



T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ

CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**GLUTAMAT NÖROTOKSİSİTESİ OLUŞTURULAN
SIÇANLARDA METFORMİNİN OLASI NÖROPROTEKTİF
ETKİSİNDE GLUKOJEN SENTAZ KİNAZ-3-BETANIN
ROLÜ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Aykut ORUÇ

Danışman : Prof. Dr. Gönül ŞİMŞEK

İstanbul - 2018



T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ

CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**GLUTAMAT NÖROTOKSİSİTESİ OLUŞTURULAN
SIÇANLARDA METFORMİNİN OLASI NÖROPROTEKTİF
ETKİSİNDE GLUKOJEN SENTAZ KİNAZ-3-BETANIN
ROLÜ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Aykut ORUÇ

Danışman : Prof. Dr. Gönül ŞİMŞEK

İstanbul - 2018

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimimde ve bilimsel çalışmalarım da her zaman yanımda olan ve bana bilim de ve hayatın her alanında rehberlik eden, uzmanlık eğitim hayatımın çok yönlü bir öğrenme, gelişme ve yenilenme sürecine dönüşmesine sonsuz katkıları olan; çok değerli anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Gülderen Şahin'e,

Derin bilgi ve tecrübelerini paylaşarak ilgi ve dikkatini en zor zamanlarda dahi hiç eksik etmeyen, beni rehberliği ile farklı kılan ve özel hissettiren, yanında her daim iyi hissedebildiğim çok değerli hocam Prof. Dr. Gönül Şimşek'e,

Aynı şekilde eğitimime katkı sunan kürsümüzün diğer tüm değerli hocalarına, öğretim üyelerine ve uzmanlarına,

Kıymetli görüş ve deneyimlerinden faydalandığım, ilgilerini ve desteklerini esirgemeyen çok değerli hocam Prof. Dr. Hafize Uzun'a ve Prof. Dr. Ufuk Çakatay'a,

Bilgi ve tecrübesiyle bu çalışmanın gerçekleştirilmesini mümkün kılmış olan değerli Yar. Doç. Dr. Murat Mengi'ye ve Dr. Nihal,

*Verdiği emek, gösterdiği sabır ve tüm yardımları için Dr. Karolin Yanar'a
Asistanlık hayatım süresince beraber olduğum için kendimi şanslı hissettiğim,
değerli asistan arkadaşlarıma,*

*Hayatıma anlam veren tüm dostlarıma ve aileme,
ve Çalışmamın her anında yanımda olup bana olan desteğini hiç bir zaman esirgemeyen sevgili eşim ve çalışma arkadaşım Yük. Lis. Öğr. Yağmur Oruç'a
En derin teşekkürleri borç bilirim.*



Rahmetli Babamın Anısına,



Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir. Proje No: 27509

ŞEKİLLER ve TABLOLAR

- Şekil 1. Glutamatın endojen sentezi
Şekil 2. Glutamat-glutamin döngüsü
Şekil 3. Glutamat-glutamin döngüsünde amonyağın kullanımı
Şekil 4. NMDA reseptöründe çinko blokajı
Şekil 5. Sinaptik Boşluktaki Çinko Taşıyıcıları
Şekil 6. Glutamatın metabotropik reseptörleri
Şekil 7. İnsülinin maturasyonu
Şekil 8. IGF-1 yolağı
Şekil 9. IRS-1 ve PI3K/AKT - GSK-3 β ilişkisi
Şekil 10. IKK ve NF- κ B ilişkisi
Şekil 11 . Çalışmamıza ait deney grupları
Şekil 12. Çalışmamızda uygulanan yöntemsel süreçler
Şekil 13. Makroskopik ince kesitler alınan bölgeler
Şekil 14. Kloramin T standartları
Şekil 15. Serum ve doku GSK-3 β enzim düzeyleri
Şekil 16. Serum serbest çinko iyonu seviyeleri
Şekil 17. Doku çinko iyonu seviyeleri
Şekil 18. Kortikal ve subkortikal beyin dokusunda nükleer S100 β boyanmaları
Şekil 19. Kortikal S100- β boyanma oranları
Şekil 20. Subkortikal S100- β boyanma oranları
Şekil 21. Kortikal nörodejenerasyon oranları
Şekil 22. Subkortikal nörodejenerasyon oranları
Şekil 23. Serum AOPP düzeyleri
Şekil 24. Doku AOPP düzeyleri
Şekil 25. Serum MDA düzeyleri
Şekil 26. Doku MDA düzeyleri
Şekil 27. Serum L-OOH düzeyleri
Şekil 28. Doku L-OOH düzeyleri
Şekil 29. Serum AGE düzeyleri
Şekil 30. Doku AGE düzeyleri
Şekil 31. Serum Cu-Zn-SOD aktivitesi düzeyleri
Şekil 32. Doku Cu-Zn-SOD aktivitesi düzeyleri
Şekil 33. Doku katalaz aktivitesi düzeyleri
Tablo 1. Çalışmamızda araştırılan parametreler

KISALTMALAR

AD	: Alzheimer hastalığı
AGE	: İleri glikasyon son ürünleri
ALS	: Amyotrofik lateral skleroz
AMPK	: Adenozin monofosfat kinaz
AOPP	: İleri oksidasyon protein ürünleri
APP	: Amiloid prekürsör protein
A β	: Beta amiloid
CAT	: Katalaz
CREB	: cAMP response element-binding protein
EAAT	: Eksitatorik amino asit taşıyıcı
EPSC	: Eksitatorik post sinaptik akım
ERK	: Ekstraselüler ilişkili kinaz
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
bFGF	: Basic fibroblast büyüme faktörü / β fibroblast büyüme faktörü
FGFR	: Fibroblast büyüme faktörü reseptörü
FOXO	: Forkhead ailesi transkripsiyon fakörleri
GLUT	: Glukoz transporter
GSK-3	: Glukojen sentaz kinaz-3
GSK-3 β	: Glukojen sentaz kinaz-3 beta
IGF-1	: İnsülin benzeri büyüme faktörü 1
IGF-1R	: İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 reseptörü
IRS	: İnsülin reseptör substratı
IRS-P	: Fosforile insülin reseptör substratı
İ.P.	: İntraperitoneal
L-OOH	: Lipid hidroperoksit
MAPK	: Mitojen aktive protein kinaz
MDA	: Malondialdehid
NMDAR	: N-metil-D-aspartat reseptörü
PI3K	: Fosfatidilinozitol-3 kinaz
PKC	: Protein kinaz C
RNS	: Reaktif azot metabolitleri
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SAPK	: Stresle aktive olan protein kinaz
SOD	: Süperoksit dismutaz
ZIP	: Çinko taşıyıcı protein benzeri protein
ZnT	: Çinko taşıyıcı

ÖZET

Giriş : Glutamat santral sinir sisteminde en yaygın bulunan eksitatorik nörotransmitterdir ve Alzheimer hastalığı , iskemik hasar, amiyotrofik lateral skleroz gibi hastlıkların patogeneğinde yer almaktadır.

Metforminin santral sinir sistemi üzerinde koruyucu etkilerinin olduğu ileri sürülmektedir. Bu etkilerinin temel mekanizmaları henüz açıklığa kavuşmamıştır.

Glukojen sentaz kinaz-3 beta (GSK-3 β)'nın inhibisyonuyla metforminin etkilerinin birbirine benzerlik göstermesi metforminin söz konusu etkilerini GSK-3 β modülasyonu ile yapabileceğini düşündürmüştür. Diğer taraftan çinko, GSK-3 β üzerinde inhibisyon yaratan önemli bir eser elementtir.

Amaç : Araştırmamızda, sıçanlarda glutamat ile oluşturulan nörotoksositeye metforminin nörotrofik etkisi ve olası nörotrofik etkide GSK-3 β 'nin ve çinkonun rolü araştırıldı.

Gereç ve Yöntem : 40 adet erişkin erkek sıçan 5 gruba ayrıldı; Kontrol , Glutamat, Metformin+Glutamat, Çinko Eksikliği+Glutamat, Çinko Eksikliği+Metformin+Glutamat. Metformin 34 gün süreyle verildi. 35. gün D-glutamik asit uygulandı.Takiben 3 gün sonra anestezide sıçanlardan alınan beyin dokusu örneklerinde nörodejenerasyon histopatolojik; nörorejenerasyon immünohistokimyasal olarak değerlendirildi. Bulgular kanda ve beyin dokusunda bakılan GSK-3 β ve oksidatif stres parametrelerinin düzeyleriyle ilişkili olarak irdelendi.

Bulgular : Çinkodan yetersiz diyetle beslenen sıçanlarda nörodejenerasyonun derecesi yüksekti. Nörodejenerasyonun gözleendiği gruplarda sıçanların kan ve beyin dokusunda GSK-3 β düzeylerinde artışlar saptandı. Metformin verilen gruplarda nörodejenerasyonun azaldığı; nörorejenerasyonun arttığı gözleendi. Bu gruplarda kan ve beyin dokusunda GSK-3 β ve oksidatif stres parametrelerinde azalmalar, anti-oksidan parametrelerde artışlar gözleendi. Metforminin yetersiz çinko diyeti ile beslenen sıçanlarda protektif ve rejeneratif etkilerinin, normal diyet ile beslenen sıçanlardan daha az olduğu belirlendi.

Sonuç : Metformin nöroprotektif ve nörorejeneratif etkilerini, GSK-3 β 'nin ekspresyonunu ve/veya aktivasyonunu çeşitli yollarla indirekt ve /veya direkt olarak

azaltarak gösterebilir. Metforminin nöroprotektif ve nörorejeneratif etkisinde çinko iyonu önemli rol oynayabilir.

Anahtar Kelimeler : glutamat, eksitotoksisite, nörodejenerasyon, metformin, nörorejenerasyon, GSK-3 β , S100- β , çinko



ABSTRACT

Glutamate is the most common excitatory neurotransmitter in the central nervous system(CNS) and involved in the pathogenesis of diseases such as Alzheimer's disease, ischemic injury, amyotrophic lateral sclerosis.

Metformin has been suggested to have protective effects on the CNS. Mechanisms of these effects have not yet been clarified.

The similarity of the effects of metformin with the inhibition of GSK-3 β suggests that metformin may modulate GSK-3 β . On the other hand, zinc is an important trace element that inhibits GSK-3 β .

In our study, the neurotrophic effect of metformin on glutamate-induced neurotoxicity in rats and the role of GSK-3 β and zinc in these neurotrophic effects were investigated.

Forty adult male rats were divided into 5 groups; Control, Glutamate, Metformin+Glutamate, Zinc Deficiency+Glutamate, Zinc Deficiency+Metformin+Glutamate. Metformin was given for 34 days. D-glutamic acid was administered on the 35th day. Neurodegeneration was examined histopathologically and neuroregeneration was evaluated immunohistochemically in brain tissue samples taken from anesthetic rats. The findings were examined in relation to levels of GSK-3 β and oxidative stress parameters observed in brain tissue and blood.

