



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

CYSTEİN-S-SULFAT'IN SİTOTOKSİK VE
GENOTOKSİK ETKİLERİNİN NÖRONAL HÜCRE
DİZİNDE İNCELENMESİ

Dr. Volkan TEKİN

Haziran 2019
DENİZLİ

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**CYSTEİN-S-SULFAT'IN SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK
ETKİLERİNİN HT-22 HÜCRE DİZİSİNDE İNCELENMESİ**

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

Dr. Volkan TEKİN

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Vural KÜÇÜKATAY

Denizli, 2019

Pamukkale Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği Uygulama Esasları Yönergesi Madde 24-(2) “Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora öğrencileri için: Doktora tez savunma sınavından önce, doktora bilim alanında kendisinin yazar olduğu uluslararası atıf indeksleri kapsamında yer alan bir dergide basılmış ya da basılmak üzere kesin kabulü yapılmış en az bir makalesi olan öğrenciler tez savunma sınavına alınır. Yüksek lisans tezinin yayın haline getirilmiş olması bu kapsamda değerlendirilmez. Bu ek koşulu yerine getirmeyen öğrenciler, tez savunma sınavına alınmazlar” gereğince yapılan yayın/yayınların listesi aşağıdadır (Tam metin/metinleri ekte sunulmuştur):

Ek-1. Dodurga Y, Gundogdu G, **Tekin V**, Koc T, Satiroglu-Tufan L, Bagci G, Kucukatay V. Valproic acid inhibits the proliferation of SHSY5Y neuroblastoma cancer cells by downregulating URG4/URGCP and CCND1 gene expression. *Mol. Biol Rep* 2014; 41:4595-4599

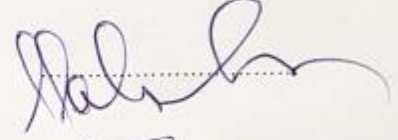
Ek-2. Kilic-Toprak E, Yapici A, Kilic-Erkek O, Koklu Y, **Tekin V**, Alemdaroglu U, Bor-Kucukatay M. Acute effects of Yo-Yo intermittent recovery test level 1 (Yo-YoIR1) on hemorheological parameters in female volleyball players. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2015 jul 16; 60(2): 191-9

DOKTORA TEZİ ONAY FORMU

Dr. Volkan TEKİN tarafından Prof. Dr. Vural KÜÇÜKATAY yönetiminde hazırlanan "Cystein-S-Sulfat'ın Sitotoksik ve Genotoksik Etkilerinin Nöronal Hücre Dizisinde İncelenmesi" başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

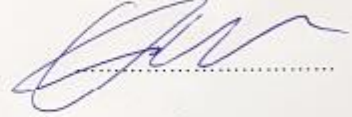
Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Sadettin ÇALIŞKAN
Pamukkale Üniversitesi



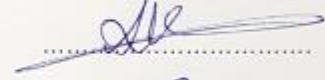
Danışman:

Prof. Dr. Vural KÜÇÜKATAY
Pamukkale Üniversitesi



Üye:

Prof. Dr. Aysel AĞAR
Akdeniz Üniversitesi




Üye:

Prof. Dr. Esat ADIGÜZEL
Pamukkale Üniversitesi

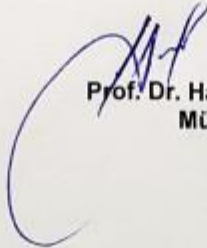


Üye:

Prof. Dr. Gülten ERKEN
Balıkesir Üniversitesi



Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 19.06.2019 tarih ve 2019-01-15 sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof. Dr. Hakan AKÇA
Müdür

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı : Dr.Volkan TEKİN

İmza :



ÖZET

CYSTEİN-S-SULFAT'IN SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN NÖRONAL HÜCRE DİZİSİNDE İNCELENMESİ

Dr. Volkan TEKİN
Doktora Tezi, Fizyoloji AD
Tez Yöneticisi: Prof. Vural KÜÇÜKATAY
Haziran 2019, 61 Sayfa

Sülfid, kükürt içeren amino asit metabolizması sonucu ortaya çıkan toksik bir moleküldür. Sülfid metaboliti olan Cystein-S-Sulfat (SSC), glutamat benzeri eksitotoksik etki göstermektedir. SSC, Sülfid Oksidaz (SOX) Enzim eksikliği olan hastaların idrarında ve plazmasında yoğun miktarda tespit edilmektedir. SSC toksisitesinin, SOX enzim eksikliğindeki ağır nöropatolojinin sebebi olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada, SSC molekülünün sitotoksik ve genotoksik etkilerinin HT-22 fare hipokampus hücre dizini kullanılarak gösterilmesi amaçlanmıştır. %10 fetal bovin serumu (FBS), %1 L-glutamin, 100IU/ml penisilin/10mg/ml streptomisin ve yüksek glukoz içeren DMEM içerisinde çözdürülerek besi yeri olarak kullanılmıştır. Yöntem olarak; sitotoksite ölçümü için WST-1 testi kullanılmıştır. SSC LD₅₀ dozunu belirlemek için hücrelere çeşitli konsantrasyonlarda SSC (her bir kuyucukta 5-300 µM'larda olacak şekilde) uygulanıp WST-1 çalışılmış ve probit analizi yapılmıştır. SSC (LD₅₀ dozu 125 µM) ile birlikte NMDA reseptör antagonisti olan Memantin (20 µM) molekülü, glutamat metabotropik reseptör antagonisti olan LY341495 (10 µM) molekülü uygulanmıştır. Genotoksite analizi için deney gruplarına bahsedilen tedaviler verildikten sonra Comet Analizi yöntemi çalışılmıştır. Comet analizi için Comet Assay IV programı kullanılmıştır. Apoptotik süreci aydınlatmak için Kaspaz-3 aktivite tayini, ilaç verilen gruplarla ve kontrol grubunda çalışılmıştır. Antioksidan kapasiteyi ölçmek için hücre içi Total Glutasyon Ölçümü gerçekleştirilmiştir. Çalışmamız sonucunda, SSC'nin sitotoksik etkileri olduğu ancak Comet Analizi sonucunda genotoksik etkisinin mevcut dozlarda olmadığı gösterilmiştir. SSC'nin kaspaz-3 aktivitesini artırmadığı gözlenmiştir. SSC'nin hücre içi total glutasyon miktarını artırdığı görülmüş, bu durum oksidan strese karşı gelişen kompanzatuvar bir mekanizma olarak değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Cystein-S-Sulfat, S-Sulfosistein, Genotoksite, Sitotoksite, Comet Analizi

Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2017SABE006).

ABSTRACT

EXAMINATION OF CYSTEINE-S-SULFATE'S CYTOTOXIC AND GENOTOXIC EFFECTS ON NEURONAL CELL LINE

TEKİN, Volkan (MD)
Phd, Thesis in Physiology
Supervisor: Prof. Vural Küçükataş (Phd)
June 2019, 61 Pages

Sulfite is a toxic molecule resulting from sulfur-containing amino acid metabolism. The sulfide metabolite Cysteine-S-Sulfate (SSC) shows an excitotoxic effect like glutamate. SSC is detected in the urine and plasma of patients with Sulfite Oxidase (SOX) enzyme deficiency. It is thought that SSC toxicity may be the cause of severe neuropathology in SOX enzyme deficiency. In this study, the cytotoxic and genotoxic effects of the SSC molecule were aimed to be demonstrated using the HT-22 mouse hippocampus cell line. 10% fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine, 100IU / ml penicillin / 10mg / ml streptomycin and high glucose DMEM were used as medium. As a method; WST-1 test was used for cytotoxicity measurement. In order to determine the dose of SSC LD₅₀, various concentrations of SSC (with 5-300 300M in each well) were applied to the cells and WST-1 was studied and probit analysis was performed. Memantine (20 µM) molecule which is NMDA receptor antagonist and LY341495 (10 µM) molecule which is glutamate metabotropic receptor antagonist has been applied with SSC (LD₅₀ dose 125 µM). After the mentioned treatments were given to the experimental groups for the genotoxicity analysis, Comet Analysis method was studied. Comet Assay IV program was used for Comet analysis. In order to elucidate the apoptotic process, caspase-3 activity was studied in the drug-treated groups and in the control group. Intracellular Total Glutathione Measurement was performed to measure the antioxidant capacity. In our study, it was shown that SSC had cytotoxic effects but the genotoxic effect was not present in the current doses as a result of Comet Analysis. It was observed that SSC did not increase caspase-3 activity. SSC was found to increase the amount of intracellular total glutathione and was evaluated as a compensatory mechanism against oxidant stress.

Keywords: Cysteine-S-Sulfate, Genotoxicity, Cytotoxicity, Comet Assay, S-Sulfocysteine

This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project number: 2017SABE006).

TEŞEKKÜR

Değerli Danışman Hocam Prof. Dr. Vural KÜÇÜKATAY'a bana karşı olan sabrı ve yönlendiriciliği için teőekkürlerimi sunmak istiyorum. Ayrıca Anabilim dalımızın değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Sadettin ÇALIŞKAN'a ve Prof. Dr. Melek BOR-KÜÇÜKATAY'a ve çalıőmamın her aşamasında desteklerini esirgememiő Fiziyojji asistanı Dr. Burak OYMAK'a, Dr. Fatih ALTINTAŐ'a, Melek TUNÇ ATA'ya ve bütün asistan arkadaşlarıma; Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalından Araő. Gör. Dr. Levent ELMAS'a yardımları için çok teşekkür ederim. Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim dalından Doç. Dr. Betül KARADEMİR ve asistanı Sema Arslan'a hücre kültüründeki destekleri için çok teşekkür ederim. Tez çalışması, zorlu sabır isteyen bir süreç. Bu süreçte en çok etkilenen hayatı paylaőtığınız insanlar oluyor ve en çok da onlarsız geçirdiğiniz zamana onlara gösteremediğiniz ilgiden yakınıyorsunuz. Bu zorlu dönemde benden sabrını ve sevgisini eksik etmeyen sevgili eőim Dr. Rukiye TEKİN'e ve biricik oğlum Uygur Oktay TEKİN'e çok teşekkür ederim. Beni yetiőtirip bugünlere getiren annem ve babama sonsuz őükranlarımı sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
1.GİRİŞ.....	1
1.1. AMAÇ	2
2.KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI	3
2.1. Nörodejeneratif Hastalıklar	3
2.1.1. Nörodejeneratif Hastalıkların Oluşumundaki Mekanizmalar	4
2.1.2. Nörodejenerasyon ve Kükürt.....	7
2.2. Kükürt İçeren Aminoasit Metabolizması	8
2.2.1. Remetilasyon ve Transsülfürasyon Yolakları.....	8
2.2.1.1. Metiyonin Metabolizması	8
2.2.1.2. Homosistein Metabolizması.....	10
2.2.1.3. Sistein Metabolizması	11
2.2.1.4. Sülfid Metabolizması	13
2.3. SOX Enzim Eksikliği.....	14
2.4. Sistein-S-Sülfat (Cysteine-S-sulfate, S-Sulfocysteine, SSC).....	16
2.5. Glutamat	18
2.5.1. Glutamat Reseptörleri	18
2.5.2 Glutamat Taşıyıcıları	20
2.6. Hipotez	21
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	22
3.1. HT-22 Hücre Dizini	22
3.1.1. HT-22 Hücrelerinin çözdürülmesi.....	22
3.1.2. HT-22 Hücrelerinin çoğaltılması ve pasajlanması	23
3.1.3. HT-22 Hücrelerinin Sayılması	23
3.1.4. HT-22 Hücrelerinin Dondurulması.....	24
3.2. HT-22 Hücrelerinin Diferansiye Edilmesi	25
3.3. Deneyler	25
3.3.1. WST-1 Hücre Sitotoksosite Testi.....	25
3.3.1.1. SSC LD50 Dozu Belirlenmesi.....	25
3.3.1.2. SSC Toksitesinin Zamana Bağlı Değişimi	26

3.3.1.3. Glutamat Reseptör Blokörlerinin SSC Toksitesinin Önlenmesindeki Rolünün Araştırılması	26
3.3.1.4. Farklı Dozlardaki Glutamat Reseptör Blokörlerinin SSC Toksitesini Önlemedeki Rolünün Araştırılması	27
3.3.1.5. Glutamat Reseptör Blokörlerinin HT-22 Hücreleri Üzerine Toksik Etkilerinin Araştırılması	28
3.3.2. Hücre içi Total Glutasyon Ölçümü	28
3.3.3. Kaspaz-3 (Caspase-3) Aktivitesinin Tayini	31
3.3.4. Comet Analizi.....	33
3.3.4.1. Görüntü Analizi.....	35
3.4. İstatistiksel Analiz	36
4. BULGULAR	37
4.1. WST-1 Testi Sonuçları.....	37
4.1.1. SSC LD50 Dozu Belirleme.....	37
4.1.2. SSC Toksitesinin Zamana Bağlı Değişimi	38
4.1.3. Glutamat Reseptör Blokörlerinin SSC Toksitesinin Önlenmesindeki Rolünün Araştırılması	38
4.1.4. Farklı Dozlardaki Glutamat Reseptör Blokörlerinin SSC Toksitesini Önlemedeki Rolünün Araştırılması	39
4.1.5. Glutamat Reseptör Blokörlerinin HT-22 Hücreleri Üzerine Toksik Etkilerinin Araştırılması	40
4.2. Hücre içi Total Glutasyon Ölçümü	40
4.3. Kaspaz 3 (Caspase 3) Aktivitesinin Tayini.....	41
4.4. Comet Analizi Sonuçları	42
4.4.1. Comet Analizinin Görüntüleri	42
4.4.2. Comet Analizi Verilerinin Grafikleri.....	43
5. TARTIŞMA	44
6. SONUÇLAR	53
7. KAYNAKLAR	54
8. ÖZGEÇMİŞ	61
9. EKLER	

Ek-1. Dodurga Y, Gundogdu G, **Tekin V**, Koc T, Satiroglu-Tufan L, Bagci G, Kucukatay V. Valproic acid inhibits the proliferation of SHSY5Y neuroblastoma cancer cells by downregulating URG4/URGCP and CCND1 gene expression. *Mol. Biol Rep* 2014; 41:4595-4599

Ek-2. Kilic-Toprak E, Yapici A, Kilic-Erkek O, Koklu Y, **Tekin V**, Alemdaroglu U, Bor-Kucukatay M. Acute effects of Yo-Yo intermittent recovery test level 1 (Yo-YoIR1) on hemorheological parameters in female volleyball players. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2015 jul 16; 60(2): 191-9

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Memelilerde Sülfür İçeren Aminoasitlerden Metiyoninden Sistein Oluşumu.....	9
Şekil 2. Metiyoninden Sülfata, sülfid içeren aminoasit metabolizması	11
Şekil 3. Sistein katabolizması esnasında sülfid oluşumu	12
Şekil 4. Memelilerde Sistein Metabolizması	13
Şekil 5. İnorganik Sülfid Döngüsü	14
Şekil 6. SOX tarafından katalizlenen reaksiyon.....	16
Şekil 7. Cysteine-S-Sulfate	17
Şekil 8. Sistein Yolağı, SSC oluşumu.....	18
Şekil 9. Glutamat	18
Şekil 10. Thoma Lamı	24
Şekil 11. SSC' nin artan dozlarda verilen sitotoksiteye yanıtın ölçülmesi.....	37
Şekil 12. SSC Toksitesinin Kontrol grubuna kıyasla 1,2,6,12,24. saatlerdeki zamana bağlı değişimi.	38
Şekil 13. SSC ve Glutamat Reseptör Blokörlerinin birlikte ve tek başlarına sitotoksik etkilerinin araştırılması.	38
Şekil 14. Glutamat Reseptör Blokörlerinin Farklı Dozlarıyla birlikte SSC verilmesi ile hücrelerde oluşan toksitenin kontrol grubuyla karşılaştırılması.	39
Şekil 15. Glutamat Reseptör Blokörlerinin Farklı Dozlarda HT-22 Hücreleri üzerine toksik etkilerinin araştırılması	40
Şekil 16. Glutamat Reseptör Blokörlerinin ve SSC ile tek başlarına ve birlikte verildiklerinde hücre içi total glutatyon düzeylerinin incelenmesi.....	40
Şekil 17. Glutamat Reseptör Blokörlerinin ve SSC ile tek başlarına ve birlikte verildiklerinde Kaspaz 3 aktivitelerinin tayini ve kontrol grubuna göre kıyaslanması. ...	41
Şekil 18. Deney gruplarının Comet Analizi Görüntüleri.	42
Şekil 19. Comet Analizi sonucunda elde edilen değerlerin grafikleri.....	43

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

2D-DIGE.....	2 dimensional-differential image gel electrophoresis
AH.....	Alzheimer Hastalığı
AMPA.....	Alfa-amino-3-hidroksi-5-metilizoksazol-propionik asit
ALS.....	Amiyotrofik Lateral Sklerozis
AIF.....	Apopitoz indükatör faktör
ATP.....	Adenil trifosfat
β	Beta
DMSA/Ag ₂ S QDs.....	Meso-2,3-dimerkaptosüksinik asit+ gümüş sülfid kuantum noktaları
EAAT.....	Eksitatör Amino Asid Taşıyıcıları
GABA.....	γ -aminobutyric acid
γ -G.....	γ -Glutamiltransferaz
GR.....	Glutasyon redüktaz
GSH.....	Redükte Glutasyon
GSSH.....	Glutasyon Disülfid
H ₂ S.....	Hidrojen Sülfür
H ₂ SO ₃	Sülfüroz Asit
LD ₅₀	Lethal Dose
LTP.....	Long term potentiation
LY.....	LY341495
M.....	Memantin
MAT.....	Metiyonin adenozil transferaz
μ	Mikro
MTHF.....	Metiltetrahidrofolat
NB.....	Neurobasal
NMDA.....	N-Metil-D-Aspartat
NMDA-R.....	N-Metil-D-Aspartat Reseptörü
ROS.....	Reaktif Oksijen Molekülleri
SAH.....	S-Adenozilhomosistein
SAM.....	S-Adenozilmetiyonin
SO ₂	Kükürt Dioksit
SO ₃ ⁻	Sülfid
SOX.....	Sülfid Oksidaz
SSC.....	Cysteine-S-Sulfate
VGLUT.....	Veziküler Glutamat Taşıyıcısı

1.GİRİŞ

İnsanı tanımlayan saç ve göz rengi, boy uzunluğu gibi birçok özellik vardır. Ancak insanları tanımlarken, bu özelliklerin dışında o insanların kişilik özellikleri ile tanım yapmaktayız. Kişilik özellikleri ise beynin normal işleyen fonksiyonları ile ancak var olabilmektedir. Başka bir deyişle insanı tanımlayan beyndir. Beyinde oluşabilecek patolojik herhangi bir değişiklik o kişiyi olduğu kişiden uzaklaştırmaktadır. Elbette vücudumuzun işlerliğini sağlayan her sistem önem arz etmektedir. Ancak kişiliği, karmaşık düşünebilme yetisi ile insanı diğer canlılardan ayıran yegane organ beyindir. Beynin de dahil olduğu Santral Sinir Sistemi (SSS)'nin rahatsızlıkları yıkıcı sonuçlara neden olmaktadır. Bunlardan başlıcaları Nörodejeneratif hastalıklardır.

Nörodejenerasyonla seyreden hastalıklar, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde yaşlanan toplumla birlikte her geçen gün karşımıza daha sık çıkmakta ve yaşam kalitesini önemli ölçüde etkilemektedir. Nörodejenerasyon, nöronların yapısal ilerleyici hasarı veya fonksiyon kaybı ile karakterize nöron ölümü ile sonuçlanan bir süreçtir. En çok görülen nörodejeneratif hastalıklar; Amiyotrofik lateral sklerozis (ALS), Alzheimer Hastalığı (AH), Parkinson Hastalığı, Huntington Hastalığı' dır (Maragakis ve Rothstein, 2006). Bu hastalıklarda izlenen nörodejenerasyon oluşum mekanizmaları genel hatları itibariyle; genetik faktörler, protein agregasyon hataları, membran hasarı, oksidatif stres ve programlı hücre ölümü gibi mekanizmalardan oluşmaktadır. Bu tip hastalıklarda kükürt içeren amino asitlerin metabolizmasındaki bozukluklar ortak özellik olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu hastaların plazmalarındaki homosistein düzeylerindeki artış bu bozukluğun kanıtı olarak görülmektedir. Nörotoksik etkileri yoğun olarak çalışılmış bu aminoasit oluştuktan sonra fizyolojik olarak iki yolla derhal ortamdaki uzaklaştırılır. Bunlar remetilasyon ve transsülfürasyon yollarıdır. Homosistein, remetilasyonla metiyonine dönüşürken, transsülfürasyonla sistein amino asidine çevrilmektedir. Homosistein toksitesinden hücrenin zarar görmemesi için hücre dışına verildiği ve plazmada

düzeşinin de bu sebepten yükseldiği öne sürölmektedir. (Brosnan ve Brosnan, 2006; Maccoss vd 2001)

Nörodejeneratif bozukluklarda, homosistein yüksekliğinin yanında plazma sistein seviyesinin yükseldiği ve sülfat seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir. Sülfat molekülü ise, sistein metabolizması sonucu oluşan sülfid molekülünün Sülfid oksidaz enzimi ile girdiği reaksiyonun son ürünüdür (Kisker vd 1997; Maccoss vd 2001). İzole Sülfid Oksidaz (SOX) enzim yetersizliği ve/veya Molibden Kofaktör defekti sonucu sülfid oksidaz yetersizliği oluşmaktadır. Sülfid oksidaz yetersizliği yeni doğan dönemde karşımıza çıkmaktadır. Nörodejenerasyonla seyreden ve ilerlemiş bir hastalık tablosuna neden olmaktadır. Bu ağır dejenerasyon sonucu klinikte; mental retardasyon, karakteristik dismorfik görünömler, lens dislokasyonları ve epileptik nöbetler sıkça gözlenmektedir. Yaşamanın ilk iki yılında ölümlle sonuçlanan ağır bir tablo karşımıza çıkmaktadır (Belaidi ve Schwarz, 2013).

Yapılan çalışmalarda, sülfid oksidaz yetersizliğinde plazma ve idrarda Sistein-s-Sülfat (Cysteine-s-Sulfate, S-sulfocysteine, SSC), tiyosülfat, sülfid molekülü yüksek oranda tespit edilirken, sülfat miktarında azalma görölmüştür (Kumar vd 2017).

SSC molekülü yapısal olarak glutamat molekülüne benzerlik göstermektedir. Bu benzer yapısının, N-metil-D-aspartat reseptör (NMDA-R) agonisti olarak etki göstermesinde temel etkenlerden olduğu düşünölmektedir. Ayrıca hücre içine kalsiyum girişini artırmakta, nörotoksik etkilere sebep olmaktadır. Bu nörotoksik etkilerin sülfid kaynaklı mı SSC kaynaklı mı olduğuna dair net bir fikir birliğine varılamamış olsa da yapılan bir çalışmada SSC'nin nöronal membran potansiyelini depolarize ettiği gösterilmiş ve toksisitenin SSC'nin NMDA-R aktivasyonu üzerinden oluşturulduğu bildirilmiştir (Kumar vd 2017).

Yapılan az sayıda araştırmada SSC' nin nörotoksik etkileri gösterilmişse de, bu etkinin ortaya çıkmasındaki mekanizmalar yeterince aydınlatılamamıştır.

1.1. AMAÇ

Bu çalışmada, sülfid molekülünün detoksifiye edilmesinde bir bozukluk durumunda vücutta artan bir metabolit olan SSC molekülünün nöronlar üzerine olan muhtemel toksik etkisinin teyit edilmesi ve bu etkinin ortaya çıkmasındaki olası mekanizmaları araştırmak amaçlanmıştır. Bu maksatla, HT-22 hücre dizini kullanarak SSC toksisitesi, sitotoksite, genototoksite ve apoptozis açısından araştırılmıştır.

2.KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Nörodejeneratif Hastalıklar

Nörodejenerasyonla seyreden bozukluklar beynin belirli bölgelerindeki nöronal hücrelerin ilerleyici ve geri dönüşsüz kaybı ile karakterizasyon gösteren patolojik bir gruba içermektedir. Nörodejeneratif hastalıklar, toplumda göreceli olarak yaş artışıyla birlikte sık görülmektedir. Tıbbi ve sosyal açıdan önemli problemler doğurmaktadır. Ülkelerin sağlık giderlerinde de her geçen gün belirgin bir artışa sebep olmaktadır. Bu patolojilerin çocukluktan başlayan formları mevcut olsa da, genel olarak ilerleyen yaşlarda karşımıza çıkan çeşitleri ön plandadır.

