K., Ohishi, M., Miyahara, H., Tanaka, S., Ishii, K., Yoshimatsu, H., & Tanaka, Y. (2012). The JAK inhibitor tofacitinib regulates synovitis through inhibition of interferon- γ and interleukin-17 production by human CD4⁺ T cells. *Arthritis and Rheumatism*, 64(6), 1790–1798.
- Magro, F., & Estevinho, M. M. (2020). Is tofacitinib a game-changing drug for ulcerative colitis? *United European Gastroenterology Journal*, 8(7), 755–763.
- Manev, H., Favaron, M., Guidotti, A., pharmacology, E. C.-M., & 1989, undefined. (n.d.). Delayed increase of Ca²⁺ influx elicited by glutamate: role in neuronal death. *ASPETH Manev, M Favaron, A Guidotti, E CostaMolecular Pharmacology, 1989•ASPET*. Retrieved December 9, 2023, from
- Maragakis, N., neurology, J. R.-A. of, & 2001, undefined. (n.d.). Glutamate transporters in neurologic disease. *Jamanetwork.Com*. Retrieved November 27,

2023, f

Matsushita, T., Otani, K., Yoshiga, M., Hirano, M., Noda, K., & Kurosaka, D. (2023). Inhibitory effect of baricitinib on microglia and STAT3 in a region with a weak blood-brain barrier in a mouse model of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*, 62(8), 2908–2917.

MicroRNA expression in rat brain exposed to repeated inescapable shock: differential alterations in learned helplessness vs. non-learned helplessness. (n.d.). *Academic.Oup.Com*. Retrieved December 9, 2023, from

Milici, A. J., Kudlacz, E. M., Audoly, L., Zwillich, S., & Changelian, P. (2008). Cartilage preservation by inhibition of Janus kinase 3 in two rodent models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research and Therapy*, 10(1).

Muroyama, A., Uehara, S., Yatsushiro, S., Echigo, N., Morimoto, R., Morita, M., Hayashi, M., Yamamoto, A., Koh, D.-S., & Moriyama, Y. (2004). A novel variant of ionotropic glutamate receptor regulates somatostatin secretion from δ -cells of islets of Langerhans. *Am Diabetes Assoc, S Uehara, S Yatsushiro, N Echigo, R Morimoto, M Morita, M Hayashi, A Yamamoto, DS Koh...Diabetes, 2004•Am Diabetes Assoc, 53, 1743–1753.*

Naito, S., Chemistry, T. U.-J. of B., & 1983, undefined. (n.d.). Adenosine triphosphate-dependent uptake of glutamate into protein I-associated synaptic vesicles. *Elsevier*. Retrieved December 9, 2023, from

NMDA reseptörü - NMDA reseptörü - Vikipedi. (n.d.). Retrieved December 9, 2023, from

nutrition, B. M.-T. J. of, & 2000, undefined. (n.d.). Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *Academic.Oup.ComBS MeldrumThe Journal of Nutrition, 2000•academic.Oup.Com*. Retrieved November 19, 2023, from

O’Shea, J., Gadina, M., Cell, R. S.-, & 2002, undefined. (n.d.). Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell.ComJJ O’Shea, M Gadina, RD SchreiberCell, 2002•cell.Com*. Retrieved December 10, 2023, from

O’Shea, J. J., Holland, S. M., & Staudt, L. M. (2013). JAKs and STATs in Immunity,

Immunodeficiency, and Cancer. *New England Journal of Medicine*, 368(2), 161–170.

Okuyama, H. (1992). Minimum Requirements of n-3 and n-6 Essential Fatty Acids for the Function of the Central Nervous System and for the Prevention of Chronic Disease. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 200(2), 174–176.

Osen, K. K., Storm-Mathisen, J., Ottersen, O. P., & Dihle, B. (1995). Glutamate is concentrated in and released from parallel fiber terminals in the dorsal cochlear nucleus: A quantitative immunocytochemical analysis in guinea pig. *Journal of Comparative Neurology*, 357(3), 482–500.