Neurodegeneration was higher in rats fed with inadequate zinc diet. GSK-3 β levels were increased in groups with neurodegeneration. Decreased neurodegeneration and increased neuroregeneration; decreased GSK-3 β and oxidative stress parameters, increased antioxidant parameters was observed in groups treated with metformin. Metformin had less protective and regenerative effects in rats fed with inadequate zinc diet.

Metformin may demonstrate neuroprotective and neuroregenerative effects by reducing expression of GSK-3 β . Zinc may play an important role in neuroprotective and neuroregenerative effects of metformin.

Keywords : glutamate, excitotoxicity, neurodegeneration, metformin, neuroregeneration, GSK-3 β , S100- β , zinc

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Glutamat santral sinir sisteminde en yaygın bulunan eksitatorik bir nörotransmitterdir (1). Santral sinir sisteminde birçok alanda yaygın olarak bulunsa da, en fazla bulunduğu alanlar serebral korteks ve hipokampüstür (2). Aynı zamanda serebellum granül hücreleri gibi bazı özel bölgelerde primer nörotransmitter olarak da yer alır. İyonotropik ve metabotropik 2 grup reseptöre sahip olup, iyonotropik reseptör ailesi N-Metil-D-Aspartat (NMDA) reseptörleri, Alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolepropionik asit (AMPA) reseptörleri ve kainat reseptörleri olmak üzere üç gruptan oluşur. NMDA reseptörleri kalsiyuma olan geçirgenliğinden dolayı sinaptik plastisite, öğrenme ve bellek oluşumunda diğer reseptörlere kıyasla daha büyük bir rol üstlenir (3).

Sinaptik plastisite, öğrenme ve bellek oluşumunda önemli rol oynayan glutamat aynı zamanda Alzheimer hastalığı (4), iskemik veya hemorajik inmeler (5), otizm (6), amiyotrofik lateral skleroz (4) gibi hastalıkların patogenezinde de yer almaktadır. Söz konusu hastalıkların patogenezinde temel mekanizma aşırı glutamat uyarımının yarattığı eksitotoksisite olup, bu mekanizmalar, hücre içine aşırı Ca^{+2} iyonu girişinin yol açtığı mitokondriyal hasar (7), hücre içi artmış nitrik oksit seviyeleri (8) ve hücre içi artmış Ca^{+2} iyonu seviyelerinin tetiklediği apoptotik mekanizmalar olarak bilinir (7). Glutamatın bilinen bu etkilerinden dolayı, eksitotoksisite ile seyreden hastalıkların tedavisinde glutamat reseptörlerinin bloklanması rutin olarak kullanılan bir uygulamadır. Alzheimer hastalığı tedavisinde sıkça kullanılan "memantin" uygulaması gibi. Günümüze bu konuyla ilgili araştırmalar hız kazanmıştır.

Metformin, prediyabet ve Tip 2 diyabetin ilk basamak tedavisinde kullanılan biguanid ilaç grubu arasında yer alan bir ajandır. Metforminin temel etkisi, karaciğer tarafından kana verilen glukozu (9) ve insülin direncini azaltması olarak bilinir (10). Etki mekanizması henüz net olarak bilinmemekle birlikte, en bilinen etkisi AMP kinaz (AMPK) aktivasyonudur (11). AMPK vücudun hücresel enerji homeostazını sağlayan en önemli düzenleyicilerden biridir (12). Aynı zamanda metforminin terapötik dozlarda

kullanımı sonucunda pankreas beta hücrelerindeki kayıp ve harabiyetin de azaldığı bilinmektedir (13).

İnsülinin hücre içi etki mekanizmalarından bir tanesi, insulin reseptör etkileşiminden sonra insulin reseptör substrat-1 (IRS-1) fosforilasyonuna yol açmasıdır. Fosforillenen IRS-1 (p-IRS), PI3K/Akt/mTOR yolunu aktive ederek hücre sinyali ve sağ kalımı gibi hücrel proselerde rol oynayan GSK-3 β inaktivasyonu ile hücre proliferasyonuna neden olmaktadır. Aynı zamanda aktive olan Akt, diğer adıyla protein-kinaz-B, hücre yüzeyinde insülin bağımlı glukoz taşıyıcısı olan Glut-4'ün sayıca artışına sebep olmakta ve hücre içi glukoz alınımını arttırmaktadır (18). Bu mekanizma, negatif feedback dahil olmak üzere birçok hücre içi proteinin kontrolü altındadır (19).

Diğer taraftan, GSK-3 β aktivasyonu birçok mekanizma ile hücre proliferasyonunu durdurmakta, insülin direnci yaratmakta ve p53 başta olmak üzere birçok pro-apoptotik gen aktivasyonu ile apoptozu başlatmaktadır (20). p-IRS-1 tarafından aktive olan Akt, GSK-3 β 'yi serin 9 rezidüsü üzerinden fosforile ederek inaktif hale getirmektedir (21). GSK-3 β aktivasyonu ve inhibisyonu arasındaki denge mekanizmaları kontrollü hücre büyümesi, gelişimi ve hücre sağ kalımı için oldukça önemli mekanizmalardır (20).

Metforminin hücre içi enerji metabolizmasındaki olumlu etkilerinden dolayı, santral sinir sistemi üzerinde de koruyucu etkilerinin olduğu ileri sürülmektedir. Bunlar arasında post-iskemik hasarın ortaya çıkışını azaltması (14), iskemi esnasında nöroprotektif etki sağlaması (15), iskemik hasardan sonra iyileşme sürecini hızlandırması (16), Alzheimer hastalığında B-amiloid plak oluşumunu geriletmesi (17) gibi etkilerden söz edilmektedir. Metforminin bu etkilerinin temel mekanizmaları henüz net olarak açıklığa kavuşmamıştır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, GSK-3 β aktivitesinin nöronal ölüm ve iskemik inmenin patogeneze katkıda bulunduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır (22). Artmış GSK-3 β aktivitesinin Alzheimer hastalarında Tau fosforilasyonunu arttırdığı (23), GSK-3 β aktivitesinin azaltılması ile β -amiloid plak oluşumunun azaldığı (24), GSK-3 β inhibisyonunun eksitotoksisteye karşı koruyucu olduğu (25), gösterilmiştir. GSK-3 β ' nin

nöronal apoptozisteki baskın rolü nedeniyle GSK-3 β 'nin modülasyonunun iskemik nörodejenerasyondan korunmak için önemli bir strateji olabileceği belirtilmiştir (22).

GSK-3 β 'nin inhibisyonunun, insulin direncini azaltması, nörodejeneratif hastalıklarda olumlu etkileri ile, metforminin etkilerinin birbirine benzerlik göstermesi metforminin söz konusu etkilerini GSK-3 β modülasyonu ile yapabileceğini düşündürmüştür. Nitekim, GSK-3 β aktivitesinin hücre yapısı ve içeriğine göre değişiklik gösterdiği bildirilmişse de (28), metforminin kalpte ve uterin kanser hücrelerinde GSK-3 β aktivitesini azaltarak olumlu etki gösterdiğini ileri süren çalışmalar bulunmaktadır (29). Bununla birlikte, santral sinir sisteminde metformin - GSK-3 β ilişkisini araştıran herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Diğer taraftan çinko, GSK-3 β üzerinde inhibisyon yaratan önemli bir eser elementtir. Yapılan çalışmalarda hücre içerisindeki çinko iyonu artışının GSK-3 β 'yi inhibe ettiği gösterilmiştir (30). Çinko, fizyolojik seviyelerde olduğunda vücutta birçok önemli fonksiyonu üstlenen, hayati bir iyondur. Fizyolojik seviyelerde bilinen etkileri arasında IRS-1'in aktivasyonunu sağlayarak insülin direncini azaltmak, (31), nöronal gelişim ve sağ kalımını sağlamak (32), beyinde NMDA reseptörleri üzerinde voltaj bağımlı ve voltaj bağımsız inhibisyon yaratarak glutamatın olası toksik etkilerinden korumak (33) yer almaktadır. Benzer şekilde Alzheimer hastalığında serum çinko seviyelerinin kontrol gruplarına göre azaldığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (34).

Bu tez çalışmasında, sıçanlarda glutamat ile oluşturulan nörotoksositeye metforminin nörotrofik etkisi ve olası nörotrofik etkiye GSK-3 β 'nin rolünün araştırılması planlandı. Nörodejenerasyon çalışmalarının genellikle korteks, hipokampus ve bazal gangliyonlarda yoğunlaştığı dikkati çekmiştir (35). Diğer taraftan fare beyinde ışık ve elektron mikroskopu çalışmaları ile GSK-3 β 'nin santral sinir sisteminde korteks, bazal gangliyon ve hipokampüste yoğunlaştığı gösterilmiştir (36). Bu nedenle çalışmamızda korteks ile hipokampus ve bazal gangliyonları içeren subkortikal yapıları birlikte araştırdık.

Araştırmamızda aynı zamanda metforminin olası koruyucu etkisinde çinkonun rolü de araştırıldı. Çinko eksikliği yaratmak amacıyla çinkodan yetersiz diyet kullanıldı.

Bu amaçla metformin uygulanan ve çinkodan yetersiz diyetle beslenen sıçanlar ile metformin uygulanan ve normal çinko diyetiyle beslenen sıçanlarda; metformin verilmeyen çinkodan yetersiz diyetle beslenen ve normal çinko diyetiyle beslenen sıçanlarda glutamat nörotoksisitesi oluşturuldu. Glutamat nörotoksisitesi intraperitoneal olarak D-glutamik asit uygulaması ile oluşturuldu. Gruplar arasında nörodejenerasyonun derecesi histopatolojik; nörorejenerasyonun derecesi immünohistokimyasal olarak değerlendirildi. Nörodejenerasyon ve nörorejenerasyonun dereceleri; kanda, kortikal ve subkortikal yapıları içeren homojenize beyin dokusunda tayin edilen GSK-3 β ve oksidatif stress parametrelerinin düzeyleriyle ilişkili olarak irdelendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. NÖROTRANSMİTTER OLARAK GLUTAMAT

Glutamat, glutamik asitin anyonu olarak omurgalıların büyük bir çoğunluğunda nöronlar arası sinyal iletiminde kullanılan ve omurgalı beyindeki eksitatör görevlerin çoğunu üstlenen bir nörotransmitterdir.