65 yaş üstü bireylerin %1-2'sinde Parkinson hastalığı, %10 kadarında Alzheimer hastalığı görülmektedir. Huntington hastalığı, daha nadir karşımıza çıkan otozomal dominant geçişli bir hastalıktır ve bu geni taşıyan ailelerde her bir jenerasyonun %50'si hastalıktan etkilenir. ALS göreceli olarak nadirdir; lakin hızlı ve agresif bir seyir gösterir. Çoğunlukla seri bir şekilde sakatlık ve ölüme sebep olan bir hastalıktır (Burns ve Iliffe, 2009, Dayalu ve Albin, 2015, Sveinbjornsdottir, 2016).

Günümüzde bu hastalıkların belirgin kür sağlayan bir tedavisi bulunamamış olup daha ziyade semptomatik tedavi ile sınırlıdır. Parkinson hastalığının semptomatik tedavisi diğer nörodejeneratif hastalıklara kıyasla daha başarılıdır. ALS, Huntington hastalığı ve Alzheimer hastalığında tedavi seçenekleri daha kısıtlıdır.

Nörodejeneratif hastalıklar incelendiğinde her hastalıkta farklı nöron gruplarının özellikle etkilendiği görülecektir. Parkinson hastalığında karakteristik olarak substantia nigra pars kompaktadaki dopaminerjik nöron hücrelerinde yaygın hasar görülmektedir. Korteks ve diğer beyin bölgelerindeki nöronlar ise etkilenmemektedir. AH'ında ise aksine hipokampus ve neokortekste nöron hasarı yüksek düzeyde oluşmakta ve kortekste farklı fonksiyonel lokalizasyonlarda değişiklikler göstermektedir. Huntington hastalığında, temel patolojik değişiklikler neostriatumda gözlenmektedir. Ancak hastalıkla ilişkili mutant gen beyin ve birçok başka organda eksprese edilmektedir. ALS hastalığında nöronal kayıplar spinal motor nöronlarında ve kortikal nöronlarda meydana gelmektedir. Nörodejenerasyon paternleri çeşitlilik göstermektedir. Bu çeşitlilik, nörodejenerasyonun,

genetik ve çevresel faktörlerden etkilenen nöron gruplarının intrinsek fizyolojik özellikleri arasındaki etkileşimlerle ortaya çıktığını düşündürmektedir.

2.1.1. Nörodejeneratif Hastalıkların Oluşumundaki Mekanizmalar

a) Genetik Faktörler

Birçok nörodejeneratif hastalıkta genetik mutasyonlar gözlenmektedir. Bunların çoğundaki ortak özellik CAG (Sitozin (C), Adenin (A), Guanin (G)) üçlüsünün tekrarıdır. CAG tekrarı poliglutamin yolunda bozukluklara neden olmaktadır. Fazla glutamin protein katlanmasında ve degradasyonunda hatalara neden olmaktadır (Marsh vd 2009; Orr, 2009). Huntington Hastalığı başta olmak üzere dokuz nörodejeneratif hastalığın patogenezinde poliamin yolağı bozukluğu ve CAG trinükleotid tekrar bozukluğu izlenmiştir (Zoghbi ve Orr, 2009).

b) Protein Katlanma Hataları

Birçok nörodejeneratif hastalık, hatalı katlanan proteinlerin agregasyonu ile ilişkili proteopatiler olarak sınıflandırılırlar. Alfa-sinüklein, patolojik durumlarda Lewy cisimcikleri olarak çözünmeyen fibriller halinde agregate olur. Lewy cisimcikleri Parkinson Hastalığı'nda görülmektedir. Ayrıca alfa-sinüklein fragmanının, Alzheimer Hastalığı'nda görülen amiloid plakların yapısına katıldığı bulunmuştur. Bir başka hatalı katlanan hiperfosforile Tau proteini, Alzheimer Hastalığı'nda görülen nörofibriller düğümünün ana komponentidir. Beta-amiloid proteini de yine Alzheimer'da senil plakların ana komponentidir (Sekiguchi vd 2018; Turner vd 2003).

c) Hücre içi Mekanizmalar

- Protein Degradasyon Yolağı

Parkinson Hastalığı ve Huntington Hastalığı da dahil olmak üzere birçok geç başlangıçlı nörodejeneratif hastalık, toksik proteinler tarafından hücre içi agregasyonu ile ilişkilidir. Huntington ve Parkinson'da sitozolde agregasyon görülürken; spinoserebellar ataksi tip 1'de nükleusta, nöroserpin inklüzyon cisimcikli ailesel ensefalopatide endoplazmik retikulumda, Alzheimer'da da amiloid beta proteinler ekstrasellüler aralığa agregate olmaktadır. (Rubinsztein, 2006).

- Membran hasarı

Monomerik veya oligomerik proteinler tarafından oluşturulan organel membranlarındaki hasarlar, bu hastalıklara katkıda bulunabilir. Alfa-sinüklein, membran kurvaturunu indükleyerek zarlara zarar verebilir ve yapay fosfolipid veziküllerle inkübe edildiğinde geniş tübülayon ve vezikülasyonlara neden olabilir. (Varkey vd 2010)

- Mitokondrial disfonksiyon

Nörodenerasyona bağlı hücre ölümünde en genel yol intrinsek mitokondrial apoptotik yoldur. Bu yolak Kaspaz-9 aktivasyonunu, intermembranöz aralıktan salınan sitokrom c'nin salınımının düzenlenmesi ile kontrol etmektedir. Mitokondrial reaksiyonlar sonucu reaktif oksijen molekülleri meydana gelmektedir. Bu meydana gelen reaktif oksijen moleküllerinin konsantrasyonları, glutatyon peroksidaz ve superoksit dismutaz gibi mitokondrial antioksidan ajanların seviyesine bağlıdır. Reaktif oksijen molekülleri antioksidan kapasitenin üzerinde üretildiğinde patolojik değişiklikler meydana gelmektedir. Bu patolojik değişiklikler aynı zamanda nörodejeneratif hastalıkların oluşumunda da rol oynamaktadır. Bu patolojik değişiklikler genel olarak; kalsiyum dengesinde bozukluk, mitokondrial membranlarda lipid konsantrasyonlarında değişimler gibi fizyopatolojik değişimlerdir (DiMauro ve Schon, 2008; Lin ve Beal, 2006; Liu vd 2017; Wang vd 2017). Mitokondrial disfonksiyon ve oksidatif stresin nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde yer aldığı birçok çalışmada ortaya konmuştur (Barnham vd 2004; Coppè ve Stoccoro, 2019).

- DNA Hasarı

Beyindeki oksidatif reaksiyonlar sonucu oluşan reaktif oksijen molekülleri, DNA hasarının temel sebeplerinin başında yer almaktadır. Genel olarak DNA onarım mekanizmalarındaki bozukluklar olarak karşımıza çıkmaktadır. Yaşa bağlı değişimler, onarım mekanizmalarındaki bozukluklar nörodejenerasyona yol açmaktadır. Beyindeki oksidatif strese bağlı artmış DNA hasarının Alzheimer, ALS vs. gibi nörodejeneratif hastalıklara yol açtığı yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. (Madabhushi vd 2014; Wang vd 2017)

- Aksonal Transport

Alzheimer, Parkinson ve ALS gibi birçok nörodejeneratif hastalıkta, proteinlerin anormal birikimleri ile oluşan aksonal patolojiler patogeneizde rol oynamaktadır. Bu tür patolojiler, patojenik işlemin bir parçası olarak aksona verilen hasarı ve özellikle de yüklerin aksonlar yoluyla taşınmasında oluşan hasarı vurgulamaktadır. Aslında, aksonal transportun bozulmasının bu hastalıkların çoğunda erken ve belki de nedenleri arasında yer alan bir olay olduğu düşünülmektedir. (De Vos vd 2008)

d) Programlanmış hücre ölümü

Alzheimer, Parkinson, Huntington ve ALS gibi nörodejeneratif hastalıklarda programlanmış hücre ölümünün her hangi bir formu ile hücre ölümünün gerçekleştiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Vila ve Przedborski, 2003).

- Apoptozis (tip I)

Çok hücreli organizmalardaki en yaygın programlı hücre ölümü formudur. İki yolağa ayrılır:

Ekstresek Apoptoz yolağı: Kaspaz 8-10 aktiftir

İntresek Apoptoz yolağı : Sitokrom c salınımı veya endoplazmik retikulumdaki fonksiyon bozukluğu sonucu kaspaz-9 aktifleşmesi ile gerçekleşir. (Bredesen vd 2006)

- Otofajik (tip II)

Kanıtlanmış değildir. Hipotez aşamasındadır. Yapım bozukluğu olan hücrelerin, hücre içi lizozomlar yardımı ile yok edildiği düşünülmektedir. (Bredesen vd 2006)

- Sitoplazmik (tip III)

Programlı hücre ölümünün buradaki mekanizması tam olarak anlaşılammış olup non-apoptotik süreçle ilerlediği düşünülmektedir. (Bredesen vd 2006)

e) Transglutaminaz Aktivite Artışı

Birçok toksik protein agregatları, transglutaminaz aktivitesi ile katalize edilen izopeptit bağları ile karakterizedir. Nörodejeneratif hastalıklara spesifik proteinler olan tau, amiloid beta, alfa-sinüklein ve huntington in vivo ve in vitro çalışmalarda transglutaminaz substratları olarak gösterilmiştir. Bu bulgulardan yola çıkılarak, transglutaminazların nörodejenerasyonda önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir. (Caccamo vd 2010)

2.1.2. Nörodejenerasyon ve Kükürt

Nörodejeneratif hastalık terimi, farklı klinik özellikleri olan etiyolojileri tam aydınlatılmamış geniş bir nörolojik bozukluk grubunu tarif eder. Motor Nöron hastalıkları, Alzheimer Hastalığı ve Parkinson hastalığı bu tarif içerisine giren hastalıklardır. Bu tip hastalıkların önemli bir ortak özelliği bozulmuş kükürt içeren amino asit metabolizmasıdır. Bu bozukluğun kanıtı ise yine bu hastaların plazmalarında artmış olarak bulunan homosistein düzeyidir. Nörotoksik etkileri bilinen bu aminoasit oluştuktan sonra temel olarak 2 yolla derhal ortamdaki uzaklaştırılır: Bunların ilkinde homosistein remetilasyona uğrayarak tekrar metiyonine çevrilir. İkincisinde ise transsülfürasyon ile sistein amino asidine çevrilir. Sağlıklı bireylerde 5-10 µmol/L civarındaki plazma homosistein düzeylerinin, yukarıda sayılan pek çok nörodejeneratif bozuklukta artması, bu aminoasidin hücre içi metabolizmasındaki bir bozukluğu göstermektedir. Bu durumda homosistein toksitesinden hücrenin zarar görmemesi için hücre dışına verildiği ve plazmada düzeyinin de bu sebepten yükseldiği öne sürülmektedir (Brosnan ve Brosnan, 2006; Gündoğdu, 2012; Maccoss vd 2001; Dikmen, 2004).

Çalışmalarda, yine bu grup bozukluklarda homosisteine ilaveten plazma sistein düzeyinin yükseldiği ve sülfat düzeyinin azaldığı gösterilmiştir. Bu bulgular, homosistein metabolizmasında transsülfürasyon yolağının sağlam olduğunu göstermektedir. Sülfat molekülü ise sistein katabolizmasının son ürünüdür. Sistein katabolizması esnasında, ardışık bir seri reaksiyon sonucu oluşan sülfat, sülfid adı verilen molekülden sülfid oksidaz enzimi aracılığı ile oluşturulmaktadır. Oldukça toksik bir molekül olan sülfidin, sülfid oksidaz enzimi ile sülfata çevrilerek detoksifiye edilmesi hayati önem taşır. Bu detoksifikasyonun yapılamamasının yaşama bağdaşmadığı gösterilmiştir (Garrett vd, 1998).

2.2. Kükürt İçeren Aminoasit Metabolizması

Proteinler, 20 farklı aminoasitten oluşurlar. Bu amino asitler birbirlerinden yük, büyüklük, hidrojen bağı gibi çeşitli fiziksel ve kimyasal farklılıklar gösterir. Amino asitler α -karbonuna amino gurubu, karboksil grubu, hidrojen atomu ve bir yan (-R) grup bağlanmasıyla meydana gelen organik bileşiklerdir; $R-CH(NH_2)-COOH$ şeklinde formül halinde gösterilirler.

Amino asitler R gruplarındaki farklılıklara göre özellik ve isim kazanır. Hidrofilik veya hidrofobik olmaları R gruplarının elektriksel özelliklerine ve yapılarına göre şekillenmektedir. Yine R gruplarına bağlı olarak suda çözünürlük özellikleri de değişmektedir. Genel olarak R gruplarına göre sınıflandırılırlar (Brosnan vd 2006).

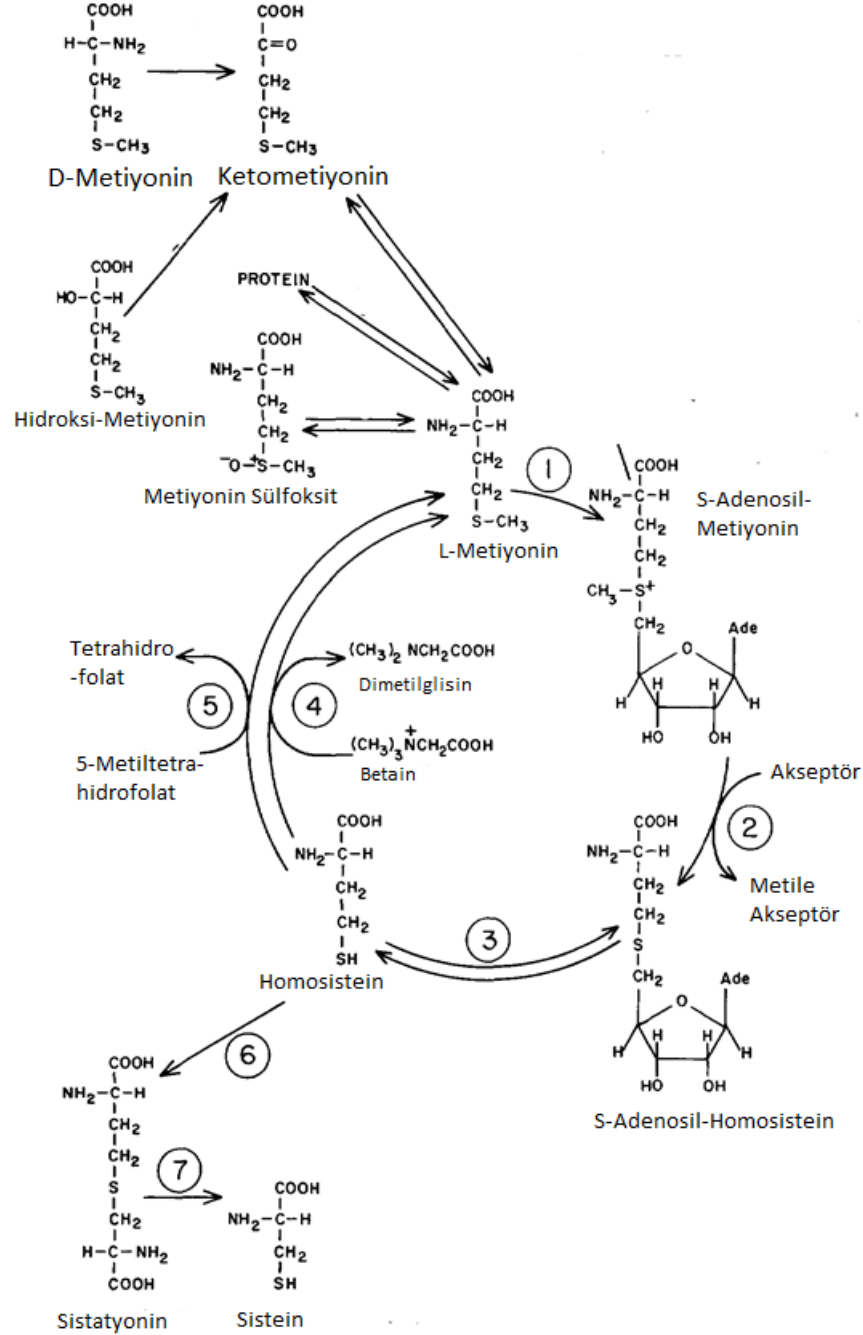
Kükürt içeren amino asitler: "Metiyonin, Homosistein, Sistein ve Taurin"dir. Metiyonin ve sistein hücre metabolizmasına ve protein yapısına katılırken, homosistein ve taurin protein yapısına katılmamaktadır. Bu sebeple metiyonin ve sistein metabolizması sülfat metabolizmasını kavrayabilmemiz için önem arz etmektedir (Brosnan vd 1983).

2.2.1. Remetilasyon ve Transsülfürasyon Yolakları

2.2.1.1. Metiyonin Metabolizması

Metiyonin esansiyel bir aminoasittir. Diyetle, endojen proteinlerin parçalanması ya da homosistein remetilasyonu ile oluşur (Dikmen, 2004). Metiyoninden metiyonin adenil transferaz aracılığı ile S-Adenozilmetiyonin (SAM) oluşmaktadır. Metiyonin bu reaksiyon sayesinde metil kaynağı olarak birçok molekülün (poliamin metabolizması vs.) protein yapısına katılmaktadır. SAM içerisindeki sülfonyum iyonu sayesinde kolayca metile eden bir ajana dönüşmektedir ki bu ajan enzime ihtiyaç olmadan hücresel nükleofillerin metilasyonunu gerçekleştirmektedir. Ayrıca metiyonin esansiyel aminoasitler içerisinde en hidrofobik aminoasittir. Hücre membranının hidrofobik yüzeylerinde globüler proteinler içerisinde metiyonin kalıntıları bulunmaktadır. Metiyonin sıklıkla membranın lipid tabakası ile etkileşim içerisindedir. Bazı proteinlerde metiyonin kalıntıları hücre yüzeyine maruz kalır. Bu kalıntılar, metiyonin sülfoksit kalıntılarının oksidasyonuna duyarlıdır (Brosnan ve Brosnan, 2006). Bazı çalışmalarda metiyonin kalıntıları endojen antioksidan ajan olarak değerlendirilmiştir (Levine vd 1996).

DNA metiltransferaz enzimi SAM'ın metil grubunu kopartarak, S-adenozil homosistein (SAH) oluşturur. SAH'ın parçalanması sonucu ile de homosistein oluşmaktadır.

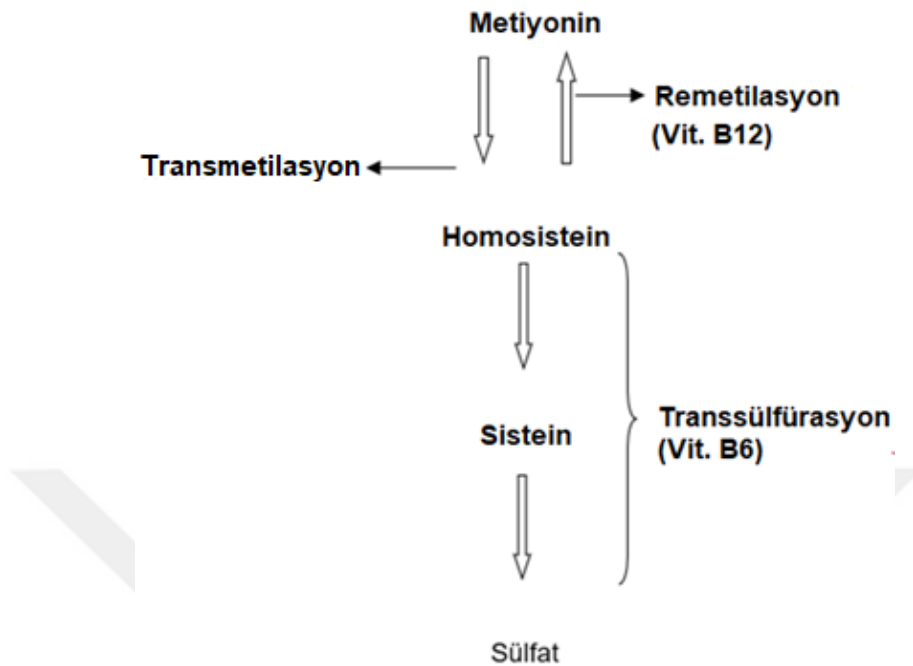


Şekil 1. Memelilerde Sülfür İçeren Aminoasitlerden Metiyoninden Sistein Oluşumu. 1.Metiyonin Adenozil transferaz. 2. S-adenosilmetiyonin Metiltransferaz. 3. Adenosilhomosisteinaz. 4. Betain-Homosistein Metiltransferaz. 5. 5-Metil-tetrahidrofolat-Homosistein Metiltransferaz(Metiyonin Sentaz). 6.Sistatyonin β-Sentaz. 7. Sistatyonin γ-liyaz (Griffith, 1987)

2.2.1.2. Homosistein Metabolizması

Homosistein 75 yıl önce ilk defa bulunmuş kükürt içeren bir aminoasittir. Esansiyel bir aminoasit olan metiyoninin katabolizması esnasında oluşmakta ve protein yapısına katılmamaktadır. Homosistein amino asidinin oluşumundaki ilk basamak metiyoninin metiyonin adenzil transferaz (MAT) enzimi ile adenillenmesidir. Bu reaksiyon sonucu S-adenozilmetiyonin (SAM) oluşur. SAM birçok metilasyon reaksiyonunda metil vericisi olarak görev almaktadır. SAM metil transferaz aracılığı ile demetile olması sonucu S-adenozilhomosistein (SAH) oluşmaktadır. SAH, homosisteine SAH hidrolazlar ile dönüştürülür. Homosisteinin çeşitli toksik özellikleri bulunmaktadır. Oksidatif strese yol açmasının yanında aynı zamanda NMDA reseptör agonisti olarak etki göstermektedir. Bunların dışında, nörotoksik amiloid peptitlerin hücrelerde ekstrasellüler alanda birikimine neden olmakta, hücrenin metilasyon kapasitesini azaltmakta; programlanmış hücre ölümünü tetiklemekte ve endoplazmik retikulumda strese yol açtığı bilinmektedir. Bu toksik özellikler nedeniyle homosistein metabolizmasının hücre içinde sıkı bir şekilde düzenlenmesi gerekmektedir. Homosistein oluştuktan sonra fizyolojik olarak remetilasyona ve transsülfürasyon yolları ile metabolize edilerek bahsedilen toksik etkilerinden korunulmaya çalışılır. Remetilasyon, metiyonin sentaz enzimi tarafından katalizlenen geri dönüşümlü bir yoldur. Bu yolda metiltetrahidrofolat'tan (MTHF) alınan metil grubu metiyonin sentaz ile homosisteine aktarılır ve tekrar metiyonin oluşturulur. Transsülfürasyon ise geri dönüşümsüz bir yoldur. Sistatyonin beta sentaz enzimi homosistein ile serin amino asidini birleştirerek sistatyonini meydana getirir. Sistatyonin daha sonra sistein amino asidine çevrilir. Yolakların ilki geri dönüşüm reaksiyonunu ifade ederken, İkinci yolak da fazla homosisteinin yıkılarak ortamdan uzaklaştırılmasını ifade etmektedir (Griffith, 1987). Homosistein metabolizmasında remetilasyon ve transsülfürasyon yolları arasında sıkı şekilde düzenlenen bir denge vardır. Sağlıklı bireylerde, bu denge nedeniyle düşük düzeyde plazma homosistein konsantrasyonları izlenir. Plazma homosistein düzeylerindeki artış ise bu aminoasidin hücre içi metabolizmasındaki bir bozukluğu gösterir. Bozukluk genellikle bahsedilen yolaklardaki görev alan enzimlerin defektlerinde ve/veya çeşitli vitaminlerin (B6, B12 ve folik asit) eksikliğine bağlı olarak gelişebilir ve neticede hücre içi homosistein düzeyleri artar (Dikmen, 2004). Bu artışa karşılık olarak da toksiteden hücrenin hasarlanmasını önlemek için hücre içindeki homosisteinin hücre dışına verildiği öne sürülmektedir. Bu mekanizma hücrenin kendisinin toksiteden korunmasına neden olurken oluşan hiperhomosisteinemi tüm dokuların potansiyel toksitesine neden olacaktır. Ayrıca homosistein artışının bu

nörolojik bozuklukların nedeni mi yoksa sonucu mu olduğu henüz kesin olarak bilinmemektedir (Finkelstein 2000; Gündoğdu 2012).