Ottersen, O., Zhang, N., Neuroscience, F. W.-, & 1992, undefined. (n.d.). Metabolic compartmentation of glutamate and glutamine: morphological evidence obtained by quantitative immunocytochemistry in rat cerebellum. *Elsevier*. Retrieved December 2, 2023, from

Özdemir, O., yaklaşımlar, P. Ö.-P. güncel, & 2016, undefined. (2016). Glutamat sistemi ve şizofreni. *Dergipark.Org.TrO Özdemir, PG ÖzdemirPsikiyatride Güncel Yaklaşımlar, 2016•dergipark.Org.Tr*, 8(4), 394–405.

Palmroth, M., Kuuliala, K., Peltomaa, R., Virtanen, A., Kuuliala, A., Kurttila, A., Kinnunen, A., Leirisalo-Repo, M., Silvennoinen, O., & Isomäki, P. (2021). Tofacitinib Suppresses Several JAK-STAT Pathways in Rheumatoid Arthritis In Vivo and Baseline Signaling Profile Associates With Treatment Response. *Frontiers in Immunology*, 12.

Piers, T. M., Kim, D. H., Kim, B. C., Regan, P., Whitcomb, D. J., & Cho, K. (2012). Translational concepts of mglur5 in synaptic diseases of the brain. *Frontiers in Pharmacology*, 3 NOV.

Pin, J., Neuropharmacology, R. D.-, & 1995, undefined. (n.d.). The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Elsevier*. Retrieved December 9, 2023, from

Pitt, D., Werner, P., medicine, C. R.-N., & 2000, undefined. (2000). Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nature.Com*, 6(1).

Principles of neural science. (2000).

proteins, V. U.-I. disordered, & 2013, undefined. (2013). The alphabet of intrinsic disorder: II. Various roles of glutamic acid in ordered and intrinsically disordered proteins. *Taylor & Francis*, 1(1), e24684.

Rahimli, T., Hanalioğlu, Ş., Koşucu, H., & Işıkay, A. (2013). *İntrahipokampal kainik asit enjeksiyonu ile oluşturulan temporal lob epilepsi modelinde grup I metabotropik glutamat reseptörlerinin ekspresyonu ve. e-a5e3d0ffb791/intrahipokampal-kainik-asit-enjeksiyonu-ile-olusturulan-temporal-lob-epilepsi-modelinde-grup-i-metabotropik-glutamat-reseptorlerinin-ekspresyonu-ve-levetirasetamin-eskpresyona-etkisi*

Reiner, A., Neuron, J. L.-, & 2018, undefined. (2018). Glutamatergic signaling in the central nervous system: ionotropic and metabotropic receptors in concert. *Cell.ComA Reiner, J LevitzNeuron, 2018•cell.Com.*

Rose, C. R., Ziemens, D., Untiet, V., & Fahlke, C. (2018). Molecular and cellular physiology of sodium-dependent glutamate transporters. *Brain Research Bulletin*, 136, 3–16.

Rosengren, A., Braun, M., Mahdi, T., Diabetes, S. A.-, & 2012, undefined. (n.d.). Reduced insulin exocytosis in human pancreatic β -cells with gene variants linked to type 2 diabetes. *Am Diabetes Assoc.* Retrieved December 14, 2023, from

Rothstein, J., Martin, L., Levey, A., Neuron, M. D.-H.-, & 1994, undefined. (n.d.). Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Cell.ComJD Rothstein, L Martin, AI Levey, M Dykes-Hoberg, L Jin, D Wu, N Nash, RW KunclNeuron, 1994•cell.Com.* Retrieved December 9, 2023, from

Ruel, J., Emery, S., Nouvian, R., Bersot, T., Amilhon, B., Van Rybroek, J. M., Rebillard, G., Lenoir, M., Eybalin, M., Delprat, B., Sivakumaran, T. A., Giros, B., Mestikawy, S. El, Moser, T., Smith, R. J. H., Lesperance, M. M., & Puel, J.-L. (n.d.). Impairment of SLC17A8 encoding vesicular glutamate transporter-3, VGLUT3, underlies nonsyndromic deafness DFNA25 and inner hair cell dysfunction in null. *Cell.Com.*