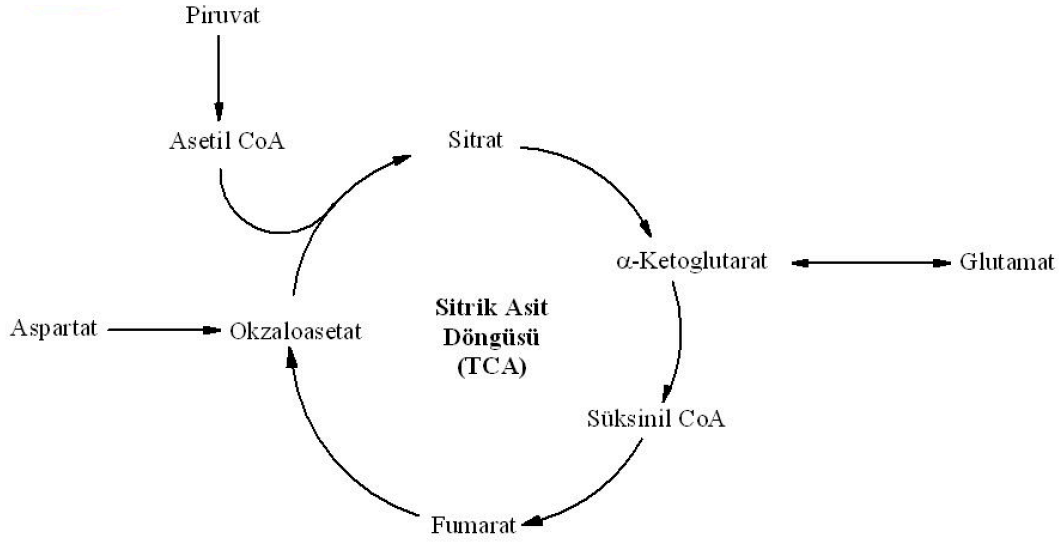
Glutamatın, sinaptik plastisiteki bilinen rolünden dolayı, beyinde öğrenme ve hafıza gibi kognitif fonksiyonlardaki önemi oldukça yüksektir (37). Uzun süreli potansiyasyon olarak da tanımlanabilen, plastisite beyinde özellikle hipokampus, neokorteks gibi glutamaterjik sinapsların sık olduğu alanlarda daha yoğun gözlenmektedir. Özetle glutamatın beyindeki temel fonksiyonları 3 temel maddede toplanabilir :

- Hafıza ve bellek oluşumu
- Vücut hareketlerinde sinyal taşıyıcı
- Düşünme

Glutamat her ne kadar 2 nokta arası bir transmitter olarak çalışsa da, sinaptik boşluktan sızarak komşu nöronları da uyarmak ve ekstrasinaptik bir haberleşme de sağlamaktadır (38).

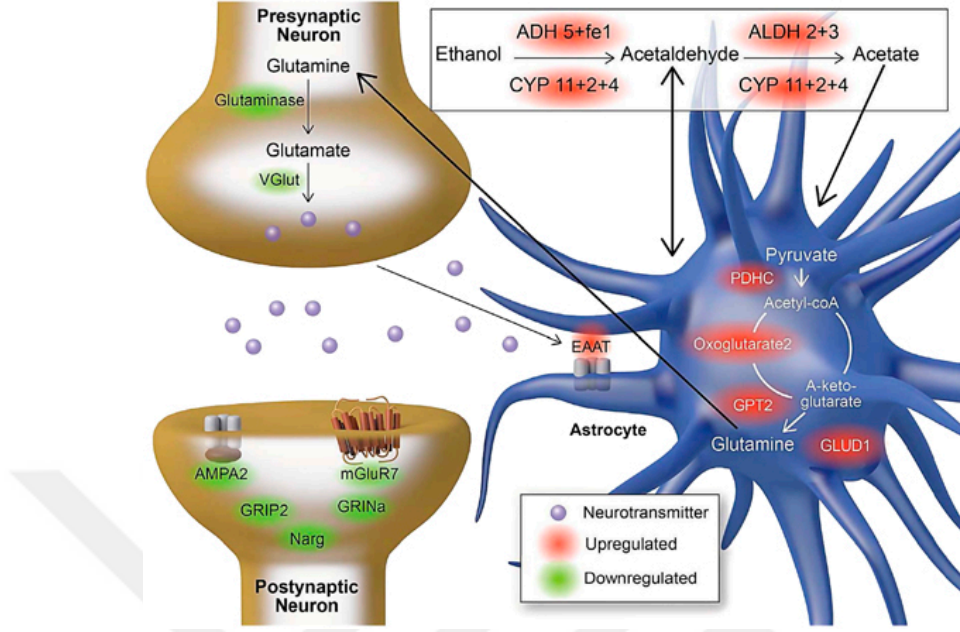
2.1.1. Metabolizması ve Sentezi

Glutamat, vücutta en fazla bulunan aminoasitlerden bir tanesidir ve birçok proteinin yapımında kullanılmaktadır (1). Sağlıklı bir insanda normal şartlarda glutamat gıdalardan yeterince alındığı için sentezine çoğu zaman ihtiyaç duyulmaz. Öte yandan Krebs (sitrik asit) Siklusunda açığa çıkan α -ketoglutarattan sentezlenebildiği için vücut için glutamat non-esansiyel bir amino asit olarak kabul edilir.



Şekil 1. Glutamatın Endojen Sentezi

Santral sinir sisteminde glutaminerjik nöronlar glukozdan glutamat üretmezler ve bu yüzden pre-sinaptik nöronlara glutamat, glutamat-glutamin siklusu sayesinde sağlanır. Bu işlemi presinaptik nöronda ya da komşu glial hücrelerde glutamin sentetaz enzimi gerçekleştirilir (39).



Şekil 2. Glutamat - Glutamin Döngüsü

(Most, D., et al. "The synaptoneurosome transcriptome: a model for profiling the emolecular effects of alcohol." *The Pharmacogenomics Journal*, vol. 15, no. 2, 2015, p. 177+)

Pre-sinaptik nörondan sinaptik boşluğa salınan glutamatın akıbeti 3 şekildedir :

1. Post-sinaptik nörona alınım
2. Pre-sinaptik nörona geri alınım
3. Glial (astrozit) hücreye alınım

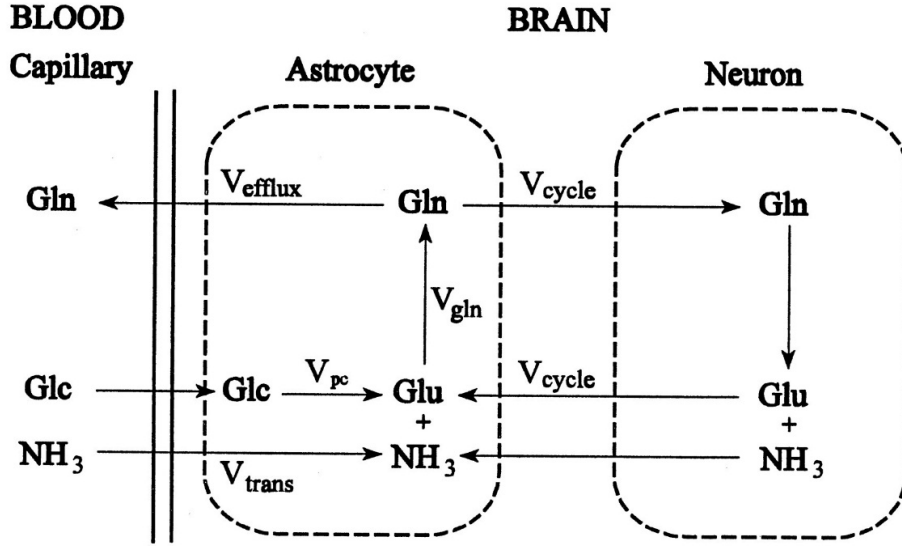
Post-sinaptik nörondan alınım sayesinde sinaptik ufak bir miktarda glutamat yıkımı gerçekleştirilir. Aynı zamanda pre-sinaptik nöronda da az miktarda yıkım mevcuttur. Ancak bunların haricinde en büyük mekanizma çevre astrositlere alımdır (39). Bu alım eksitatorik aminoasit taşıyıcısı kanallar (EAAT: excitatory aminoacid transporter) sayesinde gerçekleştirilir. Astrositlere alınan glutamatın ise komşu kapillerle dolaşıma geçmesi beklenebilir fakat bu, santral sinir sisteminin net olarak karbon ve azot kaybı ile sonuçlanacaktır. Bunun yerine glutamat, nöronlara bir etkisi olmayan glutamine dönüştürülür. Bu dönüşüm ile birlikte glutamatın nöronlar üzerindeki eksitatorik etkisi ve gereksiz depolarizasyon riski önlenir.

Üretilen glutamin tekrardan glutamat sentezleyebilmesi için pre-sinaptik nöronlara aktarılır ve burada glutaminaz enzimi ile glutamin-glutamat dönüşümü sağlanır.

Öte yandan bu siklusun en büyük problemi ise amonyak homeostazının sağlanmasıdır. Astrositlerde glutamattan glutamin üretilirken bir molekül amonyak kullanılırken aynı şekilde nöronlarda da glutamat oluşturulurken bir molekül amonyak açığa çıkar. Oluşan amonyağın anında detoksifiye edilmesi için astrositlere geri aktarılması gerekmektedir. Zira amonyak toksitesinin nöronlarda birçok bilinen patolojik etkisi mevcuttur. Bunlardan en önemlileri :

1. Amonyak, nöronlarda inhibitör etki gösteren klor kanallarını inhibe eder
2. Amonyakın fazlası alfa-ketoglutarat ile birleşerek Krebs Siklusunun bozulmasına ve sonuçta beyinde glukozdan enerji üretiminin aksamasına sebebiyet vermektedir.

Aynı şekilde glial hücrelere alınan amonyak yine glutamat-glutamin siklusu sayesinde detoksifiye edilir. Ve burada görev alan glutamin sentetaz enzimi amonyağın miktarının kontrolündedir. Zira hiperamonyemi durumlarında (kronik ya da fulminan hepatitler, akut ya da son dönem böbrek yetmezlikleri) fazla amonyak glutamattan glutamin oluşumunu arttırarak glutamat sentezinde azalmaya yol açarak generalize bir depresyon yaratmaktadır. Bu patolojik durumun en yaygın örneği anksiyete, insomnia gibi belirtilerle başlayan ve somnolans ve koma ile sonlanan hepatik ensefalopatide gözlenmektedir.



Şekil 3. Glutamat-glutamin döngüsünde amonyağın kullanımı

(N. R. Sibson et al. *In vivo* ¹³C NMR measurements of cerebral glutamine synthesis as evidence for glutamate–glutamine cycling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Mar 18; 94(6): 2699–2704.)

Glutamat kan beyin bariyerini belirli taşıyıcılar sayesinde geçebilir, aynı şekilde beyin omurilik sıvısından yüksek afiniteli transport sistemi ile sinir sistemine aktarılıp beyin omurilik sıvısı içindeki miktarları sabit bir şekilde korunmaya çalışılır (40).

Glutamatın kendisi aynı zamanda inhibitörük etki gösteren bir nörotransmitter olan GABA'nın sentezinde de öncü moleküldür ve görevli olan enzim ise glutamat dekarboksilazdır.