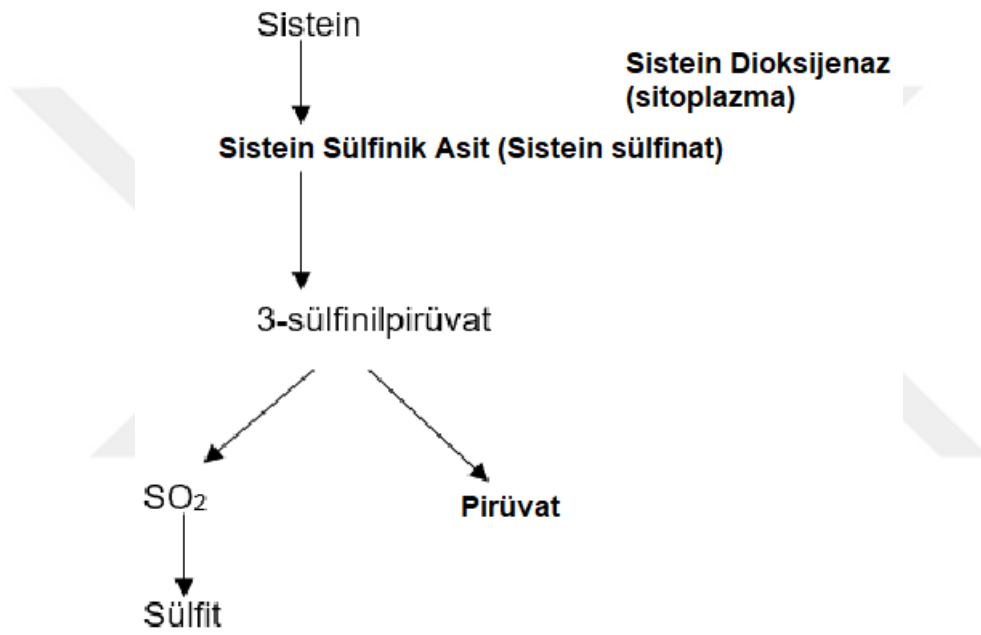
Şekil 2. Metiyoninden Sülfata, sülfid içeren aminoasit metabolizması

2.2.1.3. Sistein Metabolizması

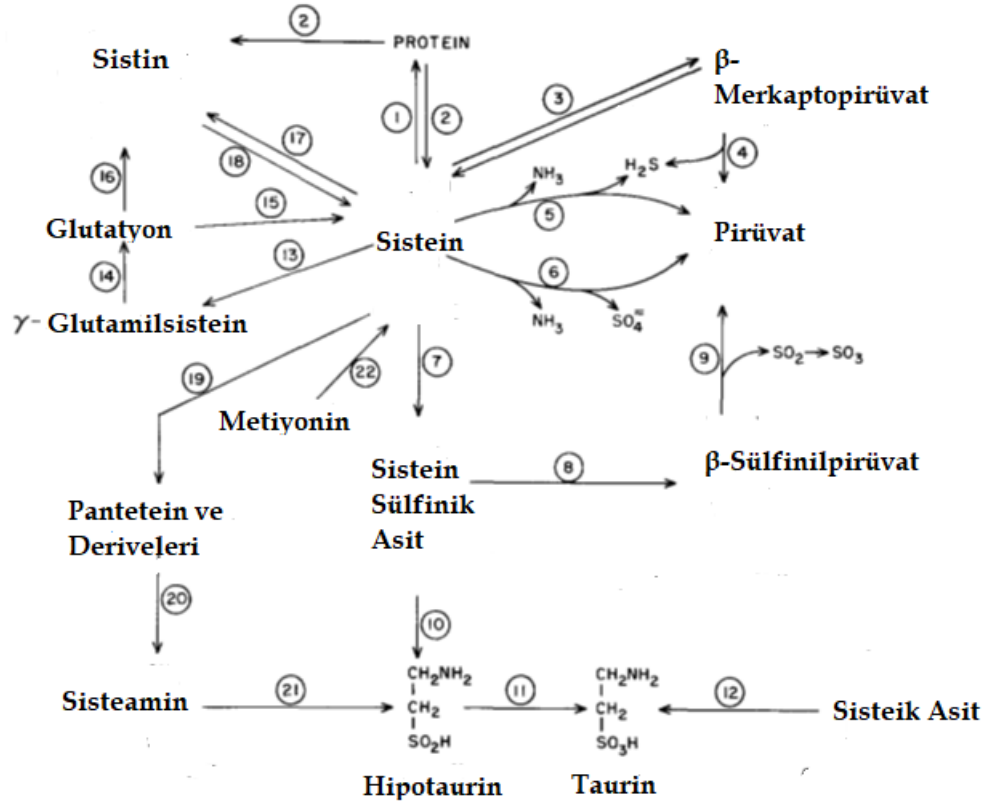
Sistein, metiyonin metabolizması sonucu oluşan homosisteinin enzimatik reaksiyonla sistatyonin meydana getirmesi ve sistatyoninin de hidrolize olması ile oluşmaktadır. Sistein, diğer sistein kalıntıları ile birlikte zincirler arası ve zincir içi disülfid bağları oluşturma kabiliyeti ile protein yapısında kritik bir rol oynar. Plazma membranındaki proteinler üzerinde birçok disülfid bağının eksport veya sabitleme görevleri yaptığı gösterilmiştir. Bu disülfid bağları nonenzimatik bir yolla da oluşabileceği gibi; bir endoplazmik retikulum proteini olan protein disülfid izomeraz aracılığı ile de yanlış bağlanan disülfidleri değiştirerek düzeltebilir (Brosnan ve Brosnan, 2006).

Sisteinin santral sinir sistemindeki görevleri tam olarak açığa çıkarılmamıştır. Fizyolojik olarak nöronlarda glutatyon sentezinde prekürsör olarak rol almaktadır, ayrıca detoksifikasyon reaksiyonları için inorganik sülfat sağladığı bilinmektedir. Hipoksi ve anoksi gibi patolojik durumlarda ekstrasellüler sıvıya glial hücrelerden çok miktarda salındığı gösterilmiştir. Anoksi ve aglisemi durumlarında sisteinin artış mekanizmasında γ -glutamilttransferaz (γ -GT) yer aldığı düşünülmektedir. Sistein miktarındaki artışın sadece salınım artışına bağlı olmayabileceği, γ -GT ile glutatyonun (GSH)

parçalanmasına bağlı gerçekleşen sistein oluşumunun bu toplamdaki sistein artışında etkili olabileceği düşünülmektedir (Janáky vd 2000). Anoksik/iskemik beyin hücrelerine γ -GT inhibitörü olan acivicin verildiğinde, Sistein miktarının hızla düştüğü, buna karşılık olarak da GSH' in hızla arttığı gözlenmiştir (Li vd 1999). Çalışmada sistein-sülfinatın yüksek miktarlarda görüldüğü; sisteinin serbest radikallerle sistein-sülfinata okside olduğu düşünülmektedir. SSC'nin sistein-sülfinatla birlikte sisteinin metabolize olması sonucu ortaya çıktığı belirtilmektedir (Janáky vs 2000).



Şekil 3. Sistein katabolizması esnasında sülfit oluşumu



Şekil 4. Memelilerde Sistein Metabolizması (Griffith, 1987). 1.Ribozomal protein sentezi, 2. Protein disülfid bağlarının formasyonu, 3. Sistein aminotransferaz, 4. 3-merkaptopirüvat sülfürtransferaz, 5. Sistasyon gama-lizaz, 6. Zayıf mitokondrial aktivite, 7. Sistein dioksijenaz, 8. Aspartat aminotransferaz, 9. Spontane reaksiyon, 10. Sistein sülfinat dekarboksilaz, 11.Hipotaurin oksidaz, 12.Sistein sülfinat dekarboksilaz, 13.Gama-glutamilsistein sentetaz(glutamat-sistein ligaz), 14. Glutatyon sentaz, 15.Gama-glutamil transferaz, 16. Glutatyonun glutatyon disülfite enzimatik ve nonenzimatik oksidasyonu, 17.Tiol oksidaz, 18.Glutatyon redüktaza bağlanmış glutatyon ile enzimatik ve nonenzimatik transhidrojenasyonlar (disülfid değişim reaksiyonları), 19. Pantetein ve Koenzim A sentezi, 20.Pantetein ve Koenzim A katabolizması, 21.Sisteamin deoksijenaz, 22.Transsülfürasyon yolağı.

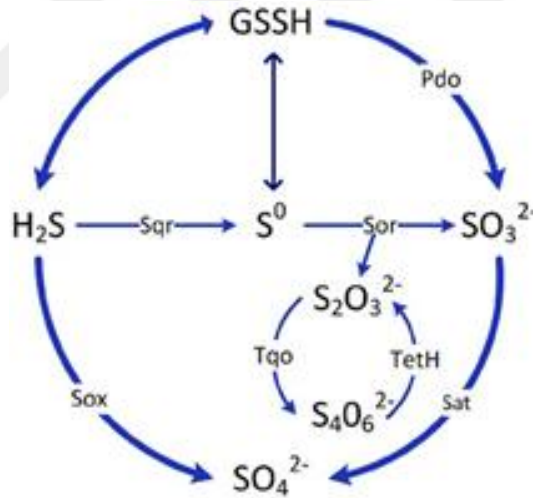
2.2.1.4. Sülfite Metabolizması

Sülfite (SO_3^-) kullanımı eski çağlara kadar gitmektedir. İlk kullanımlarının hijyen amaçlı olduğu bilinmektedir. Besinlerde katkı maddesi olarak kullanımının tarihi 17.yy.'a kadar gitmektedir. Sülfite, vücutta sülfür içeren aminoasitlerin metabolizması sonucu oluşmaktadır. Sülfite endojen ya da eksojen kaynaklı olsun toksik bir moleküldür ve enzimatik reaksiyonlarla detoksifikasyona ihtiyaç duymaktadır. SOX enzimi ile sülfata dönüşerek hücreler sülfite toksik etkilerine maruz kalmamaktadırlar (Cohen ve Fridovich, 1971; Lester, 1995). Sülfite vücutta endojen ve eksojen olarak iki şekilde karşımıza çıkmaktadır.

Endojen karşılaşma incelendiğinde: Endojen fazla miktarda sülfite birikimi, diyabetli hastalarda insülin salınımının azalması, etilmalanik ensefalopati, ağır nöron hasarı, dolaşım sistemi bozuklukları ve kronik diyareye neden olduğu görülmektedir (Wu vd

2009). Vücutta, kükürt içeren aminoasitlerin ve sülfid içeren bileşiklerin yıkımı sonucu sülfid oluşmaktadır. Kükürt içeren aminoasitlerden sistein ve metiyonin metabolizmaları sonucu önemli miktarda endojen sülfid oluşmaktadır (Cooper, 1983). Sistein, sistein dioksijenaz enzimi aracılığı ile sistein-sülfinik aside çevrilir. Sistein dioksijenaz enzimi sitoplazmada yer almaktadır ve bu reaksiyonda sitoplazmada gerçekleşmektedir. Burada oluşan sistein-sülfinik asit mitokondride sistein-sülfinik transaminaz enzimi ile reaksiyona girer ve 3-sülfinilpirüvat oluşturur. Bu molekül spontan olarak kükürt dioksit (SO_2) ve pirüvata çevrilir. SO_2 hidrate olarak H_2SO_3 'e dönüşür. H_2SO_3 da sülfite çevrilir.

Sülfidin eksojen kaynaklarına bakıldığında ise, en çok karşımıza çıkanın SO_2 'li kirliliği hava ile alınan SO_3^{2-} olduğu görülmektedir. Havadaki SO_2 'in çok büyük bir kısmını fosillerden elde edilen enerji kaynaklarının yakılması sonucu atmosfere salınan SO_2 oluşturur. Diğer eksojen sülfid kaynağı ise kullanılan ilaçlardır. Epinefrin, lokal anestezikler, kortikosteroidler, antibiyotikler, analjezikler gibi ilaçlarda kullanılmaktadır. Sülfid, renk ve kıvam koruyucu olmasından ve antimikrobik etkisinden dolayı da gıda sanayinde kullanılmaktadır.



Şekil 5. İnorganik Sülfid Döngüsü (Liu vd 2017)

2.3. SOX Enzim Eksikliği

Sülfid oksidaz Sülfid'in sülfata oksidasyonunu katalizleyen fizyolojik olarak hayati önem arz eden bir enzimdir. Sülfid oksidaz molibdenum kofaktöre bağlıdır. SOX enzimi intramembranöz aralıkta yer alan mitokondrial bir enzimdir. Yetersizliğinde klinikte majör olarak mikrosefali, psikomotor ve mental gerilik, hipotoni ve lens dislokasyonu görülür.

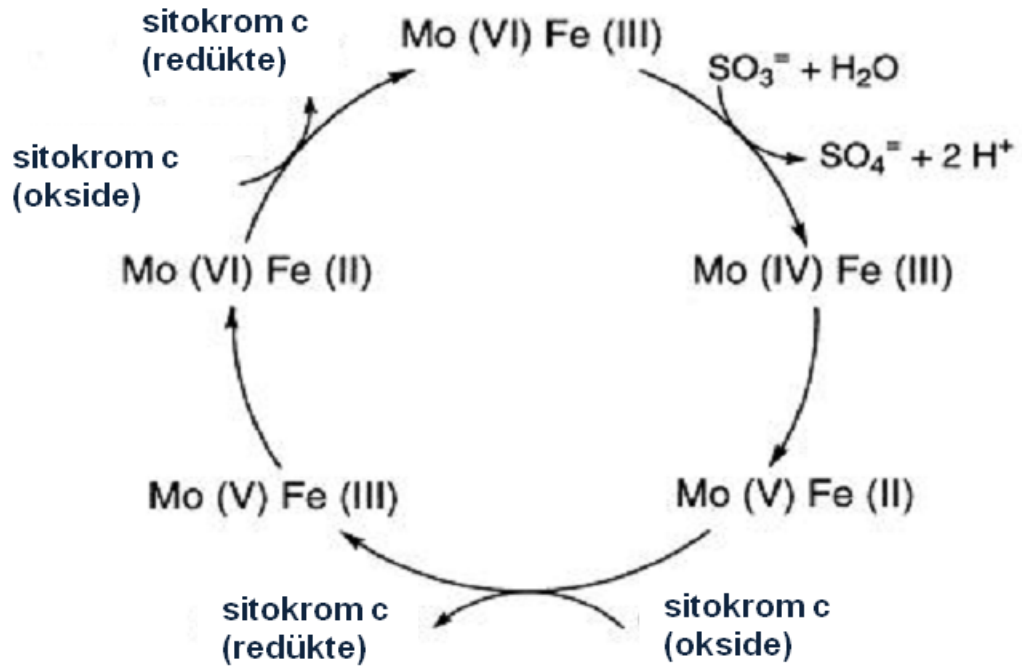
SOX enzim yetersizliği ve molibdenum kofaktör sentez defekti otozomal resesif karakterdedir. (Rupar vd 1996). Molibdenum Kofaktörün sentezi guanozindenden başlayan kompleks tepkimeler sonucu meydana gelmektedir. Bu tepkimeler için Molibdopterin sentaz, Mo şelataz gibi enzimlerin ve MogA, MoeA gibi Mo transportunda görevli çeşitli proteinlerin varlığı elzemdir. (Kramer vd 1987)

İnsanlarda genetik olarak SOX yetersizliğinin iki sebebi vardır.

- a) Molibdenum kofaktör sentezinde defekt. Bu durumda ayrıca yine molibdenum içeren ksantin dehidrogenaz ve aldehid oksidaz enzimleri de etkilenir.
- b) İzole SOX gen mutasyonu. Enzimin protein diziliminin 160. Pozisyonunda bulunan arjinin yerine glisin aminoasidi gelmiştir. (Küçükataay vd 2005)

Molibdenum kofaktör sentez defektinde ve izole SOX eksikliğinde benzer klinik göstermektedir. Çünkü her iki durumda SOX etkinliğindeki eksiklik sebebi ile klinik oluşmaktadır. (Kisker vd 1997)

Sülfat idrarla atılmakta, idrarla atılan kısmının çok büyük bir kısmı yaklaşık %90'ı SOX enziminin dahil olduğu reaksiyon sonucu oluşmaktadır. Şekil 6' da bu dönüşüm gösterilmiştir. İlk SOX yetersizliği vakası Mudd ve arkadaşları tarafından 1967 yılında rapor edilmiştir. 2,5 yaşındaki bir erkek çocukta şiddetli beyin hasarı, ağır mental gerilik, görme kaybı, spastisite, quadripleji ve serebral atrofi gibi çeşitli klinik bulgular gözlenmiştir. Yapılan tetkiklerde, idrarla yoğun bir şekilde atılan *S-sulfosistein*, SO_3^- , tiyosülfat ve normalden daha az miktarda çıkarılan SO_4^- dikkati çekmiştir. Başka bir çalışmada da klinik bulguların kükürt içeren amino asit metabolizmasında oluşmuş olabilecek bir defekt sonucu olduğu fikri ağır basmıştır. Postmortem karaciğer, böbrek ve beyin dokusunda SOX aktivitesi ölçülmüş ve SOX aktivitesinin olmadığını bulunmuştur (Küçükataay vd 2005; Mudd vd 1967).



Şekil 6. SO₂ tarafından katalizlenen reaksiyon (Garrett vd 1998)

2.4. Sistein-S-Sülfat (Cysteine-S-sulfate, S-Sulfocysteine, SSC)

SSC'nin hayvanlarda, bitkilerde, bakteri ve mantarlarda yapılan çalışmalarda sistein metabolizmasından oluştuğu gösterildiği gibi SSC' den sisteine dönüşüm de yine bazı bitki, bakteri ve mantarlarda yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur. (Hensel ve Troper 1976; Kunert 2007; Liu ve Inglis 1972; Nakatani vd 2012).

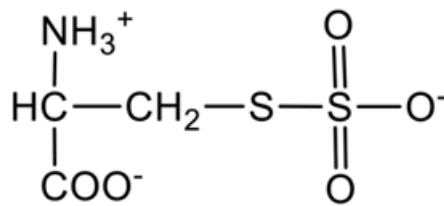
Sistein metabolizması sonucunda ortaya çıkan SSC, S-sulfoglutasyonun analogu olup, sistein sülfonik asitin transaminasyon ve oksidatif deaminasyonu ile sistin ve sisteamin üzerinden s-sulfosistamin ile birlikte de ortaya çıkabilmektedir (Marco ve Coletta, 1961).

Sistein aminoasidinin nörotoksik etkileri neonatal ratlarda gösterilmiştir. Sistein nörotoksitesinin birçok nörolojik rahatsızlığın patogenezini açıklamada yardımcı olacağı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda sisteinin düşük dozlarda NMDA reseptör aktivasyonu yaptığı gösterilmiştir; ancak bunu hangi mekanizma üzerinden yaptığı bilinmemektedir. Ancak çalışmalarda yine sisteinin glutamat salınımını artırarak toksik etkilerinin de olduğu gösterilmektedir (Puka vd 1995). Bu bulgular; sisteinin kendisi veya metabolitinin potansiyel olarak bu nörotoksitede rol alabileceğini göstermektedir (Olney vd 1990; Pace vd 1992). Sisteinin metabolitlerine genel olarak baktığımızda

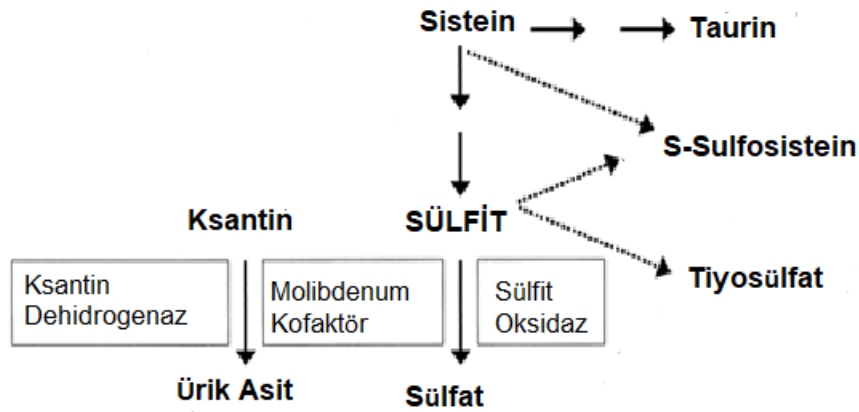
karbondioksit ile sisteinin birleşiminden oluşan sistein-karbamat yine güçlü bir NMDA reseptör agonistidir. Bir diğer az çalışılmış metaboliti de sisteinin inorganik sülfid ile birleşiminden oluşan SSC'dir (Abbas vd 2008). SSC, Mudd ve arkadaşları tarafından 1967 yılında vaka sunumu olarak SOX enzim eksikliği olan hastaların kan ve idrar analizlerinde tespit edilmiştir. SOX enzim eksikliğindeki ağır tablonun oluşmasındaki patofizyolojide önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. SSC moleküler yapı olarak glutamat ile benzerlik göstermektedir. Eksitator ve toksik etkilerinin de çalışmalarla gösterilmesi SOX enzim eksikliği patogenezinde yer aldığı görüşünü desteklemektedir (Mudd vd 1967). SSC'nin hücre kültüründe hücre içine kalsiyum akışını artırdığı gösterilmiştir (Kumar vd 2017).

SOX yetersizliği veya sistasyon sentaz eksikliğinde nöronal hasarın, muhtemelen beyinde ekstrasellüler alanda SSC veya homosisteik asit birikimine bağlı olduğu düşünülmektedir. SSC ve diğer glutamat analoglarının beyinde ekstrasellülere nasıl salındığı tam olarak bilinemese de; kalsiyum bağlı vesiküler salınımla (Bouvier vd 1991) veya glutamat taşıyıcısı aracılığı ve/veya glutamat anyonu ile sülfür bağlı anyon hetero-değişimi ile olduğu düşünülmektedir (Szatkowski vd 1990).

Glutamat ve aspartatın beyinde geri alım mekanizmaları ortaya konulmuş, toksik dozlara ulaşmasının normal şartlarda bu geri alım mekanizmaları sayesinde mümkün olmadığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Ancak SSC'nin glutamata benzer bir geri alım mekanizması bilinmemektedir. Bu sebeplerle de nörotoksitede önemli bir yer oluşturduğu düşünülmektedir (Olney vd1975). Yapılan bir diğer çalışmada da yine Molibdenum kofaktör sentez defektinde ana nörotoksik mekanizmanın SSC ve sülfid olduğu ve sülfid'in oksidatif stresi artırdığı gösterilmiştir. SSC ve sülfid yüksek dozlarda kan beyin bariyerini geçip nörodejenerasyona yol açmaktadır (Kumar vd 2017).



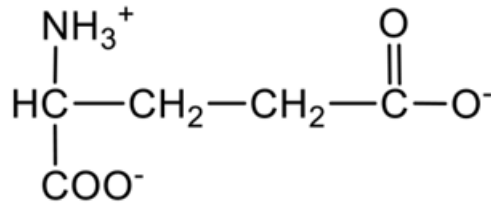
Şekil 7. Cystein-S-Sulfat (L-Cysteine-S-Sulfate, S-Sulfocysteine, Cysteine Sulfonic acid) (Kumar vd 2017)



Şekil 8. Sistein Yolağı, SSC oluşumu (Eyaid vd 2005)

2.5. Glutamat

Glutamat beyindeki ana eksitator nörotransmitterdir. Glutamat öğrenme bellek gibi bilişsel birçok fonksiyonda rol oynamaktadır. Nöronların %50'si nörotransmitter olarak glutamati kullanmaktadır. (Tural ve Önder, 2002)



Şekil 9. Glutamat (Kumar vd 2017)

2.5.1. Glutamat Reseptörleri

Glutamat Reseptörleri İyonotrofik ve Metabotropik olarak iki ana gruba ayrılırlar. İyonotrofik Glutamat Reseptörleri Ca^{+2} aracılığı ile çalışırlar ve üç çeşittirler:

- 1) Alfa-amino-3-hidroksi-5-metiloksazol-propionik asit (AMPA)
- 2) N-metil-D-aspartat (NMDA)
- 3) Kainat

Glutamat reseptörleri birçok seviyede etkileşim halinde görünmektedir. Glutamat reseptörlerinin glutamat salınımında özel rollere sahip olduğu bilinmektedir. NMDA

reseptörleri, en çok bilgi sahibi olunan reseptör tipleridir. NMDA reseptörleri (NMDAR) hem ligand kapılı hem de voltaj bağımlı işleve sahiptir (Özdemir ve Özdemir, 2016). NMDAR, nöronal iletişimde görev alan iyonotropik glutamat reseptörlerinden birisidir. 7 farklı subunitesi tanımlanmıştır: NR1, NR2 (A, B, C, D) ve NR3 (A, B). NMDAR, iki NR1 ve NR2 veya NR1 ve NR2/NR3 karışık subunitlerinden oluşan tetramer yapıdadırlar. Glisin ve glutamat NR1 ve NR2'ye bağlanır. Glisin, glutamat bağlanmadan önce bağlanmalıdır. NMDAR yüksek Ca^{+2} geçirgenliğine sahip, seçici olmayan kanallardır. Dinlenim halinde Mg^{+2} , aktivasyonu bloke etmek için NMDA reseptörlerine bağlanır. Sinaptik membranın yeterli depolarizasyonunda Mg^{+2} , voltaj bağımlı NMDAR' dan ayrılır. Eşzamanlı olarak glutamat NMDAR' a bağlanarak reseptörü aktive eder. Bu aktivasyon iyon kanallarını açarak Ca^{+2} akışını sağlar ve Long Term Potentiation (LTP)'ye aracılık eder. LTP öğrenme süreçlerinde ve hafıza oluşumunda çok önemli bir rol oynamaktadır. AH'li hastaların beyinlerinde; A β peptitler, presinaptik nöronlardan glutamat salınımı artışı, astrosit ve mikroglialardan glutamat salınımı ve glutamate alım inhibisyonu sonucu oluşan ekstrasellüler glutamat artışına aracılık ederler. Uzatılmış sinaptik NMDAR ve α -amino-3-hidroksi-5-metilizoksazol-4-propionik asit reseptörü (AMPA, iyonotropik glutamat reseptörü) aktivasyonu sinaptik depresyon ile sonuçlanan desensitizasyon ve internalizasyon ile bağıntılıdır. Sonuç olarak aşırı glutamat, hücre ölümü ve LTP bozulması gibi zararlı sonuçlara yol açarak ekstra-sinaptik NMDAR' ünü aktive eder. Hiperfosforile edilmiş tau, protein kinaz Fyn'i hedefler. Protein kinaz Fyn, NR2B'yi fosforlar. Bu olaylar A β peptitlerce oluşturulan glutamaterjik eksitotoksisteyi artırır.