- Sapolsky ve Teaching Company. 1996 - Google Akademik.* (n.d.). Retrieved December 2, 2023, from
- Şentürk, N. (2022). Tofacitinib. *Turkderm Turkish Archives of Dermatology and Venereology*, *56*, 67–69.
- Shupliakov, O., Örnung, G., Brodin, L., Ulfhake, B., Ottersen, O. P., Storm-Mathisen, J., & Cullheim, S. (1993). Immunocytochemical localization of amino acid neurotransmitter candidates in the ventral horn of the cat spinal cord: a light microscopic study. *Experimental Brain Research*, *96*(3), 404–418.
- Sinir Hücreleri | Sinir sistemi, Akita, Düzenleme.* (n.d.). Retrieved December 9, 2023,
- Sommer, B., & Seeburg, P. H. (1992). Glutamate receptor channels: novel properties and new clones. *Trends in Pharmacological Sciences*, *13*(C), 291–296.
- Structure, function and regulation of glutamate transporters. (2020). *Glutamate and GABA Receptors and Transporters*, 319–348.
- Sun, L., Gu, L., Wang, S., Yuan, J., Yang, H., Zhu, J., & Zhang, H. (2012). N-acetylcysteine protects against apoptosis through modulation of group I metabotropic glutamate receptor activity. *PLoS ONE*, *7*(3).
- Suwanjang, W., Holmström, K. M., Chetsawang, B., & Abramov, A. Y. (2013). Glucocorticoids reduce intracellular calcium concentration and protects neurons against glutamate toxicity. *Cell Calcium*, *53*(4), 256–263.
- Szatkowski, M., neurosciences, D. A.-T. in, & 1994, undefined. (n.d.). Triggering and execution of neuronal death in brain ischaemia: two phases of glutamate release by different mechanisms. *Cell.ComM Szatkowski, D AttwellTrends in Neurosciences, 1994•cell.Com*. Retrieved December 6, 2023, from
- Vaddi, K., & Luchi, M. (2012). JAK inhibition for the treatment of rheumatoid arthritis: A new era in oral DMARD therapy. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, *21*(7), 961–973.
- Veenman, L., Bode, J., ... M. G.-P., & 2012, undefined. (n.d.). Effects of 18-kDa translocator protein knockdown on gene expression of glutamate receptors,

- transporters, and metabolism, and on cell viability affected by glutamate. *Journals.Lww.Com*. Retrieved December 2, 2023, from
- Vincent, P., Neuroscience, C. M.-, & 2009, undefined. (n.d.). Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity. *Elsevier*. Retrieved November 27, 2023, from
- Walker, M., Microbiology, W. van der D.-J. of I., & 2016, undefined. (n.d.). The many roles of glutamate in metabolism. *Academic.Oup.Com*. Retrieved December 2, 2023,
- Walker, R., Gurven, M., Hill, K., Migliano, A., Chagnon, N., De Souza, R., Djurovic, G., Hames, R., Hurtado, A. M., Kaplan, H., Kramer, K., Oliver, W. J., Valeggia, C., & Yamauchi, T. (2006). Growth rates and life histories in twenty-two small-scale societies. *American Journal of Human Biology*, 18(3), 295–311.
- Yılmaz, Ö. (1997). *Primer mikst glia hücre kültüründe asit ortamın yarattığı toksisite*. Yun, Y., Chen, J., Wang, X., Li, Y., Hu, Z., Yang, P., & Qin, L. (2021). Tofacitinib Ameliorates Lipopolysaccharide-Induced Acute Kidney Injury by Blocking the JAK-STAT1/STAT3 Signaling Pathway. *BioMed Research International*, 2021.
- Zerangue, N., Nature, M. K.-, & 1996, undefined. (n.d.). Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature.ComN Zerangue, MP KavanaughNature, 1996•nature.Com*. Retrieved December 9, 2023, from
- Zhu, H., Jian, Z., Zhong, Y., Ye, Y., Zhang, Y., Hu, X., Pu, B., Gu, L., & Xiong, X. (2021). Janus Kinase Inhibition Ameliorates Ischemic Stroke Injury and Neuroinflammation Through Reducing NLRP3 Inflammasome Activation via JAK2/STAT3 Pathway Inhibition. *Frontiers in Immunology*, 12.
- Zou, J., research, F. C.-B., & 2005, undefined. (n.d.). TNF α potentiates glutamate neurotoxicity by inhibiting glutamate uptake in organotypic brain slice cultures: neuroprotection by NF κ B inhibition. *Elsevier*.