2.1.2. Glutamat Taşıyıcıları

Glutamat taşıyıcıları, temelde glutamatu bir membran boyunca taşıyan kanallara verilen addır. Bu membran bir astrosit hücre membranı ya da bir intraselüler vezikül membranı gibi birçok membran olabilir. Buna dayanarak glutamat taşıyıcılarını temelde 2 aileye ayırmak mümkündür :

1. Eksitator amino asit taşıyıcı (EAAT) ailesi
2. Veziküler glutamat taşıyıcı (VGLUT) ailesi

Beyinde EAAT ailesinin temel görevi sinaptik boşluktan uzaklaştırarak glial ve nöronal hücrelere geri alınımını sağlarken, VGLUT ailesi ise sitoplazmadan veziküllere glutamat geçişini sağlamaktadır. Glutamat taşıyıcıları glutamatın yanı sıra aspartat veya diğer glutaminerjik maddeleri de taşımakta ve beyin haricinde birçok dokuda da yer alarak bu dokularda glutamat ve diğer glutaminerjik maddelerin fizyolojik etkilerinden sorumlu olmaktadır. Bu dokuların başında kalp, karaciğer, testis, kemik ve pankreas adacık hücreleri gelmektedir. En büyük afiniteleri L-glutamat olmakla beraber L-aspartat ve d-glutamata da afiniteleri mevcuttur.

EAAT ailesi, membrana yüzeyinde bulunan iyon -çoğunlukla sodyum- bağımlı sekonder aktif tranport sağlayan kanallardır (40). Bu taşıyıcılar ekstraselüler glutamat miktarını düzenlemekte aktif rol oynamaktadırlar (41). Sinaptik boşluğa salınan glutamat bu kanallar sayesinde kısa süre içerisinde ortamdan uzaklaştırılarak sinyal iletiminin sonlanmasında görev alırlar (42). Bu kanalların aktivitelerinde azalma, glutamatın toksik etki yaratıp post-sinaptik nöronda aşırı uyarılma ve sonucunda bir grup biyokimyasal kaskadın tetiklendiği *eksitotoksiste* ile sonuçlanabilmektedir (43). Aynı zamanda bu kanallar sayesinde glutamatın tekrar sentez ve kullanımına olanak sağlamaktadır.

2.1.2.1. Glutamat Taşıyıcı Tiplerinden EAAT'ler

Glutamat taşıyıcı ailesinin 2 temel üyesinden ilki olan EAAT'ler temelde hücre içi-dışı başta sodyum iyonlarının elektrokimyasal gradientine bağlı olarak çalışsalar da potasyum ve hidrojen konsantrasyonuna da bağlılık gösterir ve bundan ötürü ‘‘sodyum ve potasyum bağı glutamat taşıyıcıları’’ olarak da isimlendiriler. EAAT lerin alt tipleri glutamata farklı affinite göstermekle beraber sodyum bağımlı çalışanlar yüksek affiniteli glutamat taşıyıcıları olarak da bilinirler (44). EAAT'ler 1 molekül glutamatı 3 sodyum ve 1 hidrojen molekülü ile birlikte hücre içine alırken 1 potasyum molekülünü ise hücre dışına atarlar (45).

İnsanlarda EAAT'lerin 5 alt tipi bilinmektedir. EAAT1 ve 2 temelde glial hücrelerin yüzeyinde bulunmala beraber (46) EAAT2 (diğer adıyla GLT1[glial glutamat transporter]) hipokampal CA3 nöronların akson terminallerinde de az miktarda

saptanmıştır (47) ve yine EAAT2 beyindeki glutamat geri alınımının %90'ından fazlasına üstlenmektedir (48).EAAT3 ve 4 ise sadece nöronlara özgü iken (49) EAAT5 ise retinadaki bipolar nöronlarda ve fotoreseptörlerde bulunmaktadır (50).Ekstranöral dokularda ise glutamatın hücre içerisine taşınması yine EAAT2'ler tarafından yönetilmekte olup, bunun en belirgin ve güncel örneği pankreatik adacık hücrelerindedir (51).Pankreas adacık hücrelerinden glukagon ile birlikte salgılanan glutamat, beta adacık hücrelerinden EAAT2 tarafından alınarak insülin salınmasında düzenleyici/uyarıcı bir görev üstlendiği düşünülmektedir (52-54).

2.1.2.2. Glutamat Taşıyıcı Tiplerinden VGLUT'lar

Bilinen veziküler glutamat taşıyıcıları 3 adettir : VGLUT1-3 (55). Bu taşıyıcıların temel görevi hücre içerisine alınan glutamatu sinaptik veziküllere aktararak sinaptik boşluğa salınması için depolanmaları sağlarlar. VGLUT'lar sekretuar sistemdeki proton gradientine bağlıdır (sekretuar veziküllerin içerisi sitoplazmaya göre daha asidiktir) ve glutamata olan afiniteleri EAAT'lerinkine oranla sadece %1 civarındadır ve EAAT'lerin akine aspartata affinite göstermezler (7).VGLUT'lar arasında en fazla bilgi sahibi olunan VGLUT3 tür. Nöronlar glutamattan farklı bir nörotransmitter kullansa bile, örneğin santral 5-HT nöronları, VGLUT3 eksprese edebilirler (56) fakat bunun tam olarak fonksiyonu hala bilinmemektedir. VGLUT3'ün ayrıca işitme sisteminde hızlı glutaminerjik eksitasyonda görevli olduğu gösterilmiştir (57) Ayrıca anksiyete, mood düzenlenmesi, ağrı iletimi, uyku-uyanıklık siklusu, vücut ısısı ayarlanması, seksüel davranışlar gibi davranışsal ve fizyolojik görevlerde de rol aldığı düşünülmektedir. Ağrı iletiminde görev aldığı bilirse de şuan için tek kanıtlanmış rolü inflamasyon sonrası mekanik ağrı hipersensitivitesi olup nöropatik ağrılardaki rolü bilinmemektedir. Ayrıca ekstrasinaptik ve ekstranöronal glutamat depolanmasında da aktif olarak VGLUT3 görev almaktadır (58).

Glutamat taşıyıcılarının patolojileri hakkında birçok hastalık ilişkilendirilmiştir. Aşırı aktivitelerine bağlı yetersiz sinaptik glutamat miktarlarının şizofrenide rol aldığı düşünülmektedir (40).Aksine iskemik ve travmatik beyin hasarlarında taşıyıcıların görevlerini yerine getirememesi, sinaptik glutamatın aşırı birikmesine ve toksik etkilere

yol açmasına sebebiyet vermektedir. Bu ise, iskemi sonucu ATP üretiminin azalması ve sonuçta gerekli iyon konsantrasyonunu sağlayacak ATPaz pompalarının çalışmamasına bağlıdır. Sonuçta doğru iyon gradienti sağlanamamakta ve iyon gradientine göre çalışan glutamat taşıyıcıları glutamati ortamdan uzaklaştırmak yerine aksine ortama salgılamaktadır. Bu ise glutamat reseptörlerinin aşırı çalıştığı bir durum olan eksitotoksisite ile sonuçlanmaktadır (59).Kognitif ve motor fonksiyonlarda asıl rol alan sodyum bağımlı EAAT2'nin kaybının Alzheimer hastalığı, Huntington hastalığı, Parkinson demans kompleksi gibi hastalıklarda rol aldığı düşünülmektedir (60). Aynı şekilde amiyotrofik lateral skleroz (ALS) de karşılaşılan motor nöron harabiyetinin, spinal ve santral EAAT2 kaybıyla ilgili olabileceği de öne sürülmüştür (60). Ayrıca kokain, eroin, alkol ve sigara bağımlılığıyla nucleus accumbens'deki EAAT2 azalması arasında bağlantı saptanmış olup, bu bölgedeki EAAT2'nin ekspresyonunu arttıran ilaçların kullanımının (örn: N-asetilsistein) bu tip madde bağımlılığında ek bir tedavi yöntemi olabileceği düşünülmektedir (61).

2.1.3. Hücresel Etkiler ve Reseptörler

Glutamat etkisini hücre yüzeylerinde bulunan reseptörlerine bağlanarak göstermektedir. Memelilerde farmakolojik özelliklere göre 4 tip reseptör tanımlanmıştır ve bu sınıflandırma diğer organizmalarda farklı farmakolojik özelliklere bağlı olarak tam uygunluk göstermez : AMPA reseptörleri, kainat reseptörleri, NMDA reseptörleri ve metabotropik reseptörler. Metabotropik reseptörlerin en büyük özelliği G-protein aracılı sinyal iletimi yapması, yani bir ikincil haberleşme sistemi kullanmasıdır. İkincil haberleşme sistemi bir kaskad olduğundan, bir habercinin uyarılması birçok aktivasyon sağlamakta bu sebeple etki süresinin daha uzun olmaktadır. Diğerleri ise iyonotropik reseptörler olup, etkileri iyon geçişleri üzerinden sağlanmaktadır. Glutamatın en büyük etkilerinden olan sinaptik plastisiteye bağlı öğrenme ve bellek gelişimi hem iyonotropik hem metabotropik reseptörler tarafından sağlanmaktadır (62). Post-sinaptik nöronda iyonotropik reseptörlerin sayıca artması ya da azalması, uzun dönem potensiyasyon ya da uzun dönem depresyona sebep olmaktadır (63). Ek olarak metabotropik reseptörler de ikincil haberleşme kaskadına bağlı protein sentezini regüle ederek sinaptik plastisiteyi düzenlemektedir (64).Yapılan çalışmalar, glutamat reseptörlerinin aynı zamanda glial

hücreler üzerinde de olduğunu; buradaki hücrelerin gen ekspresyonunun kontrolünde, gelişmekte olan beyindeki prekürsör glial hücrelerin proliferasyon ve diferansiasyonunda rol aldığını göstermektedir.