Memantin AH tedavisinde kullanılan, düşük afiniteli, voltaj bağımlı ve nonkompetatif NMDA reseptör antagonistidir. Diğer NMDA reseptör antagonistleriyle kıyaslandığında Mg^{+2} 'dan daha yüksek afiniteye; ketamin, fenilsiklidin ve MK-801'den daha düşük afiniteye sahiptir. Memantin, NMDA reseptör kanalına, tercihen kanal aşırı açıldığında girer. Böylece, memantin nispeten düşük, tonik glutamat seviyeleri ile indüklenen kanal aktivitesini bloke ederek Ca^{+2} akışını inhibe eder. Bu inhibisyon, nöronal hücreleri glutamat eksitotoksitesinden korur ve AH'nın iyileşmesine katkıda bulunur. Presinaptik nöronların depolarizasyonu sonrası salınan yüksek konsantrasyonlarda glutamat, memantin bloke ettiği NMDA reseptörlerini aktive edebilir (Sekiguchi vd 2018).

2.5.2 Glutamat Taşıyıcıları

Glutamat taşıyıcıları, glutamatın membrandan geçişini düzenleyen nörotransmitter taşıyıcı protein ailesidir. Sodyum iyonunun elektrokimyasal gradientine bağlı olan Eksitatör amino asid taşıyıcıları (EAAT) ve sodyumdan bağımsız çalışan vesiküler glutamat taşıyıcıları (VGLUT) olmak üzere iki büyük alt sınıfa ayrılırlar (O'donovan vd 2017). Beyinde, EAAT, glutamati sinaptik aralıktan çıkarır ve glial hücrelerin ekstrasinaptik bölgelerinden hücre içine girişini sağlarlar. VGLUT'lar ise glutamati hücre sitoplazmasından sinaptik veziküllerin içine doğru sürükler. Glutamat taşıyıcıları ayrıca, kalp, karaciğer gibi periferik dokularda aspartat amino asidinin de taşınmasını sağlarlar. Sistin-glutamat antiporter (xCT), vesiküler glutamat taşıyıcısı olup, hücre membranının plazmasında lokalize iken, VGLUT'lar glutamat içeren veziküllerin membranında yer almaktadır. EAAT'ler ise transmembran integral proteinleridir. Sodyum bağlı EAAT'ler ayrıca potasyum ve hidrojen iyonunun transmembran gradientine bağlıdır. Sodyum bağımlı taşıyıcılar yüksek afiniteli glutamat taşıyıcısı olarak bilinmektedirler (Danbolt, 2001). EAAT antiporterlar, glutamat molekülünü taşıırken, hücre içine 3 sodyum ve 1 hidrojen iyonu, hücre dışına da bir potasyum iyonu taşırlar.

EAAT'ler, yüzeysel olarak iyon kanallarına benzeyen, membrana bağlı sekonder taşıyıcılardır. Bu taşıyıcılar, hücre membranından iyon geçişini sağlayarak, ekstrasellüler glutamat konsantrasyonlarının düzenlenmesinde önemli bir yere sahiptir (Zerangue ve Kavanaugh, 1996). Membran depolarizasyonu sonucu ekstrasellüler alana glutamat salınımı, glutamat taşıyıcıları ile hızlıca ekstrasellüler alandan uzaklaştırılarak, düşük konsantrasyonlara çekilmektedir. Glutamat taşıyıcılarının yokluğu ve/veya bozukluğunda, ekstrasellüler glutamat konsantrasyonu yükselecek ve reseptörleri sürekli uyarak eksitotoksitete neden olacaktır. Ayrıca birçok biyokimyasal süreci tetiklemiş olacaktır (Zou ve Crews, 2005).

- EAAT

EAAT'lerin insanda şu ana kadar EAAT 1-5 olmak üzere 5 alt tipi belirlenmiştir. EAAT 1 ve 2 glial hücrelerin membranlarında bulunmuştur (Lehr vd 1995). Düşük seviyelerde EAAT 2, hipokampal CA3 piramidal hücrelerin akson terminallerinde bulunmuştur. EAAT 2'nin santral sinir sistemindeki glutamat geri alımının yaklaşık %90'ından sorumlu olduğu düşünülmektedir (Holmseth vd 2009). EAAT 3-4 çoğunlukla nöronlarda bulunmakta, nöronların akson terminallerinde, hücre gövdelerinde ve dendritlerinde eksprese edilmektedir. EAAT 5 ise sadece retina lokalize olarak bulunmuştur.

Glutamat, glial hücrelere EAAT ile alındıktan sonra, hücre içerisinde glutamine çevrilip presinaptik nörona geri transfer edilir. Burada yeniden glutamata çevrilip VGLUT aracılığı ile veziküllere alınmaktadır. Bu sürece glutamat-glutamin döngüsü denmektedir (Pow ve Robinson, 1994).

- VGLUT

VGLUT 1-3 olmak üzere 3 tip bilinen VGLUT bulunmakta ve ayrıca veziküler sialin isimli glutamat/aspartat taşıyıcısı bulunmaktadır (Miyaji vd 2008). Bu taşıyıcılar, nörotransmitterleri sinaptik veziküller içerisine, daha sonra sinapstan salınmak üzere paketlerler. VGLUT'lar sekretuar sistemde bulunan proton gradientine bağlıdır. VGLUT'ların glutamat afinitesi EAAT'ların yüz ila binde biri arasındadır ve aspartat taşıyıcılığı da bilinmemektedir (Shigeri vd 2004).

VGLUT3 SLC17A8 geni ile kodlanan, nörolojik hastalıklarda ve ağrı mekanizmasında yer alan bir glutamat taşıyıcısıdır. Nöronlar, glutamattan farklı bir nörotransmitter kullanırken VGLUT3'ü eksprese edebilmektedirler (Fremeau vd 2002). Bu geleneksel olmayan taşıyıcının (VGLUT3) rolü hala bilinmemektedir, ancak şu anda, işitsel sistemde, VGLUT3'ün diğer iki veziküler glutamat taşıyıcısı, VGLUT1 ve VGLUT2'ye çok benzeyen hızlı uyarıcı glutamaterjik iletimde yer aldığı gösterilmiştir (Seal vd 2008). VGLUT3 ablasyonunun davranışsal ve fizyolojik sonuçları vardır. Çünkü anksiyete, ruh hali düzenleme, dürtüsellik, agresif davranış, ağrı algısı, uyku-uyanıklık döngüsü, iştah, vücut ısısı ve cinsel davranış gibi çok çeşitli nöronal ve fizyolojik süreçleri düzenlemede VGLUT3 yer almaktadır. VGLUT3'ün kaybı belirli bir kaygı ile ilgili fenotiple sonuçlanmaktadır. Duyusal sinir lifleri, duyu modaliteleri ve iletim hızları boyunca ağrı aşırı duyarlılığını tespit etmek için farklı yollara sahiptir; ancak mevcut bilgilerimize göre hangi duyu türlerinin, farklı enflamatuar ve nöropatik ağrının aşırı duyarlılık formlarıyla ilişkili olduğu halen bilinmemektedir (Gras vd 2002, Ruel vd 2008, Takamori vd 2002).

2.6. Hipotez

Hipotezimiz, SSC molekülünün Glutamat benzeri eksitotoksik etkileri ile nörotoksik olabileceği ve bu etkisinin ortaya çıkmasında genotoksite ve/veya apoptozis süreçlerinin rol oynayabileceğidir.

3.GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. HT-22 Hücre Dizini

HT-22, HT-4 hücre hattından alt klonlanmış ölümsüzleştirilmiş bir fare hipokampal hücre hattıdır. Ebeveyn HT-4 hücre hattı, sıcaklık duyarlı SV40 T-antijeni ile fare nöronal dokularının ölümsüzleştirilmesinden türemiştir. HT-22 glutamata karşı oldukça duyarlıdır ve bu nedenle sıklıkla nöronal hücrelerdeki glutamata bağlı toksiteyi incelemek için bir model sistemi olarak kullanılır. Hücreler Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Betül KARADEMİR'den temin edilmiştir.

3.1.1. HT-22 Hücrelerinin çözdürülmesi

HT-22 Hücre Dizini için öncelikle besiyeri olan ortam hazırlanmıştır. Hücre kültürü besi yeri olarak %10 fetal bovin serumu (FBS), %1 L-glutamin, 100IU/ml penisilin/10mg/ml streptomisin ve yüksek glukoz içeren DMEM high (gibco) kullanılmıştır. Deneyler öncesinde yüksek glukoz içeren DMEM çekilip nörobazal besi yeri eklenmiştir.

Dondurulmuş HT-22 hücreleri -80°C'den kriyotüpler içerisinde çıkarılıp çözdürülmesi için birkaç dakika 37°C' de etüve konulmuştur. Laminer akış kaputunda, hücreler steril 15 ml'lik bir konik tüpe aktarılıp, üzerlerine damla damla 9 ml HT-22 besi yeri ilave edilmiştir. Tüp, hücreleri peletlemek için 300 x g'de 2-3 dakika santrifüje bırakılıp sonrasında süpernatant kısmı boşaltılmıştır. Hücrelere, 15 ml HT-22 besi yeri eklenerek hücreler tekrar süspansiyon edilmiştir. Hücre besi yeri daha sonra 75'lik flaklara aktarılıp, hücreler 37°C' de nemlendirilmiş bir inkübatörde %5 CO₂ ile inkübe edilmiştir. Ertesi gün, ortamı 10-15 ml taze HT-22 besi yeri ile değiştirilmiştir.

3.1.2. HT-22 Hücrelerinin çoğaltılması ve pasajlanması

Her iki üç günde bir taze besi yeri ile ortam değişimi ile hücrelerin çoğaltılması gerçekleştirilmiştir. Hücreler %70 konfluent hale geldiklerinde pasajlamak için:

- 1) Konfluent haldeki flasklardaki besi yeri çekilmiş, 5 ml PBS ile bir kez yıkanmış ve PBS ortamdan uzaklaştırılmıştır.
- 2) PBS ile yıkanmış flaska 2-3 ml tripsin eklenip flask alanına nazik hareketlerle yayıldığından emin olunup inkübatöre 60 sn. beklemek üzere kaldırılmıştır.
- 3)60 sn sonrasında İnkübatörden çıkarılan flasklar nazikçe kenarlardan vurarak hücrelerin yapıştığı tabandan kalkmalarına yardımcı olunup, mikroskop altında kalkıp kalkmadıkları kontrol edilmiştir. Kalktıkları görülüp tabana tekrar yapışmaması için flask dik konuma getirilmiştir.
- 4) Dik konumdaki flaska 5 ml besi yeri eklenip, besi yeri birkaç kez nazik bir şekilde çekilip flaskın yapışma yüzeyine doğru bırakılarak yıkama yapılmıştır.
- 5) Duvar yıkaması sonrası flaskın içerisindeki hücre ve besi yeri çekilerek 15 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılıp 1500 g' de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
- 6) Santrifüj edilen hücre süspansiyonunun süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. Kalan pelet kısmının üzerine 1 ml besi yeri eklenip homojen bir şekilde dağılması için pipetaj yapılmıştır.
- 7) Her 75 cm²'lik flaskla 10 ml besi yeri eklenip homojen dağılmış hücre süspansiyonundan 100 µl-500 µl arası konulmuştur.
- 8) Bu işlemler sonucu yüzeye yapışma ve çoğalma için inkübatöre flasklar kaldırılmıştır.

3.1.3. HT-22 Hücrelerinin Sayılması

Canlı hücrelerin sayımında Tripan Mavisi boyası kullanılmıştır. Tripan mavisi canlı hücre içine giremediği gibi; ölü hücrelerin çeperlerinden geçebildiğinden canlı hücreleri ayırt etmekte kullanılmaktadır. Canlı hücreler beyaz, ölü hücreler mavi renk almaktadırlar. Işık mikroskobu altında hücreler sayılırken beyaz renkli canlı hücreler sayılmıştır. Sayım işlemine başlamadan evvel yukarıda anlatılan yöntemle santrifüj ve sonrasında süpernatant kısmın uzaklaştırılmasına kadar aynı işlemler gerçekleştirilmiştir.

Sonrasında:

- 1) Süpernatant kısmı uzaklaştırılmış pelete 1 ml besi yeri eklenip homojen olması için pipetaj yapılmış, pipetaj yaparken girdap oluşturmamaya özellikle dikkat edilmiştir.

2) Pipetaj sonrası hücre süspansiyonundan 10 µl alınıp ependorfa konulup, üzerine 10 µl tripan mavisi alınıp aynı ependorfa konulmuş ve pipetaj yapıp iyice homojenize edilmiştir. 20 µl'lik yeni karışımdan 10 µl alınıp thoma lamına (Şekil 10) konulup, ışık mikroskopunda canlı hücreler sayılmıştır.

3) Sayma işlemi gerçekleştirilirken, büyük karenin sol ve üst kenar çizgisi üzerindeki hücreler sayıma dahil edilirken, sağ ve alt kenar çizgisi üzerinde kalan hücreler sayıma dahil edilmemiştir.

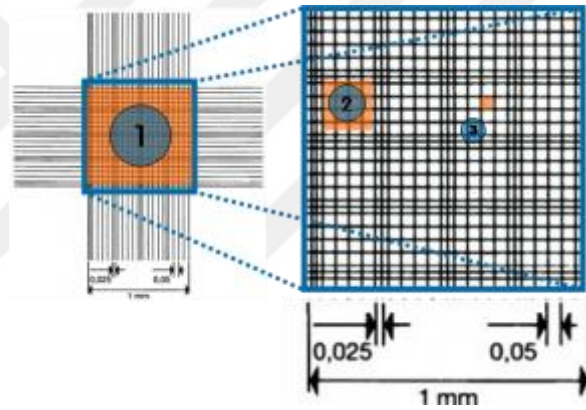
Thoma lamındaki karelerin boyutları Şekil 10' da gösterildiği gibi büyük karenin hacmi 1 mm³tür.

Bu alandaki tüm hücreler sayılırsa (N):

1 ml yani 1mm³ teki hücre sayısı = N x DF x10⁴olur.

DF= Dilüsyon Faktörü (bizim sayma işlemimizde 2'dir)

N=0.1mm³ te mevcut hücre sayısı



Şekil 10. Thoma Lamı

3.1.4. HT-22 Hücrelerinin Dondurulması

1) Hücreler pasajlama işleminde anlatılan yöntemle santrifüj ve sonrasında süpernatant kısmın uzaklaştırılmasına kadar aynı işlemler yapılmıştır.

3) Dondurulacak santrifüj tüpü sayısı kadar 2 ml'lik kriyotüp hazırlanmıştır.

4) 1600 µl besi yeri kriyotüpe konulmuştur. Üzerine 200 µl FBS ve 200 µl DMSO damla damla eklenip, nazikçe alt üst yapılmıştır.

5) Kriyotüpler önce -20°C'ye kaldırıp 2 saat bekletilip -80°C'ye kaldırılmıştır.

3.2. HT-22 Hücrelerinin Diferansiye Edilmesi

HT-22 fare hipokampus hücrelerinde bulunan glutamat reseptörlerinin sayısını artırmak için bütün deneylerden önce hücreler aşağıda anlatıldığı şekilde hazırlanmış olan Neurobasal Medium karışımı içerisinde 24 saat diferansiye olması için bekletilmiştir.

Hazırlanışı: 184ml Neurobasal Medium (NB) içerisinde, 2 ml N2 suppl (x100), 2 ml L- Glutamin, 2 ml Penisilin-Streptomisin çözümüştür.

3.3. Deneyler

Deneyde kullanılan kimyasallar: L-Cysteine-S-Sulfate, Memantine hydrochloride (Sigma), DMEM high glucose, Neurobasal Medium (Gibco), N2K supplement, Penisilin/Streptomisin (Capricorn Scientific), L-glutamine, Trypsin EDTA (BI Biological Industries), LY341495 (Abcam).

3.3.1. WST-1 Hücre Sitotoksisite Testi

WST-1 Cell Proliferation Kit (Cayman) kullanılmıştır. WST-1, hücre proliferasyonunda indüksiyon ve inhibisyon çalışmak için herhangi bir in vitro modelde kullanılabilir. Deney canlı hücrede, WST-1 tetrazolyum tuzunun formazana, hücresel mitokondriyal dehidrojenazlarca enzimatik parçalanmasına dayanmaktadır. Deneylerimizde hücre sayısı kitte önerildiği üzere 10^4 olarak çalışılmıştır.

3.3.1.1. SSC LD50 Dozu Belirlenmesi

Prosedür:

- Hücreler yukarıda belirtilen usulle toma lamında sayılarak her kuyucuğa 10^4 hücre gelecek şekilde NB besi yeri içerisinde 96'lık Well Plate'e ekilmiştir.
- 24 saat 37°C 'de CO_2 inkübatöründe inkübe edilmiştir.
- Mevcut kuyucuklardaki NB besi yerleri aspiratörle ortamdaki uzaklaştırılmıştır.

- Her doz 4'erli çalışılacak şekilde 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300 μM SSC eklenerek gruplar oluşturulmuştur.
- 24 saat 37°C 'de CO_2 inkübatöründe inkübe edilmiştir.
- Önceden kit maneline uygun şekilde hazırlanmış WST1 karışımı 10 μl olarak bütün kuyucuklara eklenip, 2 saat 37°C 'de CO_2 inkübatöründe inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası Elisa okuyucu ile çalışılmıştır.

Çalışma sonuçları probit analiz yapılarak SSC'nin LD_{50} dozu 125 μM olarak belirlenmiştir. Memantin ve LY341495 için literatür taraması yapıp, Memantin için 20 μM , LY 341495 için 10 μM 'lık dozlar çalışma için belirlenmiştir

3.3.1.2. SSC Toksitesinin Zamana Bağlı Değişimi

- 5 adet 96'lık well plate' e SSC ve kontrol grupları ikişer kuyucuk olarak yukarıda belirtilen usullerle NB besi yeri ile ekilmiştir.
- 24 saat 37°C 'de CO_2 inkübatöründe inkübe edilmiştir.
- NB besi yerleri çekilip, kontrol kuyucukları hariç, üzerlerine 125 μM 'lık SSC eklenmiştir.
- 1, 2, 6,12, 24. saatlerde WST1 çalışma karışımı eklenerek 2 saat inkübe edilip Elisa okuyucuda çalışılmıştır.

3.3.1.3. Glutamat Reseptör Blokörlerinin SSC Toksitesinin Önlenmesindeki Rolünün Araştırılması

Deney Grupları:

1. Kontrol
 2. SSC
 3. SSC+ Memantin
 4. SSC+ LY341495
 5. SSC+ LY341495+ Memantin
 6. Memantin
 7. LY341495
 8. LY341495+Memantin, olarak belirlenmiştir.
- Her grup sekizli olarak 96'lık well plate'te kuyucuklara daha önce bahsettiğimiz şekilde NB besi yeri içerisinde ekim gerçekleştirilmiştir.

- 24 saat 37°C'de CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir.
- NB besi yeri çekilmiştir.
- SSC 125 µM, Memantin 20 µM, LY341495 10 µM olacak şekilde kuyucuklara ilaçlar verilmiştir.
- 24 saat 37°C'de CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir.
- 10 µl her kuyucuğa WST1 çalışma karışımı eklenerek 2 saat inkübe edilip Elisa okuyucu ile çalışılmıştır.

3.3.1.4. Farklı Dozlardaki Glutamat Reseptör Blokörlerinin SSC Toksisitesini Önlemedeki Rolünün Araştırılması

Deney grupları

1. Kontrol
 2. SSC (125µM)
 3. SSC + 0.1 µM Memantin
 4. SSC + 0.3 µM Memantin
 5. SSC + 1 µM Memantin
 6. SSC + 3 µM Memantin
 7. SSC + 10 µM Memantin
 8. SSC + 20 µM Memantin
 9. SSC + 30 nM LY341495
 10. SSC + 200 nM LY341495
 11. SSC + 500 nM LY341495
 12. SSC + 1µM LY341495
 13. SSC + 2 µM LY341495
 14. SSC + 5 µM LY341495
 15. SSC + 10 µM LY341495
- Her grup üçlü olarak 96'lık well platete kuyulara daha önce bahsettiğimiz şekilde NB besi yeri içerisinde ekim gerçekleştirilmiştir.
 - 24 saat 37°C'de CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir.
 - NB besi yeri çekilmiştir.
 - SSC 125 µM, Memantin ve LY341495 deney gruplarında belirtilen dozlarda kuyucuklara eklenmiştir.
 - 24 saat 37°C'de CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir.

- 10 µl her kuyucuğa WST1 çalışma karışımı eklenerek 2 saat inkübe edilip Elisa okuyucu ile çalışılmıştır.

3.3.1.5. Glutamat Reseptör Blokörlerinin HT-22 Hücreleri Üzerine Toksik Etkilerinin Araştırılması

Deney Grupları

1. Kontrol
2. 0.1 µM Memantin
3. 0.3 µM Memantin
4. 1 µM Memantin
5. 3 µM Memantin
6. 10 µM Memantin
7. 20 µM Memantin
8. 30 nM LY341495
9. 200 nM LY341495
10. 500 nM LY341495
11. 1 µM LY341495
12. 2 µM LY341495
13. 5 µM LY341495
14. 10 µM LY341495

- Her grup dublike olarak 96'lık well plate'te kuyucuklara daha önce bahsettiğimiz şekilde NB besi yeri içerisinde ekim gerçekleştirilmiştir.
- 24 saat 37°C'de CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir.
- NB besi yeri çekilmiştir.
- Memantin ve LY341495 deney gruplarında belirtilen dozlarda kuyucuklara eklenmiştir.
- 24 saat 37°C' de CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir.
- 10 µl her kuyucuğa WST1 çalışma karışımı eklenerek 2 saat inkübe edilip Elisa okuyucu ile çalışılmıştır.

3.3.2. Hücre içi Total Glutasyon Ölçümü

Bir tripeptit (γ -glutamil-sisteinilglisin) olan redükte glutasyon (GSH), birçok yaşayan hücrede bulunan temel serbest tiyoldür. Ksenobiotiklerin detoksifikasyonu, hidroperoksitlerin uzaklaştırılması ve protein sülfidrillerin oksidatif durumlarının korunması gibi birçok biyolojik işlemde yer almaktadır. Hayvan dokularındaki anahtar antioksidan moleküldür. Total glutasyonun %90-95'lik bir kısmı hücre içerisinde redükte formda bulunur (GSH). Glutasyon okside olarak glutasyon disülfid (GSSG) formasyonuna dönüşür. Hücre içi GSH miktarı, hücrenin toksik bir saldırıya gösterdiği direnç kabiliyetini göstermektedir. Hücredeki yüksek miktardaki GSH, hücredeki patolojik değişiklikleri belirtmektedir. Glutasyon kiti total glutasyon (GSH+GSSG) miktarını ölçmektedir. Test redükte glutasyonun standart eğrisini belirleyerek biyolojik örnekteki glutasyon miktarını bulmaktadır.