2.1.4. İyonotropik Reseptörler

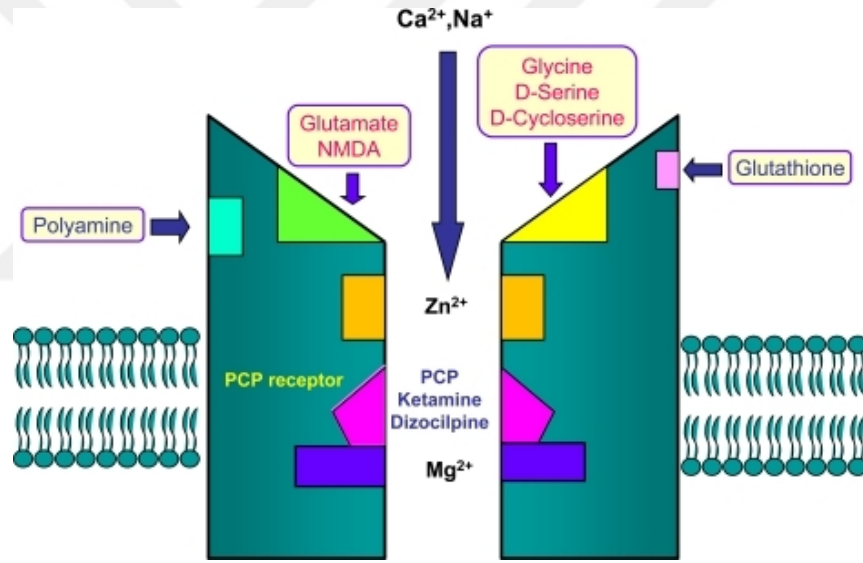
İyonotropik glutamat reseptörleri ligand kapılı; sodyum, potasyum bazen de kalsiyum geçişine izin veren non-selektif katyon kapılarıdır. Agonist ligandın bağlanmasından hemen sonra, bir iyon kanalı olan santral porun açılması, iyon akışına izin verilmesi ve sonuçta da eksitatorik post-sinaptik akım oluşması (EPSC) gerçekleşir. Bütün reseptörlerde EPSC meydana gelir fakat hız ve süre bütün alt tiplerde birbirinden farklıdır (65). NMDA reseptörleri diğerlerinden bazı açılardan farklılık gösterir. Bunlardan ilki, iyon geçişini voltaj bağımlı bir şekilde sınırlandıran bir internal Mg^{+2}/Zn^{+2} bağlanma bölgesi bulundurur, bu blokaj ise çevredeki AMPA reseptörlerinin oluşturduğu EPSC ler sayesinde ortadan kaldırılır. Bu yüzden ki, NMDA reseptörlerine ligand bağımlı olduğu kadar voltaj bağımlı da denebilir. İkincisi ise NMDA reseptörlerinin Ca^{+2} 'a olan geçirgenliğidir (66). Kalsiyum, hücre içerisinde gen yapılanmalarını ve protein sentezini düzenleyen önemli bir katyondur ve kalsiyum akımı sayesinde uzun süreli potansiasyon ve uzun süreli depresyon gerçekleşmektedir (67).

2.1.4.1. NMDA Reseptörleri

N-Metil-D-Aspartat (NMDA) reseptörleri, glutamat ve glisin (veya D-serin) bağlanması sonucu aktive olan ve pozitif yüklü iyonların membran boyuca hücre içerisine girişini sağlayan reseptörlerdir ve sinaptik plastisite kontrolünde son derece önemli görevleri vardır (68).NMDA reseptörü olarak isimlendirilmelerinin sebebi N-metil-D-aspartatın selektif olarak bu reseptörlere bağlanmasıdır. Aktifleşmesi ile non-selektif katyon kanalın açılmasının kontrolü her ne kadar primer olarak ligand bağımlı olsa da iyon geçişi kontrolü voltaj bağımlıdır. Ekstraselüler Mg^{+2} ve Zn^{+2} reseptördeki spesifik bölgelere bağlanarak iyon kanallarının açılmasını engeller ve bu engel ancak çevrede bulunan AMPA reseptörleri sayesinde oluşturulacak EPSC lerin birikerek membranda depolarizasyon oluşması ile kalkar. Sonuç olarak hücre içerisine Na^{+2} ve

Ca⁺² girişi gerçekleşirken hücre dışarısına K⁺² ıkışı gerçekleşir (69).

NMDA reseptörlerinden içeri alınan Ca⁺² sinaptik plastisitede ve dolayısıyla öğrenme ve bellek gelişiminde kritik rol oynar. Ligand bağımlı olduğu kadar Mg⁺² ve Zn⁺² da bağladığı için voltaj bağımlı olan NMDA reseptörleri için gerekli ligandlar 2 molekül glutamat ya da aspartat ve 2 molekül glisin ya da serindir. NMDA reseptörü aynı zamanda birçok ilaç ve madde tarafından bloke edilir, fenilsiklidin (PCP), alkol (etanol), dekstrametorfan (DXM) ve bunların hepsinin özel bir bağlanma bölgesi mevcuttur. Ayrıca nitrik oksit ve ketamin de iyon kanalında geçişi sınırlandırarak parsiyel bir antagonizma yaratır.



şekil 4. NMDA reseptöründe çinko blokajı

(Kenji Hashimoto. *Glycine Transport Inhibitors for the Treatment of Schizophrenia. The Open Medicinal Chemistry Journal* ISSN: 1874-1045 — Volume 12, 2018Chelsea A. Barr, Shawn C. Burdette.)

Yapı olarak NMDA reseptörü 2 adet subunit içeren tetramer bir yapıya sahiptir : 2 adet GluN1 (NR1) ve 2 adet GluN2 (NR2). Benzeri bir gen yapısından kodlanan NR3 ise reseptör üzerinde inhibitrik aktiviteye sahiptir.

NR1 subnitlerinin transkriptlerinin selektif kesilmeleri ve NR2 subnitlerinin farklı alt tiplerinin sentezleri ile farklı ve çok sayıda NMDA reseptör izoformları

meydana gelmektedir. NR1 subüniti temelde ko-agonist olan glisin/serini bağlarken NR2 subüniti ise glutamat/aspartat bağlamaktan sorumludur. NMDA reseptörü 3 alanda incelenebilir :

1. Ligand (agonist) bağlayan alan: 3 transmembran segmentten oluşur ve potasyum selektif kanallara benzer bir şekilde loop yapar.

2. Membran alanı: İyon kanalı porunun oluşmasında katkıda bulunur ve reseptörün iletkenliğinden, kalsiyum permabilitesinden ve magnezyum blokajından sorumludur.

3. Sitoplazmik alan: Her subünitin kendine özgü sitoplazmik alanı mevcuttur ve birçok protein kinaz, protein fosfatazlar tarafından modifiye edilebilen rezidülere sahiptir. Aynı zamanda intraselüler yapısal ve katlanma proteinleri ile ilişki içerisinde.

NR1'in 7 adet subüniti, GRIN1 geninin transkript ürününün farklı kesilmesi ile oluşur (70). NR2 subüniti ise insanlarda 4 adet alt tipe sahiptir ve bunların hepsi farklı genler tarafından kodlanır : GRIN2A,B,C ve D (71). NR2'ler çeşitli hücre içi sinyal molekülleri ile bağlantıda olan C-terminallere sahiptir, farklı hücre tiperinde farklı alt tiplerdedir bu yüzden NMDA reseptörünün temel elektrofizyolojik özelliğini belirler. Örneğin, immatür nöronlarda ve ekstrasinaptik alanlarda NR2B yoğunluktadır (72). Bu yüzden NR2B erken post natal beyinde daha yoğun olarak bulunur ve insan yaşlandıkça NR2A'lar sayıca artmaya başlar ve bir süre sonra NR2A'ların sayısı NR2B'leri geçer. Bu olaya NR2B-NR2A dönüşümü denir (73). Bu insanda bazı değişikliklerle sonuçlanır çünkü NR2B'lerin açık kalma ve iyon iletme süreleri NR2A'lara göre oldukça uzundur (74).Buradan da tahmin edilebileceği gibi, yaş ilerledikçe hafıza yeteneklerinde azalma meydana gelmesinde NR2B-NR2A dönüşümü oldukça etkilidir. Bu dönüşümle ilgili 3 hipotez bulunmaktadır, ilkinde göre NR2A'lar sayıca artmakta ve NR2B'ler azalmaktadır. İkincisi ise ekstrasinaptik NR2B'lerin yerini NR2A'ların aldığını savunmaktadır. Sonuncu hipotez ise NR2B'lerde bir azalma olmaksızın NR2A'ların sayısında artmaya bağlı dilüsyonel bir azalma olduğunu söyler. Bunların arasında 1 ve 2'nin üzerinde daha çok durulmaktadır (74). NR2A ve NR2B subünitleri eksitotoksiste üzerinde de farklı rollere sahiptir (75). Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada izole NR2B'lerin

parçalanması ölüm ile sonuçlanırken, izole NR2A'ların parçalanması ise yaşayan fakat hipokampal plastisitenin bozulması ile sonuçlanmıştır (76).Buradan da anlaşılacağı gibi NR2B'lerin vital beyin gelişiminde daha büyük rolü mevcuttur. Chihiro Nozaki ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise çinko'nun NR2A'lara üzerinde daha yüksek inhibisyon yarattığı gösterilmiştir (77).

NMDA reseptöre agonist ve antagonist etki edebilen bir çok madde mevcuttur.

Fizyolojik koşullarda NMDA reseptörünün aktivasyonu için 2 molekül agonist ve 2 molekül koagonist gereklidir. Agonist olarak glutamat ya da aspartat bağlanması gereklidir. Aspartat, glutamat kadar güçlü bir stimülasyon yaratmaz (78). Koagonist olarak görev yapan maddeler ise başlıca glisin veya D-serindir. D-serin, glisine göre çok daha güçlü bir bağlanma ve aktivasyon sağlamaktadır (79). D-serin, bir çeşit izomeraz olan serin rasemaz tarafından üretilir ve NMDA reseptörleri çevresinde sıkça bulunur. D-serin hem nöronlardan hem de çevre astrositlerden salgılanarak NMDA reseptörlerini düzenlemekte görev alır. D-serinin ortamdaki uzaklaştırılması NMDA reseptörleri tarafından sağlanan eksitasyonu baskılayabilir. NMDA reseptörleri ilişkili akımlar membran depolarizasyonu ile ilişkili olduğundan dolayı NMDA agonistleri Mg^{+2} blokajını ortadan kaldırıp kanal açıklığının devamını depolarizasyon ile sağlayabilir. Bu öğrenme ve bellek açısından fayda sağlayabileceği gibi, uzamış ve fazla akım yaratarak toksik etkilere de sebep olabilir. Buna en iyi örnek kokainin yarattığı gecikmiş NMDA reseptör bağımlı akımlara bağlı nörotoksik sonuçlardır. Başlıca NMDA reseptör agonistleri arasında tübreküloz tedavisinde 2. basamak ilaç olarak kullanılan d-sikloserin, solvent olarak kullanılan piperidinin karboksilik asidi olan piperidindikarboksilik asit, aspartik asit, glutamik asit, triptofanın yıkım ürünü olan kinolinik asit ve kinolinat, homosistein ve homosisteik asit, D-alanin ve L-alanin, şizofreni ve kokain bağımlılığında kullanılan ve glisin bağlanma bölgesinin pozitif allosterik modülatörü olarak görev yapan nebestinel ve kurkumindir (80). Reseptöre adını veren NMDA ise bu reseptörlerin bir parsiyel agonisti olarak görev yapar. Ayrıca nebestinel benzeri bir ilaç olan apimostinel ve rapastinel de parsiyel agonist olarak görev yaparak psikotomimetik etkilerinden dolayı antidepresan ve şizofrenide kullanılabilirlikleri araştırılmaktadır (81).

NMDA reseptör antagonistleri ise hayvanlarda ve bazı insanlarda anestetik olarak kullanılabilirler. Yüksek dozlarda kullanıldığında beyinde hasar yaratabilmektedir. Fareler üzerinde yüksek doz ketamin ile yapılan çalışmalarda kortikal düzeyde hasarlar gözlenmiş ve bu hasarlara Olney lezyonları adı verilmiştir (82). Bilinen belli başlı antagonistler ketamin, eksitotoksiste tedavisinde sıklıkla kullanılan ve magnezyum blokajı üzerinden etki eden memantin, nitroz oksit, ksenon, genel ligand bağımlı katyon kanal inhibitörü olan ve opioid analjezik etkilerini agonize eden agmatindir. Ayrıca daha zayıf inhibisyon yaratan maddeler de mevcuttur : bir antiviral olan ve aynı zamanda dopamin geri alımını baskılayan amantadin, etanol ve bir opioid analjezik olan metadon.

Reseptörün temel modülasyonu kanallardan geçen Na^{+2} , K^{+2} ve Ca^{+2} ile sağlanmaktadır. Bunun yanı sıra başka birçok molekül de modülasyonda görev almaktadır (83). Poliaminler, reseptörü direk aktive etmezler, reseptörün uyarılma durumuna göre yanıtları potansiye ya da inhibe edebilirler. Aynı zamanda aminoglikozid türevi antibiyotikler de poliamin benzeri etki gösterirler. Burada dikkat edilmesi gereken nokta, modülatörler genelde uyarımın az olduğunda etkiyi potansiye etmeye; fazla olduğunda ise inhibe etmeye yönelik çalışırlar. Başka bir modüasyon ise pH ile sağlanır ve fizyolojik koşullarda H^{+} iyonu artışı reseptörü inhibe eder. Bu inhibisyon ise NR1A subtipi üzerinden sağlanır.

NMDA reseptörleri ayrıca kimyasal redüksiyon ve oksidasyonlar ile güçlü bir şekilde modüle edilmektedir. Redükthanlar NMDA kanal etkinliğini artırırken, oksidanlar ise azaltmaktadır. Sonuç olarak glutatyon, lipoik asit gibi endojen redox ajanlar tarafından NMDA reseptör aktivitesi düzenlenmektedir.

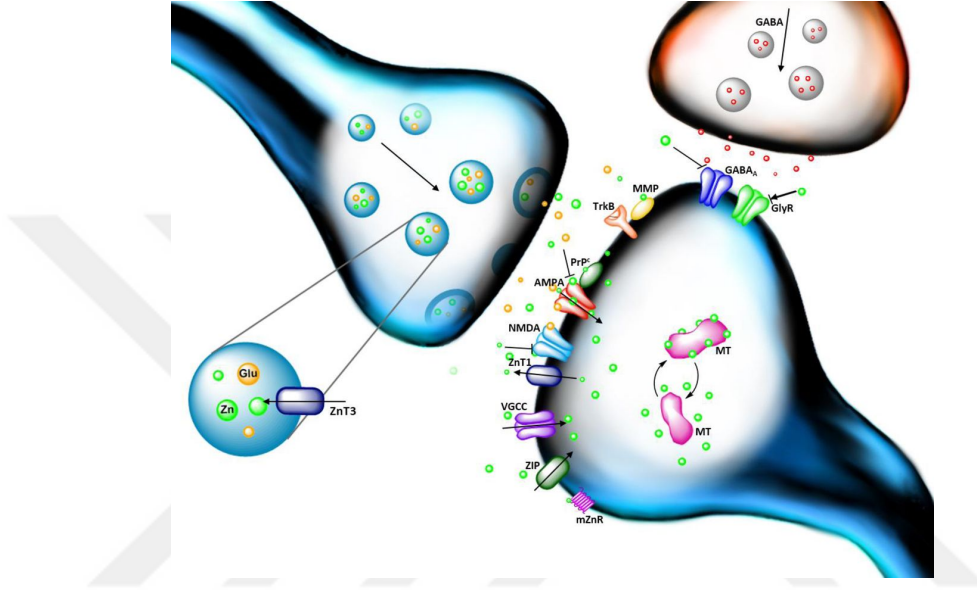
Çoğu metaller inhibisyon sağlamaktadır. Bunlardan en bilineni kurşundur. Pb^{+2} artışı özellikle presinaptik bir reseptör hasarı yaratır, aynı zamanda sinaptogenezi NMDA'ya bağlı BDNF sinyalini bozarak yok edebilir (84). Benzer şekilde her ne kadar bakır ve çinko inhibisyon sağlayan modülatörler olsalar da, çinko nöral aktiviteye bağlı olarak inhibisyon veya potansiyasyon sağlayabilir (85).

2.1.4.2. Çinko ve NMDA reseptör ilişkisi

Finn-Mogens Haug'un 1967'de ilk kez çinko depoları içeren nöronları keşfettiğinden bu yana çinkonun, beyinde birçok nöronların içerisinde veziküllerde depolanarak, glutamat ile birlikte sinaptik boşluğa salınan ve reseptör düzeyinde modülasyon sağlayan bir metal olduğu anlaşılmıştır. Yapılan birçok invitro çalışmada çinkonun NR2A alt tiplerine yüksek afinitesi ile NMDA reseptörleri üzerine inhibisyon yaptığı gösterilmiştir (86-88). Bu inhibisyon 2 türdür : voltaj bağımsız ve voltaj bağımlı. Voltaj bağımlı olan inhibisyonu magnezyum inhibisyonuna oldukça benzerlik gösterir ve NR2A N-terminallerine bağlanarak kanal geçirgenliğini durdurur. Çinko, magnezyumdan farklı olarak, daha düşük bir inhibisyon yaratmasına rağmen kanalın içerisinde daha süperfisiyal bir noktaya bağlandığından ötürü daha düşük dozarda da inhibisyon sağlayabilmektedir. Öte yandan NR2A knockout farelerde yapılan birçok çalışmalarda inhibisyonun kaybolmasına bağlı olarak anksiyete ve diğer eksitatorik durumların ortaya çıkmasıyla birlikte, moleküler düzeylerde inhibisyonun devam ettiği gözlenmiş ve bu inhibisyona da voltaj bağımsız inhibisyon adı verilmiştir. Voltaj bağımsız inhibisyon reseptör alt tiplerine selektivite göstermez ve tetramer yapıdaki NMDA reseptörlerinin her bir alt birimine bağlanarak uyarı oluşumunu engeller. Bu konuda kesin bir bilgi olmamasına rağmen potasyum çıkışını durdurarak repolarizasyonu engellediği/geciktirdiği düşünülmektedir (89). Bu etkisini ise voltaj bağımlı inhibisyonda olduğu gibi reseptörün transmembranik alanından ziyade intrasitoplazmik bölümünde yaptığı düşünülmektedir. Diğer yandan Westbrook ve Mayer'in belirttiği gibi micromolar düzeylerde voltaj bağımsız bir inhibisyon yaratan çinko, daha yüksek seviyelerde voltaj bağımlı bir inhibisyon da yaratır.

Çinko, inhibitörük etkisinin yanı sıra, eksitasyonun düşük olduğu durumlarda potansiyasyon da yaratabilmektedir (90). Bu etkisi submikromolar düzeylerde bile ortaya çıkar ve NMDAR1 alt tipine özgüdür. Çinko, hipokampal nöronlarda presinaptik granüllerde depolanmakta ve glutamatın salınımında görev yapmaktadır. Aynı zamanda post-sinaptik nöronlarda NMDA reseptörlerinin uyardığı ikincil haberci uyarı kaskadını da tetikleyerek sinaptik plastisitede rol almaktadır. Bu açıdan öğrenme ve bellek için gerekli bir metal olma özelliğindedir ve inhibitörük-eksitatorük görevlerinin kontrolü için

hücre içi ve sinaptik çinko düzeyleri son derece sıkı bir kontrol altında tutulmaktadır. Burada görev yapan temel proteinler metallothioneinlerdir ve hücre içi çinko seviyeleri arttığında çinkoyu bağlayarak hipokampal bölgelerde eksitotoksisite oluşumunu engeller (91).



Şekil 5. Sinaptik Boşluktaki Çinko Taşıyıcıları
(*The zinc paradigm for metalloneurochemistry. Essays In Biochemistry May 09, 2017, 61(2) 225-235*)

Metallothionein'in santral sisteme özgü alt tipi olan metallothionein tip 3 knockout farelerde yapılan çeşitli çalışmalarda artmış post-sinaptik hücre içi çinko ve buna bağlı eksitotoksisite ve nöronal kayıp gözlenmiştir. Aynı şekilde eksitotoksisite ile seyreden hastalıklarda metallothionein'in kalıtsal ya da saporadik olarak azalmasından şüphelenilmektedir. Çinkonun bu etkisi en çok post-sinaptik hücre içi seviyeleri ile ilişkili olduğundan kan çinko düzeylerinden inhibitörük etkisine göre daha fazla etkilenmektedir. Bu açıdan eksitotoksisite ile seyreden hastalıklarında kullanılması olası şelasyon tedavilerinin amacı altında bu yatmaktadır.

2.1.4.3. AMPA reseptörleri

Alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolepropionik asit reseptörleri, diğer adıyla AMPA reseptörleri, hızlı sinaptik ileti sağlayan bir çeşit glutamat reseptörleridir. Bir çeşit sentetik glutamat analogu olan AMPA tarafından uyarıldıkları için bu ismi almış olup, santral sinir sisteminde en yaygın olarak bulunan reseptördür. Yapı olarak bakıldığında, NMDA reseptörleri gibi tetramer bir yapı gösterir ve 4 adet alt ünite içermektedir : GRIA1-4 (GluR1-4) (92). Çoğunlukla simetrik 2 dimer içerir ve bunlardan birisi hemen hemen her zaman bir adet GRIA2 dimeri, diğeri ise GRIA1, GRIA3 ya da GRIA4'ün bir dimeridir (93). Her bir alt birim, N terminali ekstraselüler C terminali ise intraselüler yerleşim gösteren 4 adet transmembranik parçadan meydana gelmektedir. Her ne kadar 4ü de transmembranik olarak söylene de, 2. parça membranı tam olarak kat etmez ve membran içerisinde intraselüler bölüme geri kıvrılır (94). Tetramer yapı oluştuğunda her bir alt birimin 2. Bölümleri karşılıklı olarak reseptörün iyon kanalını meydana getirirler.

AMPA reseptörleri temelde katlanma proteinleri ile ilişkilerini belirleyen C-terminal bölümlerinde farklılıklar gösterirler. Bütün AMPA reseptörleri PDZ domaini bağlayıcı alan içermekle beraber bağlanan PDZ domainleri birbirinden farklıdır.