Deney Grupları

- a) Kontrol
- b) SSC
- c) SSC+ Memantin
- d) SSC+ LY341495
- e) SSC+ LY341495+ Memantin
- f) Memantin
- g) LY341495
- h) LY341495+Memantin

Deneyin Yapılışı:

- 1) Glutasyon kitinde tarif edilen stok solüsyonları ve çalışma solüsyonları (ömrü 3 saat olduğu için çalışma karışımı hariç) alikuatlanıp hazırlanmıştır.
- 2) 6'lık Well plate'e her kuyuda 10^6 hücre olacak şekilde hücre ekimi yapıp son volüm 2500 μ l olacak şekilde NB eklenmiştir.
- 3) 24 Saat CO_2 inkübatöründe $37^\circ C$ 'de inkübe edilmiştir.
- 4) 24 saat sonrası deney gruplarına ilaçlar belirlenen konsantrasyonlarda son volüm 2500 μ l olacak şekilde verilmiştir.
- 5) 24 Saat CO_2 inkübatöründe $37^\circ C$ 'de inkübe edilmiştir.
- 6) İlaçlarla 24 saat inkübasyon sonrası hücreler, 500 μ l PBS ile yıkanıp çekilmiş ve üzerine 1000 μ l PBS eklenip hücre skrepti kullanılarak kaldırılmıştır. 500 μ l PBS daha eklenip plate duvarları yıkanmıştır. Toplam 1500 μ l volümler çekilerek ependorflara aktarılmıştır.
- 7) Mikrosantrifüj ile 600g 'de 5 dk santrüfjüj edilip süpernatant atılmıştır.
- 8) Pellet volümü ölçülmüştür. Yaklaşık tüm gruplarda 3 μ l bulunmuştur. 3 katı yani 9 μ l %5 SSA solüsyonu her ependorfa eklenip vortekslenmiştir.

- 9) Sıvı nitrojen kullanılarak her ependorf önce dondurulup ardından 37°C'de sıcak su banyosuna sokulmuştur. Bu işlem her örnek için 2 kez tekrarlanmıştır.
- 10) Sonrasında 2-8°C'de 5 dk bekletilmiştir.
- 11) 10.000 g'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
- 12) Süpernatantların tamamı yeni ependorflara aktarılırken her grupta ki süpernatant miktarları daha sonra hesaplamada kullanılmak üzere kayıt altına alınmıştır. Hemen deney yapılması planlanmayan K1 dışındaki gruplar -80°C'ye deney gününe kadar kaldırılmıştır.
- 13) Daha önce alikuatlanan GSH standart stok solüsyonu (10 mM) eritilip 200 kat dilüe edilerek 50 µM'lık (Standart 1) solüsyonu elde edilmiş, bu 50 µM'lık solüsyon dilüe edilerek 25, 12.5, 6.25, 3.15 µM'lık 50 µl'lik standart solüsyonları hazırlanmıştır.
- 14) Deney çalışma karışımı kitte yazıldığı gibi hazırlanmıştır.
- 15) 96'lık well plate'e ikili olarak (her grup ayrı ayrı yazılmıştır ancak önce 10 µl örnekler veya SSA eklenmiş, üzerlerine çalışma karışımı ve bekleme sonrası NADPH hepsine aynı zaman diliminde eklenmiştir)
- 16) 2 kuyucuk kör (ne standart ne de deney grubu olmayan) olarak belirlenmiş, bu iki kuyucuğa 10 µl %5 SSA eklendi, üzerine 150 µl Çalışma Karışımı eklenip pipetaj yapılmıştır. Oda sıcaklığında 5 dk bekletilmiştir. Bekleme sonrası 50 µl NADPH solüsyonu eklenmiştir.
- 17) Standart gruplarına, dublike olarak her gruptan 10 µl alınıp kuyucuklara eklenip üzerine 150 µl çalışma karışımı eklenerek pipetaj yapılmıştır. Oda sıcaklığında 5 dk bekletilmiştir. Bekleme sonrası 50 µl NADPH solüsyonu eklenmiştir.
- 18) Örneklerimizden öncelikle Kontrol (K1) grubunu dublike olarak değil ancak 3 farklı dilüasyonla ölçmek ve diğer deney gruplarımıza da onu uygulamada yol göstermesi açısından 10 µl dilüasyonsuz, 2 kat dilüasyon ve 4 kat dilüasyon grubu oluşturulmuştur. Dilüasyonlar %5 SSA ile yapılmıştır. Her 3 gruptan 10 µl deney için kuyucuklara eklenmiştir. Üzerine 150 µl çalışma karışımı eklenip pipetaj yapılmıştır. Oda sıcaklığında 5 dk bekletilip 50 µl NADPH solüsyonu eklenmiştir.
- 19) Elisa okuyucuda kinetik olarak 412 nm absorbansta 1 dk'lık intervallerle 5 dk kinetik okunmuştur.
- 20) Standart eğri oluşturulmuştur. Dilüasyonsuz grup standartların çok üzerinde çıktığı gözlenmiştir. Bu sebeple diğer deney gruplarında da 2 kat dilüasyon yapılmıştır.

Diğer deney gruplarının çalışması için yine standart solüsyonlar yukarıda belirtildiği gibi hazırlanmıştır.

- 21) 2 kuyucuk kör (ne standart ne de deney grubu olmayan) olarak belirlenip bu iki kuyucuğa 10 µl %5 SSA eklenerek, üzerine 150 µl Çalışma Karışımı eklenip pipetaj yapılmıştır. Oda sıcaklığında 5 dk bekletilip 50 µl NADPH solüsyonu eklenmiştir.
- 22) Standart gruplarına, ikili olarak her gruptan 10 µl alınıp kuyucuklara eklenmiştir. Üzerine 150 µl Çalışma Karışımı eklenip pipetaj yapılmıştır. Oda sıcaklığında 5 dk bekletilip 50 µl NADPH solüsyonu eklenmiştir.
- 23) Deney gruplarımız %5 SSA ile 2 kat dilüe edilerek 10 µl her gruptan (gruplarımız da SSC1, SSC2 vs. olduğundan kontrol grubu hariç her ana gruptan 4 plate oluşturulmuştur) üzerine 150 µl çalışma karışımı eklenip pipetaj yapılmıştır. Oda sıcaklığında 5 dk bekletilip 50 µl NADPH solüsyonu eklenmiştir.
- 24) Elisa okuyucuda kinetik olarak 412 nm absorbansta 1 dk'lık intervallerle 5 dk kinetik okunmuştur.
- 25) Standart eğri oluşturulmuştur. Standart eğri ile ortaya çıkan konsantrasyonlar değerlendirilmiştir.

Deney aynı yöntem ve aynı gruplarla N sayısını arttırmak için tekrarlanmıştır.

3.3.3. Kaspaz-3 (Caspase-3) Aktivitesinin Tayini

Memeli hücrelerinde, ICE-Ailesi proteaz/kaspaz aktivasyonu apoptozu başlatmaktadır. Caspase-3/CPP32 Colorimetric Assay Kiti (Biovision), DEVD sekansını tanıyan kaspazların aktivitesini test etmek için basit ve kullanışlı bir yol sağlar. Deney, DEVD-pNA substratının bölündükten sonra ortaya çıkan kromofor p-nitroanilin (pNA)'nın spektrofotometrik olarak tespit edilmesi esasına dayanır. Kaspaz-3 aktivite tayin kitimizin protokolünde, kaspaz-3 ölçülebilmesi için öncesinde protein konsantrasyonlarının ölçülmesi ve 50-200 µg protein olacak şekilde dilüe edilmesi istenmektedir. Protein konsantrasyonlarının ölçülmesi için deneyimizde BCA Protein Analizi (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific) kullanılmıştır. BCA sonucunda kaspaz-3 aktivite tayini için her bir kuyucuk için 100 µg protein belirlenmiştir.

1. Hücreler, her kuyucuğa 8×10^5 olacak şekilde 6'lı platelere ekilmiştir.

Deney Grupları

- a) Kontrol
- b) SSC
- c) SSC+ Memantin
- d) SSC+ LY341495
- e) SSC+ LY341495+ Memantin
- f) Memantin
- g) LY341495
- h) LY341495+Memantin olacak şekilde 8 deney grubu ikili çalışılmış, toplam 16 kuyucuğa ekim yapılmıştır. Ekim yapılırken (NB) kullanılmıştır. Son volüm 3 ml olarak belirlenmiştir.

2. NB içerisinde daha 37°C'de CO₂ inkübatöründe 24 saat kalıp diferansiye olduktan sonra besi yeri çekilip, son volüm 3 ml olacak şekilde mevcut gruptaki ilaçlar istenen dozda eklenmiştir. 24 saat daha 37°C'de CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir.
3. 24 saat bitiminde, hücreler her kuyuya, 800 µl PBS ve 800 µl Tripsin/EDTA ile muamele edilerek kaldırılmış, 2400 µl NB eklenerek santrifüj tüplerine aktarılıp 1500 rpm 5dk santrifüj edilmiştir. Süpernatantları atılarak kalan kısımlar üzerine 500 µl PBS eklenip pipetaj sonrası ependorflara aktarılmıştır. Mikrosantrifüj ile 14000 rpm'de 5 dk santrifüj edilip, süpernatant kısımları tamamen atılmıştır. Üzerlerine 50 µl Cell Lysis Buffer (Kaspaz-3 dahilinde mevcut olan) eklenip buz içerisinde 10 dk bekletilmiştir.
4. 10 dk bekleme sonrası, tekrar mikrosantrifüj ile 14000 rpm'de 5 dk santrifüj edilip, santrifüj sonrası süpernatant kısımlar yeni ependorflara aktarılmıştır. BCA deney gününe kadar beklemek üzere -80°C'ye kaldırılmıştır.
5. BCA Protein Analizi ile elde edilen protein konsantrasyonları kitte istendiği üzere 50-200 µg protein arasından 100µg seçilerek her bir grup son volümü 50 µl olacak şekilde Cell lysis buffer'la dilüe edilmiştir.
6. 2X reaksiyon buffer'ı çalışmanın hemen öncesinde 1ml 2X Reaksiyon Buffer + 10µl 1.0M DTT stok olacak şekilde hazırlanmıştır.
7. 96'lık well plate' e her kuyucuğa 50 µl Protein örnekleri eklenmiştir.
8. Her kuyucuğa 50 µl 2X Reaksiyon Buffer (DTT eklenmiş) eklenmiştir.
9. Her kuyucuğa 5 µl DEVD-pNA (4mM) eklenip 37°C'de 2 saat inkübe edilmiştir.
10. 2 saat inkübasyon sonrası 405 nm absorbansta Elisa okuyucuda okutulmuştur.

Deney aynı yöntem ve aynı gruplarla N sayısını artırmak için tekrarlanmıştır.

3.3.4. Comet Analizi

Comet Analizi yöntemi DNA hasar seviyesini göstermede önemli bir metot olarak karşımıza çıkmaktadır. Comet analizinin temelinde, kimyasal ve/veya fiziksel etkenler sonucu veya sitotoksik ve/veya genotoksik ajanların oluşturduğu etkileri gözlemlenebilir. Cometler, sistematik bir şekilde taranarak rastgele seçilmeli ve tüm jeli temsil etmelidir. Hava kabarcıklarının kenarları ve kenarlarda köşelerde kalan bölgeler sayıma dahil edilmemelidir. Bahsedilen bu bölgelerde çoğunlukla normalin dışında bir hasar karşımıza çıkmaktadır. Bilgisayar analizinde, üst üste binen cometlerin kuyruklarının oldukça uzun olması hatalı sonuca neden olabilir. Bu sebeple dahil etmemek daha uygun olacaktır. Ancak çok fazla göz ardı etmek sonuçların dağılımını bozabilir bu sebeple, hücre yoğunluklarının jelin hazırlama aşamasında iyi ayarlanması hatalı sonuç elde etmemek için önem arz etmektedir.

Çalışmada seçilen Cometler, bazı parametreler çerçevesinde Comet Assay IV yazılımı aracılığı ile ölçümleri gerçekleştirilmektedir.

Bu parametreler;

- Baş uzunluğu (Headlength, μm)
- Kuyruk uzunluğu (Taillength, μm)
- Baş Yoğunluğu (Headintensity, Baş kısmındaki DNA yüzdesi, % H-DNA olarak ifade edilir)
- Kuyruk Yoğunluğu (Tailintensity, Kuyruk kısmındaki DNA yüzdesi, % T-DNA olarak ifade edilir.)
- Kuyruk Momenti (Tailmoment, μm olarak ifade edilir, % T-DNA ile TL'nin çarpımının 100'e bölünmesi ile edilen bir değerdir)
- Kuyruk Migrasyonu (Tailmigration, Baş kısmının kenarından küçük saptanabilir fragmana DNA göçünün uzunluğudur.)

Bizim deneyimizde literatüre uygun olarak kuyruk uzunluğu (taillength) ve kuyruk yoğunluğu (tailintensity) analiz için kullanılmıştır.

Deneyin yapılışı:

1.Comet analizi çalışması için 6'lı plate'lere her kuyuda 600.000 hücre olacak şekilde son volüm 3 ml ayarlanarak ekim yapılmıştır.

2. İkili çalışma yapılması planlanmıştır.

3. 9 grup (ikili olarak toplam 18 kuyucuk)

Deney Grupları

- a) Kontrol (Negatif Kontrol)
- b) SSC
- c) SSC+ Memantin
- d) SSC+ LY341495
- e) SSC+ LY341495+ Memantin
- f) Memantin
- g) LY341495
- h) LY341495+Memantin
- i) Pozitif kontrol hücresi

4. Hücrelerin ekimi sonrası 24 saat NB içerisinde 37°C'de CO₂ inkübatöründe diferansiyasyon için bekletilmiştir.

5. 24. saatte önce mevcut kuyulardaki besi yerleri çekilip, yerine ilaçlar uygun konsantrasyonlarda NB içerisinde dilüe edilerek son volüm 3 ml olacak şekilde kuyulara eklenmiştir.

- İlaçların konsantrasyonlarının hesaplanması

$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ formülü ile hesaplanmıştır.

SSC: Stok 10 mM, 125 µM istenen konsantrasyon son volüm 3000 µl

Memantin: Stok 10 mM, 20 µM istenen konsantrasyon son volüm 3000 µl

LY 341495: Stok 1mM, 10 µM istenen konsantrasyon son volüm 3000 µl

6. ilaçlar verildikten sonra 24 saat daha 37°C'de CO₂ inkübatöründe inkübasyon için bırakılmıştır.

7. Deney günü, Pozitif kontrol hücrelerine deney öncesi 150 µM'lık hidrojen peroksit 20 dk süreyle uygulanmıştır. Besi yerleri çekilip her kuyuya 1 ml PBS eklenmiş ve bekletilip PBS ortamdan çekilmiştir. Sonrasında 0,8 ml tripsin/ EDTA eklenerek 1 dk 37°C'de CO₂

inkübatöründe bekletilip hücreler kaldırılmıştır. Üzerine 3 ml besi yeri eklenip tüplere alınmıştır.

8. Tüpler santrifüje konulup 1500 rpm 5 dk da çevrilip süpernatantları atılmıştır.

9. Hücre peletlerine 600 µl son volüm olacak şekilde besi yeri eklenip pipetajla homojen hale getirilmiştir.

10. Bütün tüplerden homojen olacak şekilde 10 µl (yaklaşık 10^4 hücre) alınıp ependorflara konulmuştur. 90 µl Low melting agar (LMA) her birine eklenmiştir. Pipetaj yapıp 80 µl daha önceden normal melting agarla kaplanmış lamlara (öncesinde metil alkolle temizlenmiş), her lama 80 µl olacak şekilde ependorflardan lamlara konulmuştur. Üzerlerine lamel (metil alkolle temizlenmiş) konulup 15 dk $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilmiştir.

11. 15 dk bitiminde lamların üzerindeki lameller atılıp, 75 µl LMA her birine konulmuş ve üzerlerine yeniden lamel konulmuştur. 15 dk $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilmiştir.

12. 15 dk bitiminde lameller atılıp lizis solüsyonuna konulup, 60 dk $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilmiştir.

13. 60 dk bitiminde buz dolu köpüğün içerisine elektroforez tankı yerleştirilmiştir. Lamlar elektroforezin içerisine akım yönünde yerleştirilmiştir. Elektroforez tankı elektroforez solüsyonu ile doldurulmuştur. 30 dk karanlıkta bekletilmiştir.

14. 20 dk 300mA 21 V elektroforez yürütülmüştür.

15. Sonrasında lamlar nötralizasyon buffer'ı içerisinde 5 dk bekletilip, soğuk distile su ile yıkanmıştır. Bu işlem toplamda 3 kez tekrarlanmıştır.

16. 5 dk lamlar kurutmaya bırakılmıştır.

17. 60 µl Etidyum bromür ile boyanmıştır.

18. Karanlık ortamda floresan ışık altında bakılmıştır. En az 50 tane DNA seçilip uzunlukları kaydedilmiştir. Bunlar comet assay IV programı aracılığı ile yapılmıştır.

Deney aynı yöntem ve aynı gruplarla N sayısını artırmak için tekrarlanmıştır.

3.3.4.1. Görüntü Analizi

Hasar görmemiş bir DNA, merkezi alanı beyaz ve parlak kenarlara ilerledikçe yoğunlukta azalma olarak karşımıza çıkmaktadır. Buna nonmigrasyon denmektedir. DNA hasarı oluştuğunda ve arttıkça görünüm kuyruklu yıldız benzemektedir. kuyruklarında

uzama görülmektedir. Hasarın derecesi ile uzama doğru orantılıdır. Buna Comet veya yüksek migrasyon denmektedir. Comet Assay IV programı aracılığı ile görüntüler analiz edilmiştir.

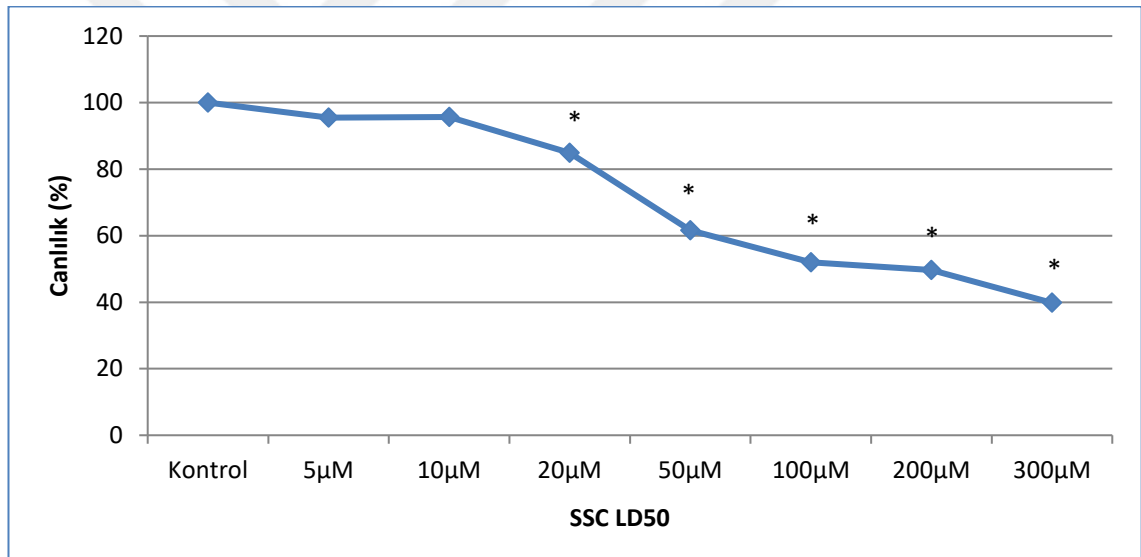
3.4. İstatistiksel Analiz

Veriler SPSS 24.0 paket programı ile analiz edilmiştir. Sürekli değişkenler ortalama \pm standart hata bilgileri ile grafiklerde ifade edilmiştir. Bağımsız grup farklılıklarının karşılaştırılmasında Tek Yönlü Varyans Analizi kullanılmıştır. Gruplar arasındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olması durumunda Post Hoc test olarak LSD (Least Significant Difference) testi kullanılmıştır. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. WST-1 Testi Sonuçları

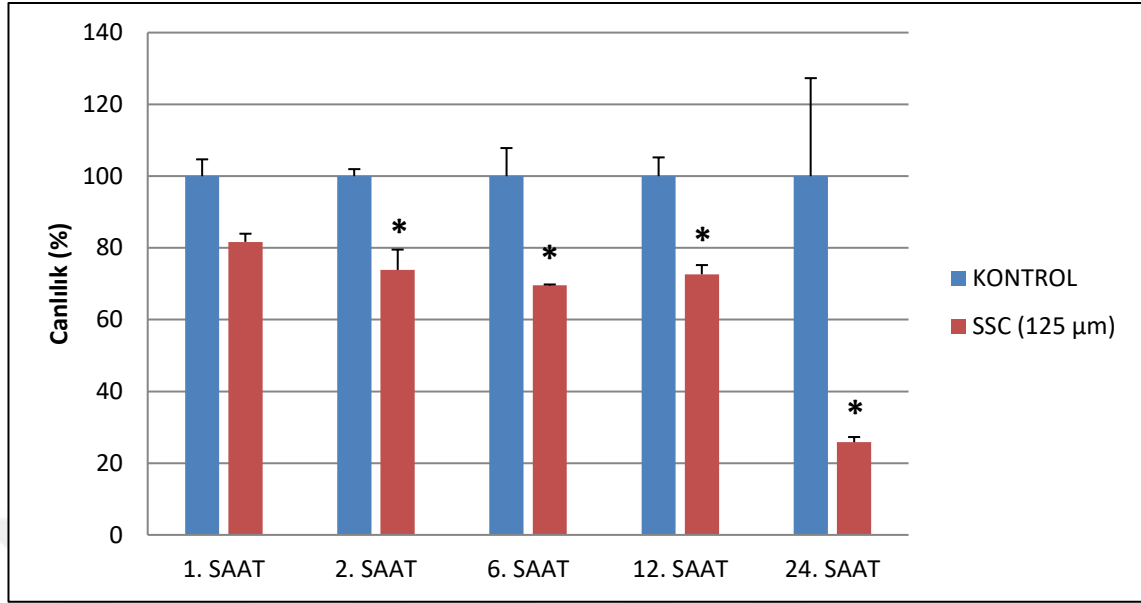
4.1.1. SSC LD₅₀ Dozu Belirleme



Şekil 11. SSC'nin artan dozlarda verilen sitotoksititeye yanıtın ölçülmesi. (n=4, *p<0.05 kontrol göre anlamlı fark gösterenleri belirtmektedir.)

SSC, 5-300 µM'lık doz aralığında hücrelere verilmiş 24 saatlik süreç sonunda test gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubuna göre 5, 10 µM'lık dozlarda anlamlı değişiklik gözlenmezken; 20, 50, 100, 200 ve 300 µM'lık dozlarda kontrol grubuna göre canlılıkta anlamlı azalma görülmüştür. Çalıştığımız dozlarda Probit analiz yapılarak SSC LD₅₀ dozu 125 µM olarak bulunmuştur.

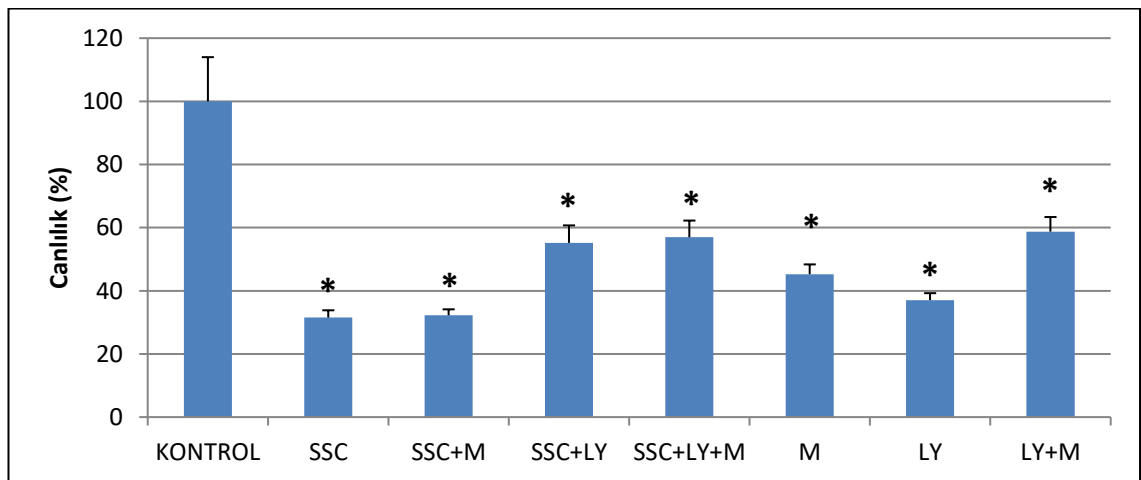
4.1.2. SSC Toksitesinin Zamana Bağlı Değişimi



Şekil 12. SSC Toksitesinin Kontrol grubuna kıyasla 1,2,6,12,24. saatlerdeki zamana bağlı değişimi. SSC (125µM): Cystein-S-Sulfat (Ortalama ± standart hata; n=2, *p<0.05 kontrol göre anlamlı fark gösterenleri belirtmektedir.)

SSC molekülünün toksik etkilerinin zamana bağlı değişimini görebilmek için SSC LD₅₀ dozunda tüm hücrelere verilmiş ve 1, 2, 6, 12, 24. saatlerde çalışılmıştır. 1. saat sonuçları anlamlı değişim gözlenmemiş, ancak 2, 6, 12, 24. saat sonuçları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı canlılıkta azalma gözlenmiştir. 12 ve 24. Saatler arasında anlamlı değişiklik mevcuttur.

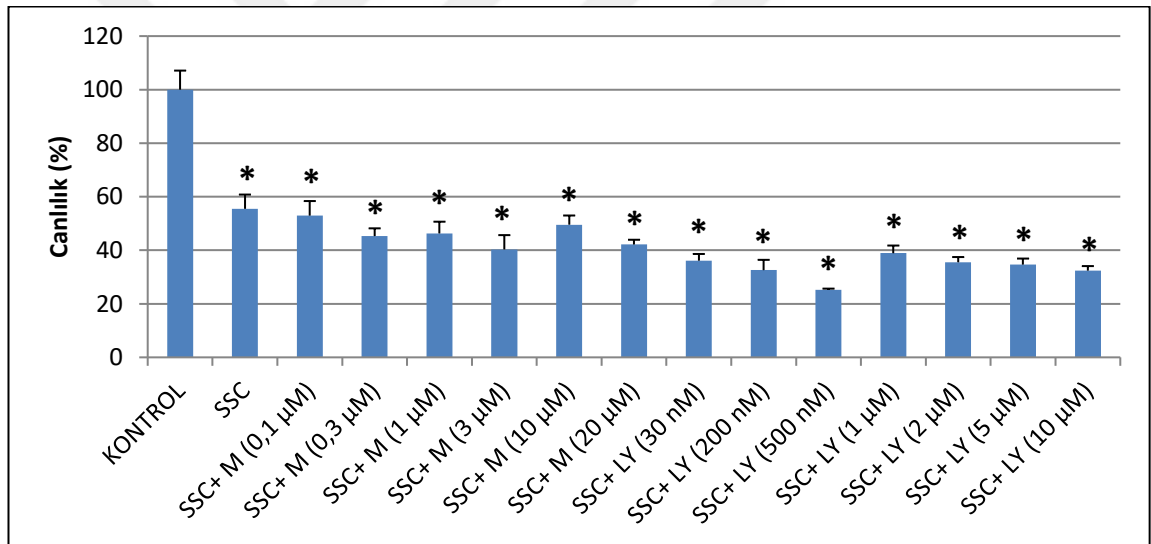
4.1.3. Glutamat Reseptör Blokörlerinin SSC Toksitesinin Önlenmesindeki Rolünün Araştırılması



Şekil 13. SSC ve Glutamat Reseptör Blokörlerinin birlikte ve tek başlarına sitotoksik etkilerinin araştırılması. SSC (125µM): Cystein-s-sulfat, M (20 µM): Memantin, LY (10µM): LY341495. (Ortalama ± standart hata; n=8, *p<0.05 kontrol göre anlamlı fark gösterenleri belirtmektedir.)

SSC'nin önceki çalışmalarda göstermiş olduğumuz toksik etkilerinin glutamat reseptör blokörleri ile birlikte verildiğinde canlılık üzerine etkilerini gözlemek için belirtilen grup ve dozlarda hücrelere ilaçlar verilmiş ve 24. Saatte çalışılmıştır. Kontrol grubuna kıyasla tüm ilaç verilen gruplarda canlılık anlamlı oranda azalmıştır. SSC grubuna göre, SSC+ M grubu, M, LY grupları anlamlı değişiklik göstermemiştir. M ve LY gruplarının da canlılığı SSC' den bağımsız azalttığı gözlenmiştir. LY tek başına canlılığı azaltırken M ile birlikte verildiklerinde LY grubuna kıyasla canlılıkta daha az azalma gözlenmiştir. SSC' nin toksik etkisini SSC+ M gurubu azaltmazken, SSC+ LY ve SSC+ LY+ M gruplarının azalttığı gözlenmiştir. SSC+LY ve SC+LY+M grupları arasında ise anlamlı farklılık gözlenmemiştir.

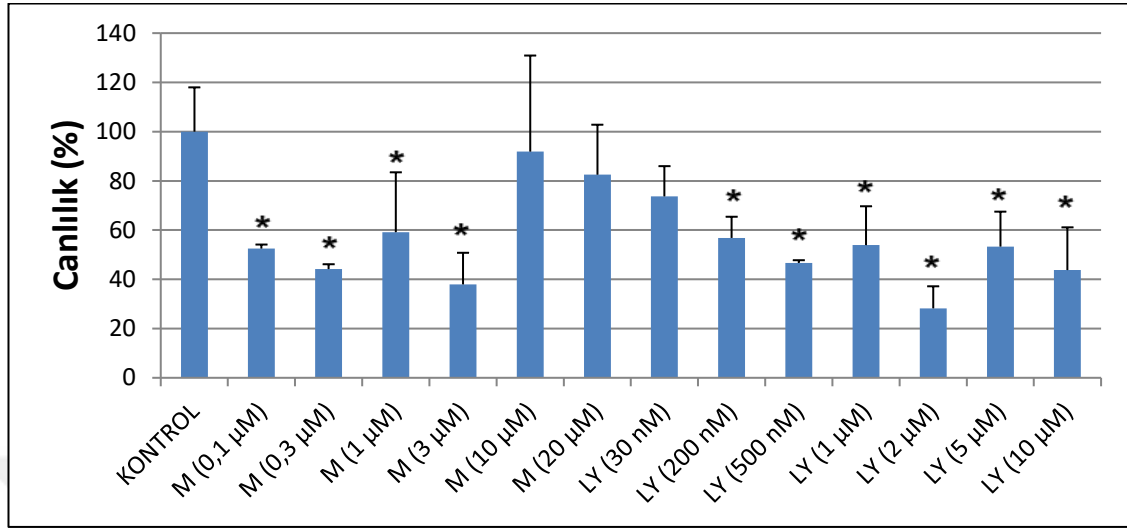
4.1.4. Farklı Dozlardaki Glutamat Reseptör Blokörlerinin SSC Toksisitesini Önlemedeki Rolünün Araştırılması



Şekil 14. Glutamat Reseptör Blokörlerinin Farklı Dozlarıyla birlikte SSC verilmesi ile hücrelerde oluşan toksitenin kontrol grubuyla karşılaştırılması. SSC (125 µM): Cystein-s-sülfat, M (0.1 µM, 0.3 µM, 1 µM, 3 µM, 10 µM, 20 µM): Memantin, LY (30 nM, 200 nM, 500nM). (Ortalama ± standart hata; n=3, *p<0.05 kontrolden fark gösterenleri belirtmektedir.)

SSC etkisine glutamat reseptör blokörlerinin farklı dozlardaki etkisi gözlenmeye çalışılmıştır. Kontrol grubuna kıyasla tüm deney gruplarında istatistiksel olarak anlamlı canlılıkta azalma mevcuttur. SSC'ye göre SSC+M 0.1 µM ve SSC+ M 10 µM grubu artma ya da azaltma göstermezken, diğer tüm gruplarda SSC ile birlikte hücre canlılığı kontrole göre anlamlı derecede azalmıştır.

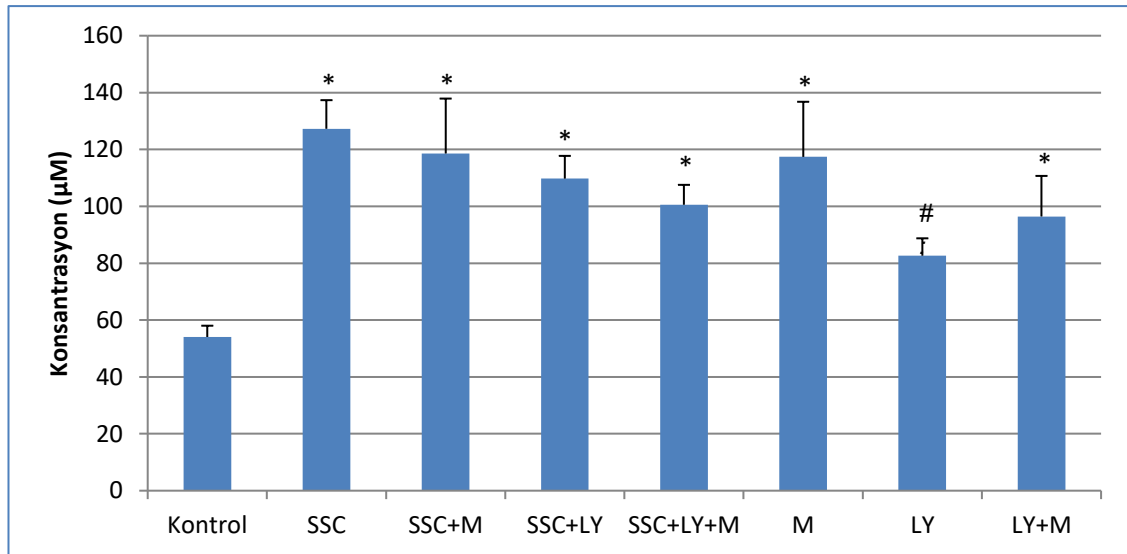
4.1.5. Glutamat Reseptör Blokörlerinin HT-22 Hücreleri Üzerine Toksik Etkilerinin Araştırılması



Şekil 15. Glutamat Reseptör Blokörlerinin Farklı Dozlarda HT-22 Hücreleri üzerine toksik etkilerinin araştırılması. M (0.1 µM, 0.3 µM, 1 µM, 3 µM, 10 µM, 20 µM): Memantin, LY (30 nM, 200 nM, 500 nM, 1 µM, 2 µM, 5 µM, 10 µM): LY341495. (Ortalama ± standart hata; n=2, *p<0.05 kontrol göre anlamlı fark gösterenleri belirtmektedir.)

SSC verilmeden belirtilen dozlarda ilaçlar verilerek 24 saat sonunda hücreler üzerindeki etkileri gözlenmiştir. M 10 µM, 20 µM ve LY 30 nM grupları haricine tüm grupların kontrole göre canlılığını anlamlı derecede azaltmıştır.

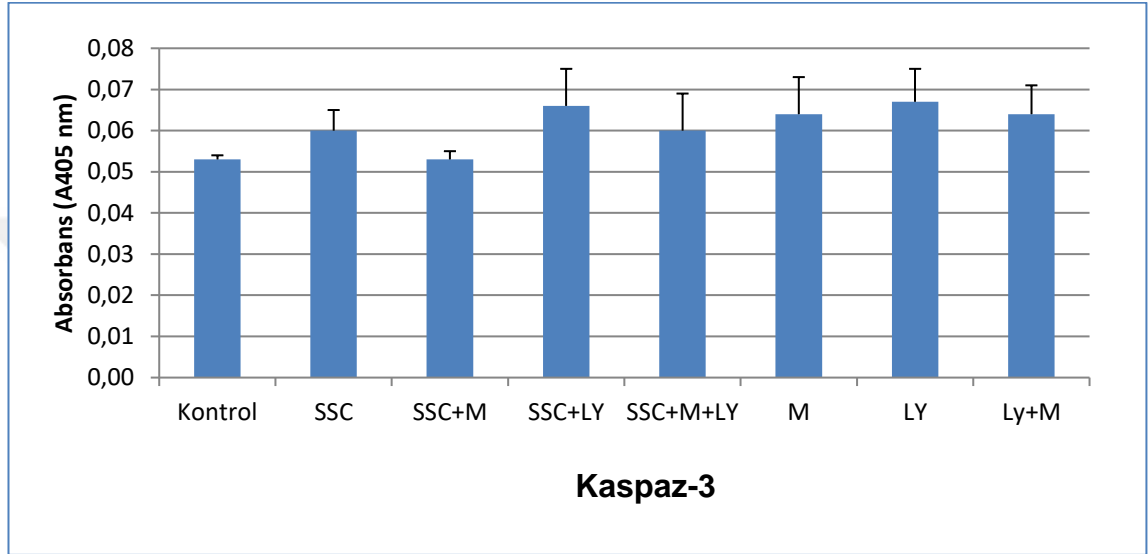
4.2. Hücre içi Total Glutasyon Ölçümü



Şekil 16. Glutamat Reseptör Blokörlerinin ve SSC ile tek başlarına ve birlikte verildiklerinde hücre içi total glutasyon düzeylerinin incelenmesi. SSC (125 µM): Cystein-s-sülfat, M (20 µM): Memantin, LY (10 µM): LY341495. (Ortalama ± standart hata; n=4, *p<0.05 kontrol göre anlamlı fark gösterenleri belirtmektedir. #: p<0,05 LY grubunda, SSC ve SSC+M grubuna göre anlamlı azalmayı ifade etmektedir.)

LY grubu haricinde tüm gruplarda 24 saat sonrasında ölçümler sonucunda kontrol grubuna göre anlamlı artış mevcuttur. SSC ve SSC+ M gruplarına göre LY grubunda anlamlı olarak daha az miktarda glutatyon ölçülmüştür.

4.3. Kaspaz-3 (Caspase-3) Aktivitesinin Tayini

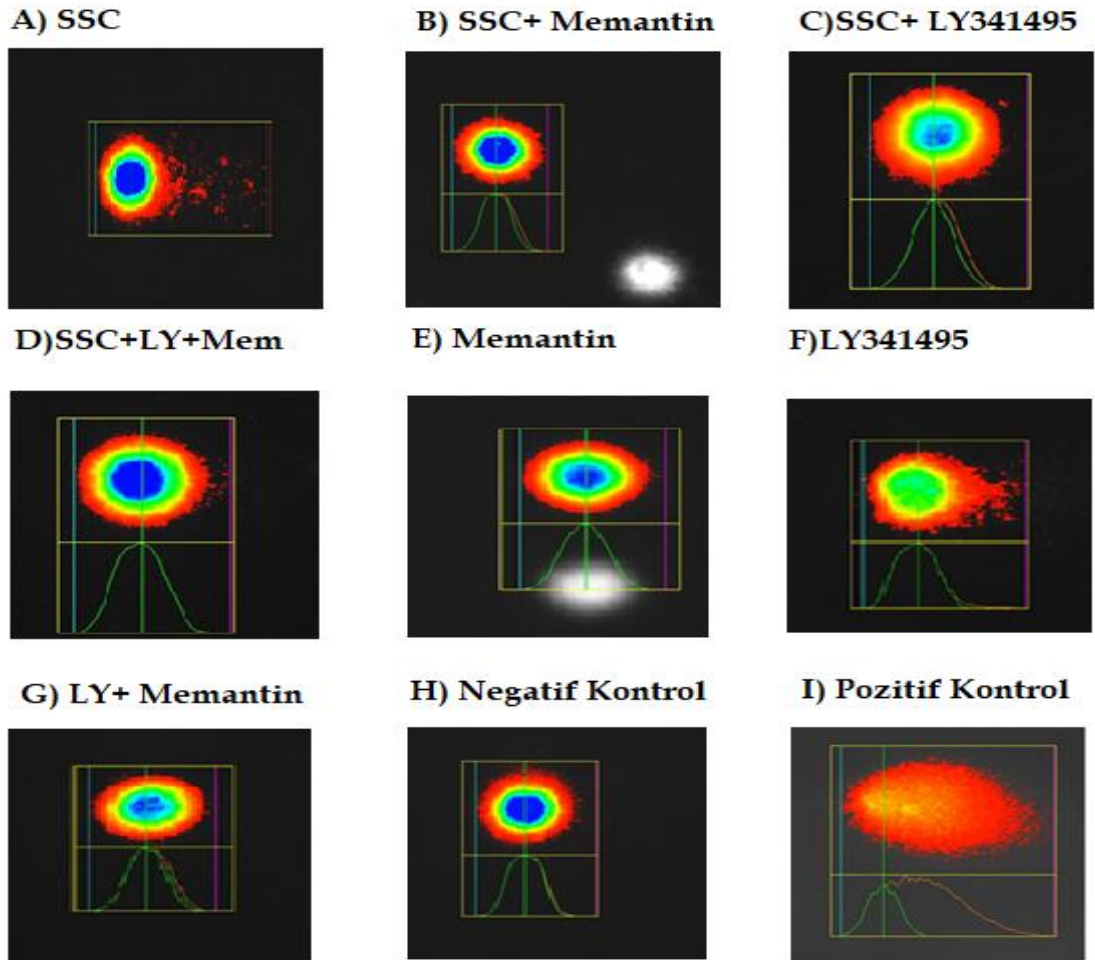


Şekil 17. Glutamat Reseptör Blokörlerinin ve SSC ile tek başlarına ve birlikte verildiklerinde Kaspaz 3 aktivitelerinin tayini ve kontrol grubuna göre kıyaslanması. SSC (125 μ M): Cystein-sülfat, M (20 μ M): Memantin, LY (10 μ M): LY341495. (Ortalama \pm standart hata; n=4)

SSC toksitesinin kaspaz-3 apoptotik yolu üzerinden etkisini gözlemlemek için gruplara belirtilen dozlarda ilaçlar verildi. 24 saatin sonunda ölçümler gerçekleştirildi. Kontrol grubuna göre ve diğer grupların kendi aralarındaki ölçümlerinde anlamlı değişiklik gözlenmemiştir.

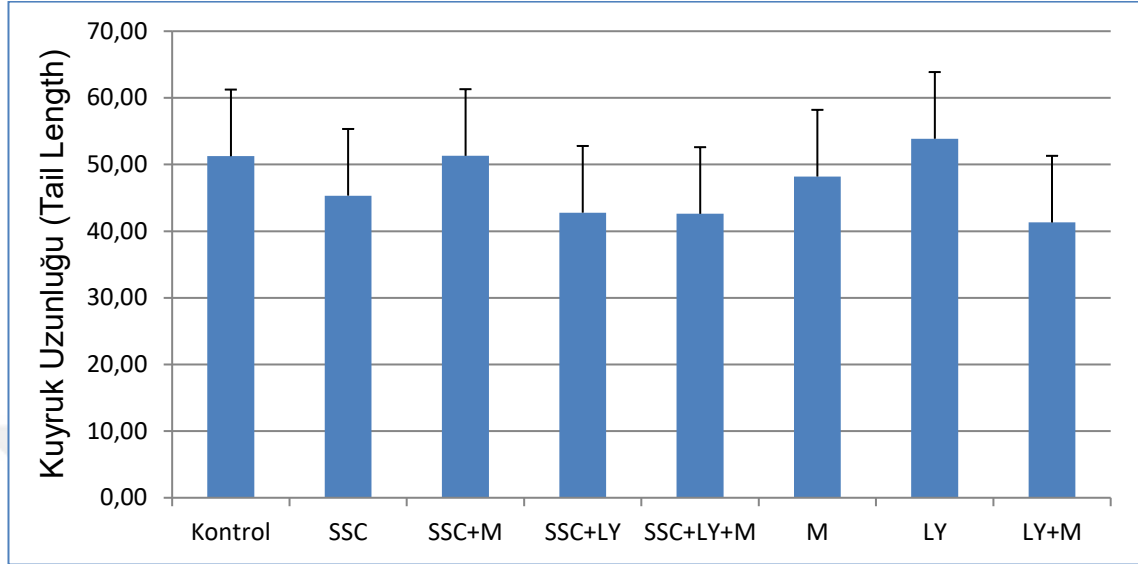
4.4. Comet Analizi Sonuçları

4.4.1. Comet Analizinin Görüntüleri

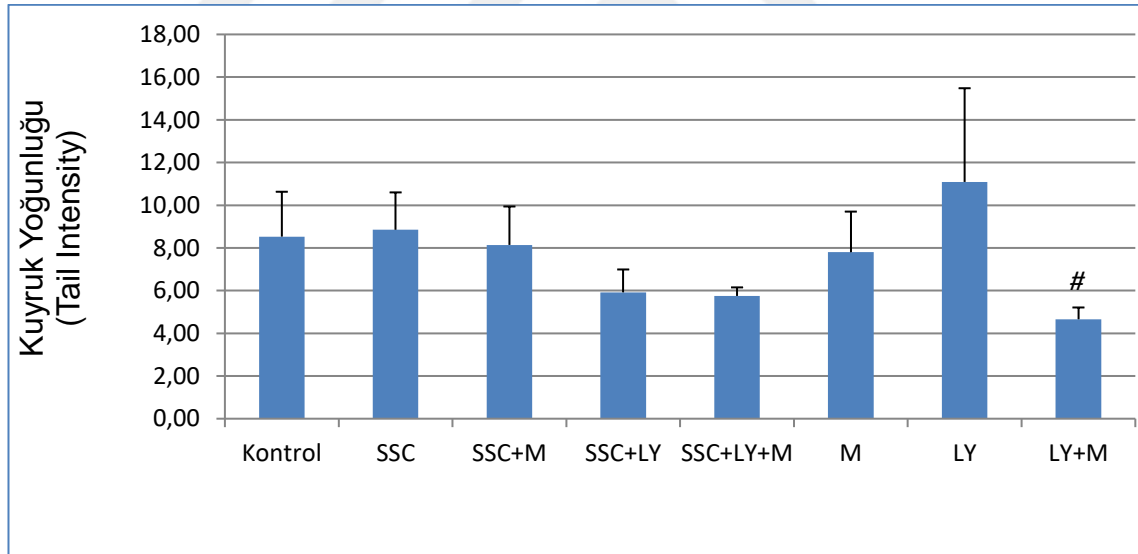


Şekil 18. Deney gruplarının Comet Analizi Görüntüleri. A) SSC, B) SSC+ Memantin C) SSC+ LY 341495, D) SSC+ Memantin+ LY341495, E) Memantin F) LY341495, G)Memantin + LY 341495 H) Negatif Kontrol I)Pozitif Kontrol

4.4.2. Comet Analizi Verilerinin Grafikleri



A) Kuyruk Uzunluğu



B) Kuyruk Yoğunluğu

Şekil 19. Comet Analizi sonucunda elde edilen değerlerin grafikleri. SSC (125 µM): Cystein-s-sülfat, M (20 µM): Memantin, LY (10µM): LY341495 A) Kuyruk Uzunluğu (Tail length) B) Kuyruk Yoğunluğu (Tail Intensity). (Ortalama ± standart hata; n=4, #: p<0,05 düzeyinde LY ve LY+M grupları arasındaki farkı göstermektedir.)

Kuyruk uzunluğu ve yoğunluğu ölçümleri, kontrol grubuna göre değerlendirildiğinde SSC ve diğer ilaç gruplarında anlamlı genotoksite lehine değişim izlenmemiştir. LY grubu ile LY+M grupları arasında istatistiksel anlamlı değişim gözlenmiştir.

5. TARTIŞMA

Tez çalışmamızda, SSC'nin toksik etkisini göstermek ve olası toksisite mekanizmasını açıklayabilmek için, WST-1 sitotoksosite deneyi, kaspaz 3 aktivite tayini, hücre içi total glutatyon ölçümü ve Comet analizi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. WST-1 sitotoksosite deneyinde, SSC'nin öncelikle LD₅₀ dozunu probit analizi ile belirleyip sonrasında zamana bağlı değişimi incelenmiştir. SSC'nin, 1. saat haricinde istatistiksel açıdan anlamlı şekilde zaman ilerledikçe canlılığı düşürdüğü gösterilmiştir. Glutamat reseptör blokörlerinin SSC toksisitesi üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Glutamat reseptör blokörlerinin, SSC molekülünün toksik etkilerini azaltmadıkları, hatta kendilerinin SSC'den bağımsız olarak hücrelere uygulandığında toksik etkileri olduğu görülmüştür. Bu etkilerini daha iyi değerlendirebilmek için, farklı dozlarda glutamat reseptör blokörleri ile SSC birlikte verilip deneyimiz tekrarlanmıştır. Bu deney sonucunda da kullandığımız glutamat reseptör blokörlerinin toksik etkileri karşılaştırılmıştır. SSC'den bağımsız etkilerini değerlendirebilmek için farklı glutamat reseptör blokör dozları SSC verilmeden hücrelerde çalışılmıştır. Glutamat reseptör blokörlerinden memantin 10 ve 20 µM'lık dozları dışındaki dozlarda ve LY341495'in 30nM dışındaki tüm dozlarında toksik etkileri olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmamıza kaspaz-3 aktivite tayini ile devam edilmiştir. Kontrol grubuna göre SSC ve glutamat reseptör blokörleri arasında, birlikte ya da tek olarak verilmeleri durumunda kaspaz-3 aktiviteleri açısından anlamlı farklılık gözlemlenmemiştir. Hücre içi total glutatyon ölçümü ile oksidatif kompanzasyon olup olmadığı değerlendirilmiştir. Kontrol grubuna göre SSC ve glutamat reseptör blokörleri verilen hücrelerdeki hücre içi total glutatyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı artışlar meydana geldiği gözlemlenmiştir. Son olarak Comet Analizi aracılığı ile deney gruplarımızda DNA hasarı olup olmadığını gözlemlenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla deney gruplarımızda anlamlı DNA hasarı izlenmediği görülmüştür.