AMPA reseptörlerinin fosforilasyonları, kanalların açık kalma sürelerini ve iletkenliklerini kontrol eder. Fosforilasyonu üzerinde en fazla çalışılmış olan alt ünite GluR1 olup, serin 818 (S818) bölgesinin protein kinaz C tarafından fosforillenmesi uzun süreli potansiyasyon için gereklidir (95). Aynı zamanda uzun süreli potansiyasyon esnasında GluR1'deki S383'ün fosforillenmesi, AMPA reseptörün sinaptik boşluğa taşınmasında ve iletkenliğinin artmasında rol alır (95-97).

AMPA reseptörleri, glutamat ya da diğer agonistlerin bağlanabileceği her birisi bir alt birimde olmak üzere 4 adet bölge içerir (98). Bağlanma bölgesi her bir alt birimi oluşturan 4 transmembranik parçadan üçüncü ve dördüncünün arasındaki ekstraselüler kıvrımı ve N-terminal kıvrımı tarafından oluşturulur (99). Agonist bağlandığında bu 2

kıvrım birbirlerine doğru hareket eder ve kanal açılır. Daha fazla bağlanma bölgesi agonistler tarafından doldurulduğunda kanalın açıklığı ve akımı da artar. Kanal bir kez açıldı mı, akımı durdurmak üzere reseptör desensitize olmaya başlar. Bu desentizasyonun, bağlanan bölgedeki kıvrımların açılardaki değişikliklerle olduğu düşünülmektedir (100). Daha sonra tekrardan eski haline gelerek yeni agonist bağlamaya hazır hale gelir. Bu yaklaşık olarak 1ms içerisinde gerçekleşir ve bundan dolayı AMPA reseptörleri hızlı eksitatörük iletiden sorumludur (101). Reseptörün kalsiyum, sodyum ve potasyum gibi katyonlara geçirgenliği GluR2 alt ünitesi tarafından yönetilir. Eğer bir reseptör GluR2 alt ünitesi barındırmazsa sodyum, potasyum ve kalsiyuma geçirgen hale gelirken, reseptörde GluR2'nin varlığında her zaman onu kalsiyuma karşı geçirgensiz hale getirir. Bu özellik GluR2 nin 2. bölümünde, mRNA'nın post transkripsiyonel modifikasyonu ile sağlanır - RNA düzenlenmesi-. Temel mekanizma, yüksüz olan glutamin aminoasidinin (Q formu) pozitif yüklü arjinin aminoasidine çevrilmesidir (R formu). Pozitif yüklü arjinin, yine pozitif yüklü kalsiyumun girişine olanak tanımaz. Santral sinir sistemindeki hemen hemen bütün AMPA reseptörleri GluR2(R)'ye dönüştürülür. Bu açıdan kalsiyum geçirgenliğine sahip NMDA reseptörlerinden farklılık gösterir. Bu da eksitotoksisteye karşı bir koruyucu mekanizma olarak düşünülmektedir (102).

Reseptörün hangi alt birimleri içerdiği, modülasyonu açısından da önemlidir. Eğer bir AMPA reseptörü GluR2 içermezse, poliaminlerin blokajına karşı daha duyarlı hale gelir. Poliaminler, AMPA reseptörleri üzerindeki potasyum akımını engeller. GluR2 içermeyen bir AMPA reseptörüne poliamin bağlandığında, hücre depolarize olduktan sonra dışarı potasyum çıkışı engellenir ve uyarılma süresi uzar.

2.1.4.4. Kainat Reseptörleri

Kainat reseptörleri, glutamata yanıt veren bir diğer iyonotropik reseptörlerdir. Bu ismi, kırmızı algerde bulunan kainat adlı bir maddeye yanıt vermelerinden ötürü almışlardır. AMPA reseptörleri ile birlikte non-NMDA reseptörleri olarak isimlendirilirler. Bu reseptörler hakkında henüz AMPA ya da NMDA reseptörleri kadar bilgi mevcut değildir. Kainat reseptörleri hem presinaptik hem de postsinaptik yerleşim gösterirler. Postsinaptik reseptörler eksitatuvar yanıtlardan sorumlu iken presinaptik

reseptörler GABA salınımını regüle ederek inhibitörük etkilerden sorumludur (103).Yapı olarak tıpkı NMDA ve AMPA reseptörleri gibi tetramer bir oluşum gösterirler ve 5 adet alt birime sahiptir : GluR5, GluR6, GluR7, KA1, KA2 (104). GluR5-7'ler homomer oluşturabilirler (örneğin sadece GluR5'ten meydana gelmiş bir tetramer) veya GluR5 ve GluR6'dan oluşan heteromerler oluşturabilirler. Öte yandan KA1 ya da KA2 sadece GluR5-7 ler ile birlikte yer alabilirler, homomer meydana getiremezler. Her bir alt birim N-terminal kalıntılarından bağlanırlar bu rezidülerin ilk segmenti nörotransmitteri/agonisti bağlayacak bir kıvrım içerir; bu alana S1 adı verilir. Daha sonra membranı 3 kez kat eder. İlk membranı geçen bölüme M1 adı verilir. M2 ise sitoplazmik bölgeden başlar, membranın yarısını kat ederek tekrar sitoplazmaya döner. Bu yapı aynı AMPA reseptörlerine benzer ve M2 bölümü reseptörün kalsiyum geçirgenliğini kontrol eder (p-loop). M2 sonrasında M3 bölümüne döner, burası agonistin N-terminal kıvrımı ile bağlanacağı diğer bölgedir. M4 ekstraselüler olarak başlar ve hücre içerisinde C-terminal ile sonlanır.

Kainat reseptörleri, sodyum ve potasyuma geçirgen olup tek kanal iletkenlikleri AMPA reseptörlerine benzer, yaklaşık 20 pikosaniyedir. Ancak AMPA reseptörlerinden daha yavaş bir uyarı artışı ve azalışı sürelerine sahip olduklarından, genel anlamda AMPA reseptörlerinden daha yavaş bir uyarı sağlarlar. Kalsiyuma geçirgenlikleri yok denecek kadar azdır, p-loop u düzenleyen RNA lar tarafından bu geçirgenlik düzenlenir (105).

Kainat reseptörleri yukarıda da bahsedildiği gibi hem eksitatorik hem de inhibitörük etki gösterirler (106). Sinaptik plastisitede çok ufak rolleri mevcuttur (107). Presinaptik nöronlardaki reseptörlerin uyarılması, salgılanan nörotransmitter seviyelerini etkileyebilir (108). Bu etki kısa sürede ortaya çıkıp, uzun süre devam edebilir ve tekrarlayan kainat reseptörleri uyarımları ile kalıcı hale gelebilir (109).

2.1.4.4. Metabotropik Reseptörler

Metabotropik glutamat reseptörleri, diğer adıyla mGluR'ler, indirekt olarak bir takım metabolik prosesler sonucu aktifleşen glutamat reseptörleridir. G protein bağımlı

reseptörler (GPCR) grubunun C ailesine aittirler (110). Diğer bütün glutamat reseptörleri gibi glutamat ve diğer eksitatorik aminoasitleri bağlama yeteneğine sahiptirler. mGluR'lar hipokampus, serebellum, serebral korteks gibi beyinin birçok alanında ve periferik sinir sisteminde hem presinaptik hem de postsinaptik bölgede yer alırlar santral ve birçok görev üstlenirler; ağrının algılanması, bellek gelişimi, öğrenme, hafıza gibi (111).

İyonotropik reseptörlerin 4 transmembranik parçalarının aksine, diğer metabotropik reseptörler gibi 7 adet transmembranik parça içerirler (102).

İyonotropik reseptörlerin aksine mGluR'lar birer iyon kanalı değildirler. Aksine bir takım biyokimyasal kaskadları aktive ederek iyon kanallarını ya da başka proteinleri aktive ederek görev yaparlar (103). Bu aktivasyonlar sinapsın uyarılabilirliğinde değişiklikler yaratabilir, örneğin presinaptik bir mGluR uyarımı bir nörotransmitterin salgısında bir inhibisyonuna sebep olabilir (104). Benzer şekilde postsinaptik bir uyarım sonucu diğer reseptörlerin postsinaptik uyarı yanıtlarını potansiye edebilir (105). Metabotropik reseptörlerin sinyal aracılı uyarı doğurabilmesi için dimerik bir organizasyonda olması gereklidir (106).

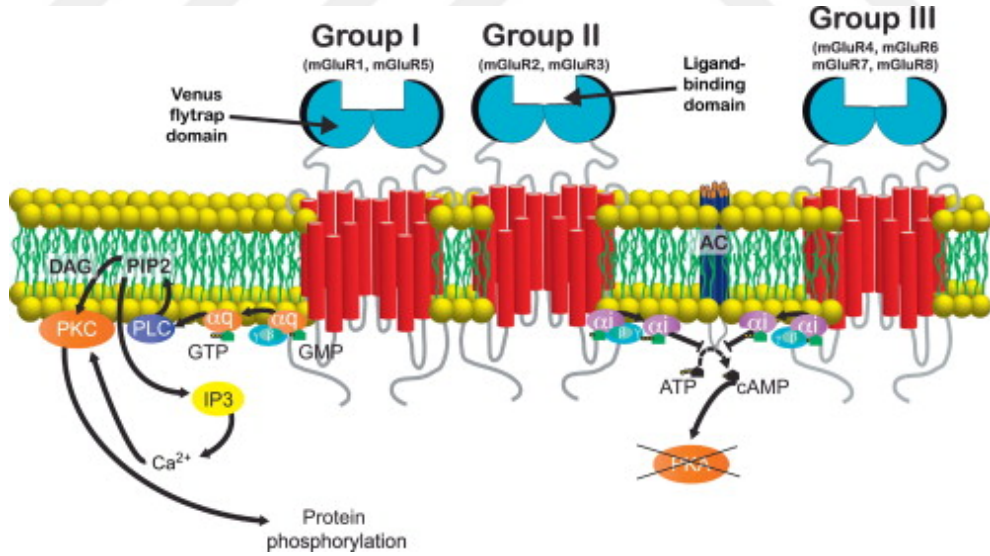
8 tip mGluR tanımlanmış olup bunlar mGluR1-8 adını almaktadır ve temelde fizyolojik aktivitelerine ve moleküler yapılarına göre 3 grupta incelenirler: I, II, III (105,106).

Grup I reseptörler mGluR1 ve mGluR5'i içerir. Bu gruptaki reseptörler AMPA reseptörlerine benzer şekilde en güçlü L-kuiskualik asit tarafından uyarılır (107). L-kuiskualik asit, kuiskualis bitkisinden elde edilen bir eksitatorik amino asit analogudur. Grup I reseptörlerinin uyarılması, fosfolipaz C enzimini aktifleştirerek membran fosfolipidlerinden inozitol 1,4,5-trifosfat (IP3) ve diaçilgliserol (DAG) oluşumunu sağlar. IP3 hidrofilik özellikte olduğundan endoplazmik retikuluma kadar ulaşır ve burada reseptörü ile birleşerek kalsiyum kanallarının açılmasına ve sitoplazmik alana kalsiyum salınmasına sebebiyet verir. DAG ise sitoplazmada kalır fosfolipaz C için bir kofaktör rolü üstlenir. Salınan kalsiyum ise uzun süreli potansiyasyon/depresyon için gerekli

sinaptik plastisite, reseptör upregülasyonu, reseptör downregülasyonu dahil olmak üzere birçok olayda görev alır.