Çalışmamızda bir glutamat analogu olan SSC'nin nörotoksitesi teyit edilmiştir. Literatürde konu ile ilgili yapılmış sadece iki adet çalışma bulunmakta ve bu çalışmalar da bulgularımızı desteklemektedir. Bu çalışmalar, Kumar ve ark. (2017) ve Bouvier ve ark. (1991)'nin çalışmalarıdır. Bouvier ve arkadaşlarının (1991) çalışmasında SSC'nin

toksik etkileri salamander retinasının nöroglia hücrelerinden elde edilmiş olan Müller hücrelerinde, glutamattan çok daha eksitotoksik olarak değerlendirilmiştir. Ancak aynı çalışmada bu eksitotoksik etkinin NMDA reseptörleri üzerinden olduğundan bahsedilmekle beraber, glutamat reseptörlerinden farklı reseptörler üzerinden etki edebileceği de göz ardı edilmemiştir. Müller hücreleri birçok nörotransmitter reseptörü eksprese etmektedir. Müller hücrelerinde eksprese edilen reseptörlerin başında GABA_A ve birkaç tip glutamat reseptörü yer almaktadır. Bunun yanında Müller hücreleri glutamat için, yüksek afiniteli alım taşıyıcılarına sahiptir (Newman ve Reichenbach, 1996). Bouvier ve arkadaşları (1991) deneylerinde Müller hücrelerinde whole-cell patch clamp yöntemini kullanmışlar ve sisteik asit, sistein sülfonik asit, homosisteik asit, homosistein sülfonik asit ve SSC'nin negatif potansiyellerde içe doğru membran sodyum akımının daha geniş uyarıldığı, +30 mV'a kadar pozitif potansiyellerde daha az uyarılma olduğu göstermişlerdir. Çalışmalarında eksitotoksite deneyleri yapılmış ve eksitotoksite değerleri büyükten küçüğe: Homosisteik Asit> S-Sulfo-L-sistein> Homosisteinsülfonik asit> Glutamat> Sistein Sülfonik Asit> Aspartat> Sisteik Asit olarak bulunmuştur. Burada da görüleceği üzere SSC, sistein sülfonata göre çok daha eksitotoksik etkiye sahiptir. SSC'nin sistein ve sistein sülfonata göre daha toksik görünse de bu üç molekülün içine alan bir çalışma daha aydınlatıcı sonuçlar elde etmemizde fayda gösterebilir. Bizim çalışmamız, fare hipokampus hücre dizini olan HT-22 hücreleri ile deneylerimiz gerçekleştirilmiştir. HT-22 hücre dizini glutamat reseptörlerinin varlığının gösterilmiş olduğu, glutamat toksite deneylerinde ilk akla gelen hücre gruplarından biridir. SSC'nin glutamat analogu olmasından ötürü hücre seçiminin uygun olduğu düşünülmüştür. Bouvier ve arkadaşları (1991) SSC'nin etkin toksik dozunu 1 mM olarak kullanmışlar, 100 µM'lık dozu da denemişler ancak sonuç alamamışlardır. 1mM'in altında başka bir doz denemesi de gerçekleştirilmemişlerdir. Bizim çalışmamızda LD₅₀ dozu 125 µM olarak bulunmuş ve bu doz ile çalışma yapılmıştır. Bouvier ve arkadaşları SSC'nin ara dozlarında etkilerini göstermemişlerdir. Ayrıca Müller hücrelerinin glial hücre olması ve HT-22 hücrelerinin ise nöron hücresi olması dozlar arasında farklılığın bir sebebi olabilir. Bouvier (1991) ve arkadaşları SSC'nin ve diğer sülfür içeren moleküllerin eksitotoksite indeksini oluşturmuşlar ve bizim çalışmamızı da destekler şekilde SSC'nin sitotoksik etkili olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca SSC'nin glutamata göre daha sitotoksik olduğunu belirtmektedirler. Bu sitotoksiteyi, SSC'nin hücre içine alımındaki zorluk sebebi ile ekstrasellüler alanda uzun süre kalıp glutamat reseptörlerini sürekli uyararak yaptığını ifade etmişlerdir. Eksitotoksite sadece NMDA reseptör aktivasyonu ile olmayabileceği başka reseptör aktivasyonlarının da rol oynayabileceğini ifade etmişlerdir. Bu bilgi de bizim sonuçlarımızı desteklemektedir. Çalışmamızda ortaya çıkan Memantin ve

LY341495'in kendilerinin tek tek verilmesi ile görülen toksik etkinin değerlendirilebilmesi için, tekrar farklı sitotoksite testleri ile çalışılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Kumar ve arkadaşlarının (2017) çalışmasında, SSC'nin nörotoksik etkilerinin hücre içerisine kalsiyum akışına bağlı olarak, hücre sinyalizasyon olaylarını azaltarak gösterdiğini belirtmişlerdir. Ayrıca SSC'nin NMDA reseptör agonisti olduğunu belirtmişlerdir. Kumar ve ark. (2017) çalışmalarında, HEK293 böbrek hücre dizini ve korteks veya hipokampüsten alınmış primer nöron kültürü kullanmışlardır. Toksite çalışmalarını 12 saatlik sürede 200 μ M'lık SSC, tiyosülfat, taurin ve süfit dozu kullanarak MTT analizi ile gerçekleştirmişlerdir. Reseptör blokörü olarak MK801 ve memantin (NMDAR blokörü) ve NBQX (AMPA blokörü) kullanmışlardır. SSC'nin sitotoksik etkilerini çalışma sonuçlarında göstermişler, ayrıca memantin SSC'nin toksik etkilerini geri çevirdiğini bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda da NMDA reseptör blokörü olan memantin kullanılmıştır. Çalışmamızda memantin, SSC'nin toksik etkilerini Kumar ve ark. (2017)'nin çalışmasının aksine geri çevirmediği bulunmuştur. Çalışmalarında SSC'nin NMDAR ve AMPAR'ları aktive ettiklerini göstermişlerdir. Bizim bulgularımızla Kumar ve ark. (2017) bu konuda örtüşmemektedir. Ayrıca çalışmalarında memantin güvenli olarak kullanılabileceğini ifade etmektedirler, bizim çalışmamızda ise memantin de toksik etkileri olduğu gösterilmiştir. Bu farklılık, kullanılan hücre hatlarının benzer özellikte olmamasından veya deney yapılan kitlerin farklı olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Normal şartlarda, glutamatin hücre içine alımı, hücre içi potasyum iyonu tarafından kolaylaştırılmaktadır. Sodyum bağımlı eksitatör amino asid taşıyıcıları (EAAT) ekstraselüler alandan hücre içine, sodyumdan bağımsız çalışan vesiküler glutamat taşıyıcıları (VGLUT) ise sitoplazmadan veziküllere glutamat taşınımında görevlidirler. Sodyum bağımlı EAAT'ler ayrıca potasyum ve hidrojen iyonunun transmembran gradientine bağlıdır. Sodyum bağımlı taşıyıcılar yüksek afiniteli glutamat taşıyıcısı olarak bilinmektedirler. VGLUT'lar ise EAAT'ye glutamat afiniteleri yüz kat daha düşüktür. EAAT antiporterlar, hücre içine 3 sodyum ve 1 hidrojen iyonu alırken hücre dışına da bir potasyum iyonu taşırlar. Böylelikle nöronal yapılar glutamat toksisitesinden korunmuş olurlar. SSC için de Bouvier (1991) ve arkadaşları glutamat benzeri bir transport sistemi ile hücre içine alım olabileceğini göstermişler ve bu alımın glutamat alım hızından çok daha düşük olduğunu belirtmişlerdir. Ancak mevcut literatürde, SSC'nin detoksifiye edilmesi için tam bir mekanizma ortaya konulamamıştır. Szatkowski ve arkadaşları (1990) anoksi gibi ekstraselüler yüksek potasyumun konsantrasyonunun arttığı patolojik durumlarda hücre içine glutamat alımının inhibe olduğunu göstermişlerdir. Anoksinin

oluşturduğu beyin hasarında, ekstrasellüler glutamat konsantrasyonları toksik dozlara çıkmaktadır. Birkaç dakikalık anoksi sonrası ATP düşmesi ile vesiküler glutamat salınımı inhibe olmaktadır. Anoksi sonucunda ekstrasellüler K^+ konsantrasyonunun 50 mM'a kadar yükselmesi, glutamat geri alımının bozulmasına yol açılmaktadır. Ayrıca, ekstrasellüler alana membran depolarizasyonu sonucu glutamat salınımı artmakta ve ekstrasellüler glutamat konsantrasyonu artmaktadır (Szatkowski vd 1990).

SSC' nin glutamat analogu olduğunu düşünülürse düzeyinin arttığı sülfid oksidaz yetersizliği gibi çeşitli patolojik durumlarda bu mekanizma SSC'nin araştırmamızda da teyit edilen toksitesinin ortaya çıkmasına sebep olabilir. Glutamat ve SSC'nin toksitesinin patch clamp yöntemi ile ilerde farklı hücre ve hayvan deneylerinde; iyon değişimlerinden nasıl etkilendiği, yardımcı "transporter"lar olup olmadığı ayrıca araştırılması gereken; bizim de tezimizde eksik olarak nitelendirebileceğimiz konulardır.

Çalışmamızda DNA hasarını göstermek için Comet analizi yapılmıştır. Sonuçlarda SSC' nin genototoksik bir etkisinin, 24 saatlik süreçte olmadığı gösterilmiştir. SSC' nin literatürde çalışılmış genototoksik etkisi ile ilgili bir bilgi taramamızda bulunamamıştır. Comet analizinde literatürü incelediğimizde glutamat eksitotoksitesinin genototoksik etkilerinin ortaya çıkarılması için çalışmalar yapıldığı görülmektedir. SSC' nin glutamat benzeri etkileri göz önüne alındığında glutamatın sonuçları ile kıyaslama bize SSC' nin etkileri konusunda fikir vermektedir. Ataseven ve arkadaşlarının (2016) çalışmasında, monosodyum glutamat toksisitesi, genototoksite açısından çalışılmış ve mono sodyum glutamatın genototoksik etkileri olduğu gösterilmiştir. Mono sodyum glutamat molekülü glutamat eksitotoksitesinde çalışılmaktadır (Lee vd 2018). Çalışmamızda glutamat kullanmadığımız için HT-22 hücre dizininde de SSC'nin aksine DNA hasarı yapıp yapmadığı hakkında bilgi sahibi değiliz; bu da çalışmamızın zayıf yanlarından biridir. Yaptığımız comet analizinde SSC molekülünün eksitotoksik olmasına rağmen genototoksik etkisini gösterememiş olmamız, SSC'nin genototoksik etkisi olmadığını tamamen gösteremeyebilir. SSC' nin genototoksik etkileri DNA onarım mekanizmaları ile süratli bir şekilde düzeltiliyor olabilir. Yang ve arkadaşları (2010) çalışmalarında, glutamatla indüklenen DNA hasarının yükselmiş DNA tamir aktivitesi ve apürinik endonükleaz I (AEI) protein ve mRNA seviyelerinde artış ile onarıldığını göstermişlerdir. Bu bulgu bizim bulgularımızı desteklemektedir. İleri çalışmalarda glutamat ile oluşturulacak deneyler ile HT-22 hücre dizininde genototoksik etki yapıp yapmadığı, literatürle uyumlu olarak yapıyor ise; SSC'nin bilinenin aksine tam bir glutamat analogu olmadığı, spesifik farklı bir mekanizma ile etki ettiği düşüncesine varılabilir. SSC WST-1 sitotoksisite deneyine göre sitotoksik bir moleküldür. SSC

molekölünün sitotoksite gösterirken genototoksite göstermediği çalışmamız sonucunda görülmüştür. Vardar ve arkadaşlarının (2018) çalışmasında V79 (Çin hamster akciğer fibroblast) hücre dizininde meso-2,3-dimerkaptosüksinik asitle kaplanmış gümüş sülfid kuantum noktaları (DMSA/Ag₂S QDs) verilmiş ve bu hücelere MTT sitotoksite deneyi ve comet analizi gerçekleştirilmişlerdir. Sonuçlarında hücrelerde sitotoksisite görüldüğü halde genototoksite görülmemiştir. Bu bulgu bizim bulgularımızı desteklemektedir. Sitotoksite deneyi için DMSA/Ag₂S QDs'tan 5-2000 µg/ml gibi geniş bir aralık kullanmışlar, 400 µg/ml doz ve üzerinde sitotoksite izlemişlerdir. Genototoksite için yine sitotoksite kullandıkları aralıkta DMSA/Ag₂S QDs tedavisi verilmiş ancak hiçbir dozda genototoksite izlenmemiştir. Aynı çalışmada apoptoz için p53, Kazpaz 3, Kazpaz 9 aktiviteleri ile bu apoptoz parametrelerinin mRNA ekspresyonları ve bax mRNA ekspresyonu çalışılmış ve tedavi verilen hücre gruplarında düşük dozlarda aktivite görülmemiş, yüksek dozlarda ise belirtilen apoptoz parametrelerinin mRNA düzeylerinde artış izlenmiştir. Düşük dozlarda ise kazpaz 3 başta olmak üzere diğer apoptoz parametrelerinin mRNA düzeylerinde artış izlenmemiştir. Nohmi (2018)'nin derlemesinde fenobarbital, karbon tetraklorit ve dietilstilbestrol gibi karsinogenik ajanların genototoksite yapmadan sitotoksite yaptığı ve hücre proliferasyonu üzerinden etki yaptığı bildirilmiştir. Bu bilgiler de bizim bulgularımızı desteklemektedir. SSC genotoksik etki göstermeden sitotoksisite gösteriyor olabilir. Sitotoksisite mekanizmasının anlaşılabilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızda, WST-1 sitotoksisite deneyi ile, memantin toksik etkisi olduğu gösterilmiştir. Memantin bilindiği üzere pratikte Alzheimer Hastalığı tedavisinde rutinde sık kullanılan bir moleküldür. Literatürde memantin toksik etkileri olduğuna dair bir tek Sekiguchi ve arkadaşlarının (2018) çalışması bulunmaktadır. Bu çalışmada GIMEN hücreleri (Nöroblastoma hücreleri) kullanmışlardır. Hücelere, 1-100 µM'lık konsantrasyonlarda memantin verilmiş ve 48 saatlik süre sonunda hücre canlılığı çalışılmıştır. Ayrıca 10 µM'lık konsantrasyonda memantin verilmiş ve verilmemiş gruplardan protein ekstratları alınmış ve 2D-DIGE (2 dimensional-differential image gel electrophoresis) ile ayrılmıştır. Kütle spektrometrisi kullanılarak da protein noktalarının tanımlanması yapılmıştır. 100 µM'lık memantin verilen grupta verilmeyenlere göre hücre canlılığında azalma görülmüştür. Memantin verilen gruplarda doz artışıyla orantılı olarak da hücre gelişiminde azalma görülmüştür. Tanımlanan proteinlerden kontrol grubuna göre değişiklikleri incelendiğinde, β-aktin, γ-enolaz ve glutatyon sentetaz ekspresyonlarında azalma görülmüştür. Memantin toksitesinin mekanizmasının da bu belirtilen protein ekspresyonlarının azalması ile ilgili olabileceğini öne sürmektedirler. Memantin'in toksik etkileri olmasının çeşitli sebepleri olabilir. Bizim çalışmamızda,

kullandığımız hücre tipine bağlı, yani fare hipokampus hücre hattı kullanmamıza bağlı olarak, memantin bu bölgede toksik etkilere sahip olabilir. Sekiguchi ve arkadaşları benzer şekilde nöronal kökenli olsa da kanser hücre hattı kullanmalarına bağlı toksik sonuç elde etmiş olabilirler. WST-1 deneyinde hücre sayısı ve SSC LD₅₀ dozu belirleme sonrası 8 grupta deney gerçekleştirilmiştir. SSC'nin yanı sıra Memantin (20 µM) ve LY341495 (10 µM) gruplarında da kontrol grubuna göre anlamlı toksik etkileri olduğu gösterilmiştir. Bu şekilde bir sonuç elde edilince, SSC ile birlikte Memantin ve LY341495'in farklı dozlardaki etkilerini görmek için deneyi tekrarlanmış ve sonuç olarak SSC ile birlikte farklı dozlarda verilmelerinde yine istatistiksel olarak anlamlı toksisite görülmüştür. Bu sonucu teyit etmek maksadı ile SSC verilmeden Memantin ve LY341495'in farklı dozlardaki etkilerini tekrar çalışılmıştır. Bunun sonucunda ise, Memantin'in 10 ve 20 µM'lık dozlarında ve LY341495'in 30 nM'lık dozunda toksik etki gözlenmemiştir. SSC'nin eksitotoksik etkilerinin olduğu ise çalışmamızda gösterilmiştir. SSC, sadece glutamat reseptörleri üzerinden değil, başka bir yolak üzerinden de toksik etki gösteriyor olabilir. LY341495 ve Memantin'in toksik etkilerinden dolayı SSC'nin glutamat reseptör agonisti olup olmadığına çalışmamız sonucunda karar verilememiş olup ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamız kapsamında kaspaz-3 aktivite tayini gerçekleştirilmiştir. Apoptoz, canlı yaşamında hayati önem arz eden; istenmeyen hücrelerin ya da hastalıklı hücrelerin ortadan kaldırılması ile sonuçlanan fizyolojik bir süreçtir. Kaspaz-3 apoptoz sürecinde çok önemli bir yerde durmaktadır. Çalışmalar göstermiştir ki kaspaz-3 knockout fareler yaşamın ilk haftalarında ölmektedirler. Bu farelerin fenotipinde kafatasında defektler görülmekte ve baş bölgelerinde ektopik kitleler bulunmaktadır. Bu patolojilerin beyindeki gelişim sırasında programlanmış hücre ölümünün başarısızlığı sonucu meydana geldiği düşünülmektedir. Bu defektler beyinde görülürken diğer organlarda görülmemektedir. Kaspaz-3'ün doku seçiciliğinin olduğu bu sebeple de nöronal ölüm yolağının önemli bir komponenti olduğu düşünülmektedir (Porter vd 1999). Çalışmamızda, WST-1 ile gösterdiğimiz hücreyi ölüme götüren sürecin kaspaz-3 aktivitesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Sonuç olarak, SSC'nin toksik etkilerinden dolayı meydana gelen sitotoksitenin kaspaz-3 üzerinden olmadığı gösterilmiştir. Literatürde SSC'nin kaspaz-3 aktivitesi üzerine etkilerini konu alan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Glutamatın kaspaz-3 aktivitesi üzerine etkisinin gösterildiği bir çalışmada, glutamatın kaspaz-3 aktivitesini artırdığı ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Kim vd 2019). Ancak bir başka çalışmada da hem primer kortikal nöron hücreleri ve bizim de kullandığımız HT-22 hücre dizini üzerinde glutamat toksisitesinin etkileri, kaspaz-3 aktivitesi, kalpain aktivitesi ve apoptoz indikatör faktör (AIF) gibi apoptoz sürecine ait parametreler ile çalışılmıştır

(Zhang ve Bhavnani, 2006). Bu çalışmada, primer kortikal nöron hücrelerinde programlı hücre ölümünün AİF, Kalpain aktivitesi ve kaspaz 3 aktivitesini göstermiş ancak HT-22 hücre dizininde kalpain aktivitesi ve AİF gösterilirken, apoptoz mekanizmasında kaspaz-3 aktivitesi gösterilememiştir. Buradan hareketle glutamata bağlı hücre ölümü mekanizmasında hücreler arasında farklılıklar gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Zhang ve arkadaşlarının (2006) çalışmasında HT-22 hücre dizininde kaspaz-3 aktivitesinin görülmemesi, SSC'nin glutamat analogu olduğu düşünüldüğünde, bizim bulgularımızı desteklemektedir. Apoptoz mekanizmasının anlaşılabilmesi için bu ve daha başka parametrelerin ilerleyen zamanda çalışılması apoptotik sürecin aydınlatılmasında yararlı olacaktır.

Reaktif oksijen molekülleri (ROS), insan vücudunda, mitokondrial elektron transport zinciri başta olmak üzere, hücre metabolizması, sıcaklık artışına bağlı stres ve ultraviyole ışığına maruz kalınması sonucu ortaya çıkmaktadırlar. ROS, çoğunlukla oksidasyon için substrat görevi gören tiyol bileşikler ve antioksidan savunmaları ile tamponlanır. Üretilen ROS' un konsantrasyonları ile koruyucu antioksidanların konsantrasyonu arasındaki denge ROS lehine kayduğunda, hücrelerde oksidatif hasar oluşur. Bu nedenle, artan oksidasyon seviyeleri, glutatyonun üretimi ve redoks verimliliği gibi majör bir antioksidan mekanizmasının işlevsizliği ile açıklanabilir (Halliwell, 1991).

Glutatyon, tüm organ hücrelerinde en çok bulunan tiyol bileşiğidir ve beyindeki oksidatif strese karşı önemli bir koruyucu rol oynar. Glutatyon redüktaz (GR), okside olmuş glutatyonun azaltılmasında, antioksidan formuna geri dönüşümünden sorumlu olan enzimdir. Oksidatif strese yanıt olarak düzenlenmektedir. İnsan keratinosit ve fibroblast hücrelerinin arseniğe maruz bırakıldığı bir çalışmada, artan oksidan stresle birlikte GR aktivitesinde de artış gözlenmiştir (Schuliga vd 2002). Glutatyon, GR ve oksidatif stresin, Tip 2 diyabet, Huntington hastalığı, Leber Hereditör Optik Nöropatisi, şizofreni, bipolar bozukluk ve otizm gibi birçok psikiyatrik ve psikiyatrik olmayan hastalığın patogeneğinde yer aldığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Gibson vd 2012).

Du ve arkadaşları (2009), çalışmalarında tiroid kanser hücrelerinde, proteazom inhibitörü ile indüklenmiş apoptoz mekanizmasında oksidatif stres ve hücre içi glutatyonun aldığı rolü araştırmışlardır. Çalışmalarında, proteazom inhibitörü olarak bortezomid kullanmışlar ve hücrelerde proteazom aktivitesi, hücre içi glutatyon ölçümü ve ROS (reaktif oksijen molekülleri) seviyeleri, kaspaz-3 aktivite ölçümü ve GSH sentez enzimleri spektrofotometrik ölçümler kullanılarak çalışılmıştır. Hücre dizini olarak FRO, KTC2, ARO, 8305C hücre dizinleri kullanılmıştır. Sonuçlarında, proteazom aktivitesinin inhibe olduğu, ARO ve 8305C hücre dizinlerinde hücre içi glutatyon seviyelerinin

yükseldiği gösterilmiştir. FRO ve KTC2 hücrelerinde ROS aktivite artışı gözlenmiştir. ARO ve 8305C hücre dizinlerinde glutasyon artışı ile birlikte apoptotik hücre yüzdeleri anlamlı derecede düşmüştür. FRO ve KTC2 hücrelerinde ise ROS aktivitesi yüksek iken apoptotik hücre yüzdesi ve hücre içi glutasyon düzeyinde anlamlı artış tespit etmişlerdir. Bizim bulgularımızda da artmış sitotoksititeye karşı HT-22 hücrelerinde artmış hücre içi glutasyon yanıtı verilmiştir. Bu artışın sebebinin SSC'nin toksitesi sonucu meydana geldiğini düşündüğümüz oksidan stresi azaltmak için kompanzatuvar bir mekanizma olabilir. SSC sitotoksitite çalışmamızda, Du ve arkadaşlarının (2009) çalışması sonuçlarından farklı şekilde hücre canlılığında azalma bulunmuştur. Hücre canlılığındaki azalmanın, hücre içi glutatyondaki artışın sitotoksik etkiyi kompanze etmede yetersiz kalması sonucu olduğu şeklinde değerlendirilebilir.

Bir başka çalışmada, major depresyon tanılı hastalardan alınan dermal fibroblast hücreleri ile oluşturulmuş kültürde oksidatif stres ve glutasyon cevabı çalışılmıştır (Gibson vd 2012). Çalışmada, hastalar yaş ve cinsiyete göre gruplandırılıp her birinden deri biyopsisi alınarak hücreler izole edilmiştir. Kültüre hücrelerde glutasyon redüktaz (GR) ekspresyonu, total glutasyon konsantrasyonu ve oksidatif stresi ölçmek için rölatif protein karbonilasyonu (gluktoz ve galaktoz durumları) çalışılmıştır. Protein karbonilasyonunda ve GR ekspresyonunda artış gözlemlenmişler ancak total glutasyon seviyelerinde anlamlı değişiklik tespit etmemişlerdir. Bizim çalışmamızda hücre içi glutasyon miktarlarında artış gözlemlenmiştir. Bu farklılığın sebebi hücreden kaynaklanıyor olabilir. Gibson (2012) ve arkadaşları primer fibroblast hücreleri kullanmışlar bizim çalışmamızda ise HT-22 fare hipokampus hücre dizini kullanılmıştır. Ayrıca bizim çalışmamızda SSC, Memantin ve LY 341495 olmak üzere ilaç kullanılmıştır ancak Gibson ve arkadaşlarının (2012) çalışmasında majör depresyon tanılı hastalara herhangi bir tedavi verilip verilmediğinden bahsedilmemiştir. Ayrıca Santral sinir sistemini etkileyen bir rahatsızlıkta ciltten alınmış primer fibroblast hücre kültürü kullanmışlardır. Deneke ve arkadaşlarının (1989) derlemesinde kültüre hücrelerdeki yükselmiş glutasyon seviyelerinin, hiperoksiye veya dimetilmaleat gibi elektrofilik ajanlara karşı yanıt olduğu düşünülmektedir. Kondrosit hücre hattı ile yapılmış başka bir çalışmada, hücre içi glutasyon seviyelerini yükselten ve daha düşük bir tiyol redoks durumu ile sonuçlanan koşullar, kondrositleri aynı oksidatif stres koşullarından korur denmektedir (Carlo ve Loeser, 2003). Yine başka bir çalışmada hücre içi glutasyon seviyelerinin artmasında, glutasyon sentezinin artmasında ilaç rezistansının da etkili olduğu gösterilmiştir. A2780 ve A1847 over kanseri hücre hatlarında, MTT sitotoksitite deneyi, total glutasyon ölçümü ve glutasyon s-transferaz analizi yapmışlar ve total glutasyon seviyelerindeki artışı sisplatine karşı dirençle orantılı bulmuşlardır (Godwin vd 1992). İlaç direncindeki total glutasyon seviyelerindeki artışın

γ -glutamiltranspeptidaz mRNA seviyelerindeki artış ve γ -glutamilsistein sentaz ekspresyonlarıdaki artışa bağlı olabileceğini ifade etmektedirler. Bizim deneyimizdeki glutatyon yüksekliğinin bir sebebi de ilaçlara karşı Godwin ve arkadaşlarının (1992) çalışmasındaki sonuçlara benzer bir direnç etkisinden dolayı olabilir. Bu bulguları, Kidd (1997) derlemesinde ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda karaciğerde hücre içi glutatyon seviyelerinin çok yüksek olduğu bilgisini vererek desteklemektedir. Bahsettiğimiz çalışmalarda bulgular, bizim çalışmamızda elde ettiğimiz eksitotoksik moleküllerin oluşturduğu hücre içi total glutatyon artışı sonucunu desteklemektedir. Çalışmamızda her ne kadar oksidatif stres ölçülmemiş olsa da ortaya koyduğumuz hücre içi glutatyon artışını, SSC'nin toksik etkilerine karşı hücrelerin antioksidan bir mekanizma üzerinden verdiği yanıt olarak değerlendirmekteyiz.



6. SONUÇLAR

Tez çalışmamız sonucunda SSC molekülünün eksitotoksik etkileri olduğu gösterilmiştir. Bu eksitotoksik etkinin glutamat reseptör blokörleri ile geri çevrilemediği sonuçlarımızda ortaya çıkarılmıştır. SSC toksik etkisinin, deney süresince DNA hasarı oluşturmadığı yani genotoksik bir etki göstermediği sonucu elde edilmiştir. Kaspaz-3 aktivite ölçümü ile hücreyi ölüme götüren sürecin mekanizması aydınlatılmaya çalışılmıştır. Kaspaz-3 aktivitesinde anlamlı bir değişiklik görülmemiş olup, SSC'nin farklı bir mekanizma üzerinden hücre ölümüne yol açtığı ve bu konuda tamamlayıcı çalışmalara ihtiyaç duyulduğu değerlendirilmiştir. Çalışmamızda, hücre içi total glutatyon seviyelerinde artış saptanmıştır. Hücrelerdeki patolojik değişikliklere yanıt olarak hücre içi total glutatyon seviyelerinde yükselme görülebilmektedir. Bu bulgular sonucunda, SSC'nin oksidatif strese yol açabileceği ve hücre içi glutatyon düzeyinde kompanzatuvar bir yanıt olarak artışa sebep olabileceği düşünülmüştür. Bu konunun aydınlatılması için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. SSC dışında çalışmamızda Memantin ve LY341495'in sitotoksik etkileri olduğu gözlemlenmiştir. Özellikle memantin Alzheimer Hastalığı tedavisinde klinikte sık kullanılan bir molekül olmasından dolayı farklı sitotoksite testleri ile çalışmaların yenilenmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

7. KAYNAKLAR

Abbas, A. K., Xia, W., Tranberg, M., Wigström, H., Weber, S. G., & Sandberg, M.. S-sulfo-cysteine is an endogenous amino acid in neonatal rat brain but an unlikely mediator of cysteine neurotoxicity. *Neurochemical Research*. 2008 <https://doi.org/10.1007/s11064-007-9441-7>

Ataseven, N., Yüzbaşıoğlu, D., Keskin, A. Ç., & Ünal, F.. Genotoxicity of monosodium glutamate. *Food and Chemical Toxicology*, 2016, 91, 8–18.

Barnham, K. J., Masters, C. L., & Bush, A. I. Neurodegenerative diseases and oxidative stress, *Nature Reviews Drug Discover* 2004, 3(March), 205-214

Belaidi A.A., Schwarz G. Molybdenum Cofactor Deficiency: Metabolic Link B etween Taurine and S-Sulfocysteine. In: El Idrissi A., L'Amoreaux W. (eds) *Taurine 8. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 776. Springer, New York 2013, s.13-19

Bouvier, M., Miller, B. A., Szatkowski, M., & Attwell, D.. Electrogenic uptake of sulphur-containing analogues of glutamate and aspartate by Müller cells from the salamander retina. *The Journal of Physiology*. 1991, 444 (1), s.441-457

Bredesen, D. E., Rao, R. V, & Mehlen, P.. Cell death in the nervous system. *Nature*, 2006, 443(7113), 796–802.

Brosnan, J. T., & Brosnan, M. E.. The Sulfur-Containing Amino Acids: An Overview. *The Journal of Nutrition*, 2006, 136(6), 1636S-1640S.

Burns, A., & Iliffe, S. Alzheimer's disease. *BMJ*, 2009.338(feb05 1), b158–b158.

Caccamo, D., Currò, M., Condello, S., Ferlazzo, N., & Ientile, R. Critical role of transglutaminase and other stress proteins during neurodegenerative processes. *Amino Acids*, 2010, 38(2), 653–658.

Carlo, M. Del, & Loeser, R. F.. Increased oxidative stress with aging reduces chondrocyte survival: Correlation with intracellular glutathione levels. *Arthritis & Rheumatism*, 2003, 48(12), 3419–3430.

Caroline Kisker, Hermann Schindelin, Andrew Pacheco, William A. Wehbi, & Robert M. Garrett, K.V. Rajagopalan, ohn H. Enemark, D. C. R.. Molecular Basis of Sulfite Oxidase Deficiency from the Structure of Sulfite Oxidase. *Cell*, 1997, 91, 973–983.

Cohen, H. J., & Fridovich, I. Hepatic sulfite oxidase. The nature and function of the heme prosthetic groups. *The Journal of Biological Chemistry*, 1971.246(2), 367–373.

Cooper, A. J. L. Biochemistry of Sulfur-Containing Amino Acids. *Annual Review of Biochemistry*, 1983 52(1), 187–222.

Coppedè, F., & Stocco, A. Mitoeigenetics and Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Endocrinology*, 2019, 10, 86.

Danbolt, N. C.. Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology*, 2001, 65(1), 1–105.

Dayalu, P., & Albin, R. L.. Huntington Disease. *Neurologic Clinics*, 2015, 33(1), 101–114.

De Vos, K. J., Grierson, A. J., Ackerley, S., & Miller, C. C. J. Role of axonal transport in neurodegenerative diseases. *Annual Review of Neuroscience*, 2008, 31, 151–173.

Deneke, S. M., & Fanburg, B. L.. Regulation of cellular glutathione. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 1989, 257(4), L163–L173.

Dikmen, M. Homosistein Metabolizması ve Hastalıklarla İlişkisi. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 2004, 24(6), 645–652.

DiMauro, S., & Schon, E. A.. Mitochondrial disorders in the nervous system. *Annual Review of Neuroscience*, 2008, 31, 91–123.

Du, Z.-X., Zhang, H.-Y., Meng, X., Guan, Y., & Wang, H.-Q. Role of oxidative stress and intracellular glutathione in the sensitivity to apoptosis induced by proteasome inhibitor in thyroid cancer cells. *BMC Cancer*, 2009 16; 9: 56

Finkelstein, J. D.. Pathways and Regulation of Homocysteine Metabolism in Mammals. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 2000, Volume 26 (Num 03), 219–226.

Freneau, R. T., Burman, J., Qureshi, T., Tran, C. H., Proctor, J., Johnson, J., ... Edwards, R. H. The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, 99(22), 14488–14493.

Garrett, R. M., Johnson, J. L., Graf, T. N., Feigenbaum, A., & Rajagopalan, K. V.. Human sulfite oxidase R160Q: Identification of the mutation in a sulfite oxidase-deficient patient and expression and characterization of the mutant enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, 95(11): 6394–6398

Gibson, S. A., Korade, Ž., & Shelton, R. C. Oxidative stress and glutathione response in tissue cultures from persons with major depression. *Journal of Psychiatric Research*, 2012 46(10), 1326–1332.

Godwin, A. K., Meister, A., O'Dwyer, P. J., Huang, C. S., Hamilton, T. C., & Anderson, M. E.. High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is

associated with marked increase of glutathione synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(7), 3070–3074.

Gras, C., Herzog, E., Bellenchi, G. C., Bernard, V., Ravassard, P., Pohl, M., ... El Mestikawy, S.. A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 2002, 22(13), 5442–5451.

Griffith, O W. Mammalian sulfur amino acid metabolism: an overview. *Methods in Enzymology*, 1987, 143, 366–376.

Gündoğdu G. Homosistein Toksikitesine Sülfid Molekülünün Olası Katkısı ve Oksidatif Stresin Rolünün Nöroblastoma Hücre Dizisinde İncelenmesi Uzmanlık Tezi. *Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi*, Denizli, 2012, s.32-43

Halliwell, B. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. *The American Journal of Medicine*, 1991, 91(3), S14–S22.

Hensel, G., & Troper, H. G. Cysteine and S-Sulfocysteine Biosynthesis in Phototrophic Bacteria. *Arch. Microbiol*, 1976, Vol. 109.

Holmseth, S., Scott, H. A., Real, K., Lehre, K. P., Leergaard, T. B., Bjaalie, J. G., & Danbolt, N. C.. The concentrations and distributions of three C-terminal variants of the GLT1 (EAAT2; slc1a2) glutamate transporter protein in rat brain tissue suggest differential regulation. *Neuroscience*, 2009, 162(4), 1055–1071.

Janáky, R., Varga, V., Hermann, A., Saransaari, P., & Oja, S. S. Mechanisms of L-Cysteine Neurotoxicity *. *Neurochemical Research*, 2000, Vol. 25

Kidd, P. M. Glutathione: Systemic Protectant Against Oxidative and Free Radical Damage Dedicated to the memory of Professor Daniel Mazia, my PhD mentor and a pioneer in cell biology. *Alternative Medicine Review* 1997, Vol. 2.

Kim, R. J., Hah, Y.-S., Gwark, J.-Y., & Park, H. Bin. (2019). N-acetylcysteine Reduces Glutamate-Induced Cytotoxicity to Fibroblasts of Rat Supraspinatus Tendons. *Connective Tissue Research*, 2019, 03008207.2019.1580702.

Kramer, S. P., Johnson, J. L., Ribeiro, A. A., Millington, D. S., & Rajagopalan, K. V.. The structure of the molybdenum cofactor. Characterization of di-(carboxamidomethyl)molybdopterin from sulfite oxidase and xanthine oxidase. *Journal of Biological Chemistry*. 1987, 262(34): 16357-63

Küçükataş, V., Savcıoğlu, F., Hacıoğlu, G., Yargıçoğlu, P., & Açar, A.. Effect of sulfite on cognitive function in normal and sulfite oxidase deficient rats. *Neurotoxicology and Teratology*, 2005, s.47-54

Kumar, A., Dejanovic, B., Hetsch, F., Semtner, M., Fusca, D., Arjune, S., ... Belaidi, A. A.. S-sulfocysteine/NMDA receptor-dependent signaling underlies neurodegeneration in molybdenum cofactor deficiency. *Journal of Clinical Investigation*. 2017,127(12):4365–4378

Kunert, J. Keratin decomposition by dermatophytes II. Presence of S-sulfocysteine

and cysteic acid in soluble decomposition products. *Zeitschrift Für Allgemeine Mikrobiologie*, 2007, 16(2), 97–105.

Lee, J.-S., Kim, W.-Y., Jeon, Y.-J., Lee, S.-K., & Son, C.-G. Aquilariae Lignum extract attenuates glutamate-induced neuroexcitotoxicity in HT22 hippocampal cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 106, 1031–1038.

Lehre, K. P., Levy, L. M., Ottersen, O. P., Storm-Mathisen, J., & Danbolt, N. C. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 1995, 15(3 Pt 1), 1835–1853.

Lester, M. R.. Sulfite sensitivity: significance in human health. *Journal of the American College of Nutrition*, 1995 14(3), 229–232.

Levine, R. L., Mosoni, L., Berlett, B. S., & Stadtman, E. R. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(26), 15036–15040.

Li, X., Wallin, C., Weber, S. G., & Sandberg, M. Net efflux of cysteine, glutathione and related metabolites from rat hippocampal slices during oxygen/glucose deprivation: dependence on gamma-glutamyl transpeptidase. *Brain Research*, 1999, 815(1), 81–88.

Lin, M. T., & Beal, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 2006, 443(7113), 787–795.

Liu, T.-Y., & Inglis, A. S.. [5] Determination of cystine and cysteine as S-sulfocysteine. *Methods in Enzymology*, 1972, s. 55–60.

Liu, Z., Zhou, T., Ziegler, A. C., Dimitrion, P., & Zuo, L. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1–11.

Maccoss, M. J., Fukagawa, N. K., Matthews, D. E., & Matthews, D. E. Measurement of intracellular sulfur amino acid metabolism in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001, Vol. 280.

Madabhushi, R., Pan, L., & Tsai, L.-H. DNA damage and its links to neurodegeneration. *Neuron*, 2014, 83(2), 266–282.

Maragakis, N. J., & Rothstein, J. D.. Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nature Clinical Practice Neurology*, 2006, 2(12), 679–689.

Marco, C. De, & Coletta, M. Production of S-sulfo-cysteine and S-sulfo-cysteamine from cystine and cystamine, coupled to enzymic transamination and deamination of cysteinesulfinic acid. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1961, 47(2), 262–266.

Marsh, J. L., Lukacsovich, T., & Thompson, L. M. Animal models of polyglutamine diseases and therapeutic approaches. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009 284(12), 7431–7435.

Miyaji, T., Echigo, N., Hiasa, M., Senoh, S., Omote, H., & Moriyama, Y.. Identification of a vesicular aspartate transporter. ***Proceedings of the National Academy of Sciences***, 2008, *105*(33), 11720–11724.

Mudd, S. H., Irreverre, F., & Laster, L. Sulfite oxidase deficiency in man: demonstration of the enzymatic defect. ***Science*** 1967, (New York, N.Y.), *156*(3782), 1599–1602.

Nakatani, T., Ohtsu, I., Nonaka, G., Wiriyanawudhiwong, N., Morigasaki, S., & Takagi, H. Enhancement of thioredoxin/glutaredoxin-mediated L-cysteine synthesis from S-sulfocysteine increases L-cysteine production in Escherichia coli. ***Microbial Cell Factories***, 2012, *11*(1), S.62.

Newman, E., & Reichenbach, A. The Müller cell: a functional element of the retina. ***Trends in Neurosciences***, 1996, *19*(8), 307–312.

Nohmi, T. Thresholds of Genotoxic and Non-Genotoxic Carcinogens. In ***Toxicol. Res*** 2018, (Vol. 34, pp. 281–290).

O'donovan, S. M., Sullivan, C. R., & Mccullumsmith, R. E. The role of glutamate transporters in the pathophysiology of neuropsychiatric disorders, ***npj Schizophrenia***, 2017, *3*, 32.

Olney, J W, Zorumski, C., Price, M. T., & Labruyere, J. L-cysteine, a bicarbonate-sensitive endogenous excitotoxin. ***Science***, (New York, N.Y.), 1990, *248*(4955), 596–599.

Olney, John W., Misra, C. H., & de Gubareff, T. Cysteine-S-Sulfate: Brain Damaging Metabolite in Sulfite Oxidase Deficiency1. ***Journal of Neuropathology & Experimental Neurology***, 1975, *34*(2), 167–177.

Orr, H. T. Unstable nucleotide repeat minireview series: a molecular biography of unstable repeat disorders. ***The Journal of Biological Chemistry***, 2009, *284*(12), 7405.

Özdemir, O., & Özdemir, G. Glutamat Sistemi ve Şizofreni Glutamatergic System and Schizophrenia. ***Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar-Current Approaches in Psychiatry***, 2016, *8*(4), 394–405.

Pace, J. R., Martin, B. M., Paul, S. M., & Rogawski, M. A. High concentrations of neutral amino acids activate NMDA receptor currents in rat hippocampal neurons. ***Neuroscience Letters***, 1992, *141*(1), 97–100.

Porter, A. G., Ja, R. U., & Nicke, È. (n.d.). *Emerging roles of caspase-3 in apoptosis*. <http://www.stockton-press.co.uk/cdd>

Pow, D. V, & Robinson, S. R.. Glutamate in some retinal neurons is derived solely from glia. ***Neuroscience***, 1994, *60*(2), 355–366.

Puka-Sundvall, M., Eriksson, P., Nilsson, M., Sandberg, M., & Lehmann, A. Neurotoxicity of cysteine: interaction with glutamate. ***Brain Research***. 1995, Vol 705(1-2), s. 65-70

Rubinsztein, D. C.. The roles of intracellular protein-degradation pathways in

neurodegeneration. *Nature*, 2006, 443(7113), 780–786.

Ruel, J., Emery, S., Nouvian, R., Bersot, T., Amilhon, B., Van Rybroek, J. M., ... Puel, J.-L.. Impairment of SLC17A8 Encoding Vesicular Glutamate Transporter-3, VGLUT3, Underlies Nonsyndromic Deafness DFNA25 and Inner Hair Cell Dysfunction in Null Mice. *The American Journal of Human Genetics*, 2008, 83(2), 278–292.

Rupar, C., Gillett, J., Gordon, B., Ramsay, D., Johnson, J., Garrett, R., ... Sellers, A.. Isolated Sulfite Oxidase Deficiency. *Neuropediatrics*, 1996, 27(06), 299–304.

Schuliga, M., Chouchane, S., & Snow, E. T. Upregulation of glutathione-related genes and enzyme activities in cultured human cells by sublethal concentrations of inorganic arsenic. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 2002 70(2), 183–192.

Seal, R. P., Akil, O., Yi, E., Weber, C. M., Grant, L., Yoo, J., ... Edwards, R. H.. Sensorineural Deafness and Seizures in Mice Lacking Vesicular Glutamate Transporter 3. *Neuron*, 2008, 57(2), 263–275.

Sekiguchi, K., Sato, M., Yokoyama, M. K., Sato, T., Tsutiya, A., Omoteyama, K., ... Kurokawa, M. S. Effects of memantine on the growth and protein profiles of neuroblastoma cells. *Research Article Integrative Molecular Medicine*, 2018, 5(1), 1–8.

Shigeri, Y., Seal, R. P., & Shimamoto, K.. Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Research Reviews*, 2004, 45(3), 250–265.

Sveinbjornsdottir, S. The clinical symptoms of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 2016, 139, 318–324.

Szatkowski M., Barbour B., A. D.. Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake. *Nature*, 1990 348(6300), 443–446.

Takamori, S., Malherbe, P., Broger, C., & Jahn, R. Molecular cloning and functional characterization of human vesicular glutamate transporter 3. *EMBO Reports*, 2002, 3(8), 798–803.

Tural, Ü., & Önder, E. Glutamaterjik Sistem, N-Metil-D-Aspartik Asit Reseptörleri ve Depresyon. *Klinik Psikiyatri*, 2002, 30–34.

Turner, P. R., O'Connor, K., Tate, W. P., & Abraham, W. C. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Progress in Neurobiology*, 2003, 70(1), 1–32.

Vardar, D. O., Aydin, S., Hocaoglu, İ., Yagci Acar, H., & Basaran, N. An in vitro study on the cytotoxicity and genotoxicity of silver sulphide quantum dots coated with meso-2,3-dimercaptosuccinic acid. *The Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*. (2018). <https://doi.org/10.4274/tjps.85619>

Varkey, J., Isas, J. M., Mizuno, N., Jensen, M. B., Bhatia, V. K., Jao, C. C., Langen, R.. Membrane curvature induction and tubulation are common features of synucleins and apolipoproteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010,

285(42), 32486–32493.

Vila, M., & Przedborski, S. Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience*, 2003, 4(5), 365–375.

Wang, H., Dharmalingam, P., Vasquez, V., Mitra, J., Boldogh, I., Rao, K. S., ... Hegde, M. L.. Chronic oxidative damage together with genome repair deficiency in the neurons is a double whammy for neurodegeneration: Is damage response signaling a potential therapeutic target? *Mechanisms of Ageing and Development*, 2017, 161(Pt A), 163–176.

Wu, L., Yang, W., Jia, X., Yang, G., Duridanova, D., Cao, K., & Wang, R.. Pancreatic islet overproduction of H₂S and suppressed insulin release in Zucker diabetic rats. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 2009, 89(1), 59–67.

Yang, J.-L., Tadokoro, T., Keijzers, G., Mattson, M. P., & Bohr, V. A. Neurons Efficiently Repair Glutamate-induced Oxidative DNA Damage by a Process Involving CREB-mediated Up-regulation of Apurinic Endonuclease 1 *J Biol Chem*, 2010, 285(36):28191-9

Zerangue, N., & Kavanaugh, M. P.. Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature*, 1996, 383(6601), 634–637.

Zhang, Y., & Bhavnani, B. R. Glutamate-induced apoptosis in neuronal cells is mediated via caspase-dependent and independent mechanisms involving calpain and caspase-3 proteases as well as apoptosis inducing factor (AIF) and this process is inhibited by equine estrogens. *BMC Neuroscience*, 2006, 7(1), 49.

Zoghbi, H. Y., & Orr, H. T. Pathogenic mechanisms of a polyglutamine-mediated neurodegenerative disease, spinocerebellar ataxia type 1. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(12), 7425–7429.

Zou, J. Y., & Crews, F. T. TNF α potentiates glutamate neurotoxicity by inhibiting glutamate uptake in organotypic brain slice cultures: neuroprotection by NF κ B inhibition. *Brain Research*, 2005, 1034(1–2), 11–24.

8. ÖZGEÇMİŞ

Volkan Tekin 1985 Uşak doğumludur. İlk ve orta öğretimini Uşak'ta tamamlamıştır. Liseyi İzmir Maltepe Askeri Lisesi'nde tamamlamış, Gülhane Askeri Tıp Fakültesi'ne devam etmiştir. 5. Sınıfta Türk Silahlı Kuvvetleri'nden ayrılarak Mersin Üniversite Tıp Fakültesi'ne yatay geçiş yapıp buradan mezun olmuştur. Türkiye'nin çeşitli şehirlerinde acil servis hekimliği, işyeri hekimliği, aile hekimliği görevlerini icra etmiş olup halen aile hekimi olarak çalışmaktadır. Evli ve bir çocuk babasıdır.

9) EKLER

Ek-1. Dodurga Y, Gundogdu G, **Tekin V**, Koc T, Satiroglu-Tufan L, Bagci G, Kucukatay V. Valproic acid inhibits the proliferation of SHSY5Y neuroblastoma cancer cells by downregulating URG4/URGCP and CCND1 gene expression. *Mol. Biol Rep* 2014; 41:4595-4599

Ek-2. Kilic-Toprak E, Yapici A, Kilic-Erkek O, Koklu Y, **Tekin V**, Alemdaroglu U, Bor-Kucukatay M. Acute effects of Yo-Yo intermittent recovery test level 1 (Yo-YoIR1) on hemorheological parameters in female volleyball players. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2015 jul 16; 60(2): 191-9