Aynı zamanda bu reseptörler membran yüzeyindeki Na^{+2} ve K^{+2} kapıları ile de ilişki içerisindedir (101). Reseptör yanıtları eksitatorik, iletkenliği arttırıcı şekilde olabilir; örneğin presinaptik alandan daha fazla glutamat salınımına sebebiyet verebilir. Öte yandan postsinaptik alanda inhibitörük potansiyeller de yaratabilir. Glutamat salınımını baskılayabilir ya da voltaj bağımlı kalsiyum kanallarını modüle ederek LTD'yi etkileyebilir.

Grup II reseptörler mGluR2 ve mGluR3'leri; Grup III reseptörler ise mGluR 4,6,7 ve 8'i içerir. Bu 2 grup çoğunlukla ATP'den cAMP oluşturan adenilat siklaz enzimini inhibe eden G proteinini (G_i) aktive ederek çalışırlar. Presinaptik inhibisyonda görev alırlar ve kortekste hem eksitatorük hem de inhibitörük postsinaptik membran potansiyel aktivitelerini düşürürler (105).



Şekil 6. Glutamatın metabotropik reseptörleri

(Benedict J.Kolber. Chapter Ten - mGluRs Head to Toe in Pain. Progress in Molecular Biology and Translational Science. Volume 131, 2015, p: 281-324)

Yapılan çalışmalarda grup I reseptörlerin postsinaptik alanlarda, grup 2 ve 3 ün ise presinaptik alanlarda yoğunlukla olduğunu gösterse de her grup her bölgede

bulunabilmektedir (109). Öte yandan bazı reseptörler bazı bölgelerde sayıca üstünlük göstermektedir. Örneğin mGluR4 beyinde talamus, hipotalamus ve kaudat nükleusta yoğun olarak saptanmıştır (110).

Metabotropik glutamat reseptörlerinin şu ana kadar birçok farklı görevleri tanımlanmıştır. Grup 1 mGluR'lar çevresinde yer alan NMDA reseptörlerine PDZ proteinleri tarafından bağlanmakta ve onların aktivitelerini arttırmaktadır (111). NMDA reseptörleri üzerindeki bu modülatuar etkilerinden dolayı metabotropik reseptörler, nöronların eksitatoksisiteye karşı savunmalarında kilit reseptörler olabileceği düşünülmektedir (112). Benzer şekilde NMDA reseptör agonistlerinin grup I mGluR'lerin yoğunlukta olduğu bölgelerde daha çok hasar yarattığı gösterilmiştir (113). Aynı düşünceyle grup II ve III mGluR'lerin yoğun olduğu yerlerde tersi etki beklenmiş ve yapılan çalışmalarda travma sonrası glutamat salınımına bağlı toksik hasardan koruyucu olabilecekleri gösterilmiştir (114). Metabotropik glutamat reseptörlerinin aynı zamanda nöronlar arası dopaminerjik ve adrenerjik iletide de rol aldığı düşünülmektedir (115).

2.2. İnsülinin Genel Özellikleri

İnsülin pankreasta bulunan langerhans adalarındaki beta hücrelerinden sentezlenen; 51 aminoasitten meydana gelmiş ve birbirlerine disülfid bağlarıyla bağlanmış A ve B zincirlerinden meydana dimer yapıda bir peptid hormondur. İnsülin yağ, protein ve karbonhidrat emilimi aracılığıyla bunların metabolizmalarını ve kandan yağ dokusuna, karaciğere ve iskelet kasına glukoz girişini kontrol eder. Aynı zamanda hücre içerisine alınan glukozun, yağ ve glukojene dönüşünü de sağlayarak anabolizan bir görev yapar (116). Aksine kandaki yüksek insülin seviyeleri karaciğerden kana glukoz salınımını ve glukojen yıkımını inhibe eder.

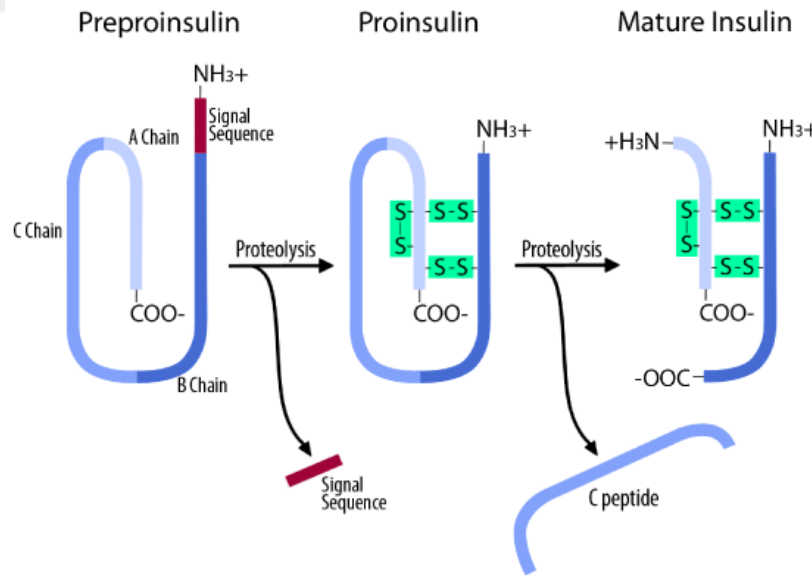
İnsülin her ne kadar protein sentezini tetikleyen anabolizan bir hormon olsa da, düşük insülin seviyeleri tam tersi katabolik bir etkiye sahiptir.

Pankreatik beta hücreleri kan glukoz seviyelerine duyarlıdır. Kandaki glukoz konsantrasyonları yükseldiğinde beta hücrelerinden kana insülin sekrete edilirken tam

tersi durumda, yani kan glukoz konsantrasyonu azaldığında sekresyonu inhibe olur. Öte yandan alfa hücrelerinden sekrete edilen glukagon, glukoneogenezi ve glukojenolizi uyarak insülinin tam tersi etki gösterir.

2.2.1. İnsülinin yapısı, sentezi, salınımı ve çinkonun rolü

İnsülin, pankreas beta hücrelerinde düz endoplazmik retikulumun duvarlarındaki ribozomlarda 24 rezidü sinyal peptidi içeren preprohormon olarak sentezlenir ve N terminalinde bir sinyal peptidi, C terminalinde ise bir molekül çinko içerir. Sentezinden hemen sonra preprotein konvertaz 1 ve 2 ile birlikte sinyal peptidi uzaklaştırılarak proinsülin haline getirilir. Monomer halde sentezlenen prepro insülin, endoplazmik retikulum içerisinde katlanma yaparak disülfid bağları içeren dimer halini alır. Bu oluşumda N-terminalinden preproinsüline bağlanmış çinkonun rolü büyüktür.



Şekil 7. İnsülinin maturasyonu

(Thompson A, Kanamarlapudi V (2013) Type 2 Diabetes Mellitus and Glucagon Like Peptide-1 Receptor Signalling. Clin Exp Pharmacol 3:138. doi: 10.4172/2161-1459.1000138)

Endoplazmik retikulum dahilindeki bir çok fonksiyonda çinkonun rolü büyüktür. Ribozomlardan sentezlendikten sonra monomer olarak gelen proteinler, "katlanmamış protein yanıtı"(UPR=Unfolded protein response) adı verilen bir yanıt oluşturur ve bu yanıt çinko varlığı dahilinde, Zap-1 üzerinden INS, ERO1, EUG1 ve PDI1 (protein disülfid izomerizasyonda görevli kodlayıcı proteinler) ve FKB2 (peptidil-prolil cis-trans izomeraz kodlayıcı protein) aktivasyonu sağlayarak proteinlerin post-transkripsiyonel modifikasyonunda modülatördür (117,118).

INS -insülin katlanmasında esansiyeldir- 'nin düzgün çalışabilmesi için endoplazmik retikulum içerisine ZnT5 (zinc transporter5) ve ZnT6 aracılığı ile çinko girişi sağlanır. ZnT, diğer adıyla çinko taşıyıcısı, çinko taşıyıcıları ailesinin 2 üyesinden birisidir. ZnT'ler intrasitoplazmik çinkoyu hücre dışarısına ya da organel/veziküller içerisine taşıyan taşıyıcı ailesidir (SCL30) ve 10 alt tipi tanımlanmıştır (119). Ailenin diğer üyesi ise ZIP'lerdir (Zrt-like and Irt-like protein) ve bunlar ise ekstraselüler ya da intraveziküler çinkoyu sitoplazmaya taşır.

Proinsülin 81 aminoasitten meydana gelen 3 zincirli bir dimerdir : A zinciri, B zinciri ve arada bağlantı sağlayan C-peptid (120). Fonksiyonel bir matür insülinin oluşması için düzgün katlanmış bir proinsülin şarttır : A ve B arasında meydana gelmiş 2 adet disülfid bağı (A ve B'nin 7. rezidüleri arası ile A'nın 19.rezidüsü - B'nin 20.rezidüsü arası) ve A zinciri içerisinde yer alan 1 adet daha silfölfid bağı (6.-11. rezidü arası) ve doğru pozisyonda bir C peptid (121).

İnsülinin katlanmasında bir bozukluk, antikor olmadan insülin seviyelerinin azaldığı Mutant INS geni ilişkili diyabet (MIDY) ile sonuçlanmaktadır (122). Benzer çalışmalar ise insülinin sekresyonun sağlam kaldığı, hatta bazen arttığı, fakat fenotip olarak tip1 diyabete benzerlik gösteren, insülinin bozuk yapısı ile seyreden periferik duyarsızlık ile seyreden MODY (maturity onset diabet of youngs) alttıplerinde de katlanma bozukluklarını göstermektedir.

Proinsülin meydana geldikten sonra paketlenmek üzere golgi cisimciğine taşınır. Golgi cisimciğinin üzerinde bulunan ZnT5 sayesinde tekrardan çinko girişi gerçekleşir ve

Çinko proinsüline bağlanarak veziküllere sekrete edilmeye hazır hale getirilip veziküllere verilir. Aynı zamanda golgi cisimciği üzerindeki ZnT7 beta hücrelerindeki proinsülin miktarını hücre içi sinyal mekanizmaları ile (Zap1 bağımsız) kontrol eder. ZnT7 aracılı çinko girişi toplam insülin miktarını artırır. Veziküllere verilen proinsülindeki C-peptid, vezikül içerisinde endoproteaz ile uzaklaştırılır. Bundan sonra ise depolanmak üzere çinkoya bağlanarak kristalize olur. Veziküllere inko girişi ise, sadece pankreas adacık hücrelerine özėü olduğu düşünölen ZnT8 tarafından sağlanır.

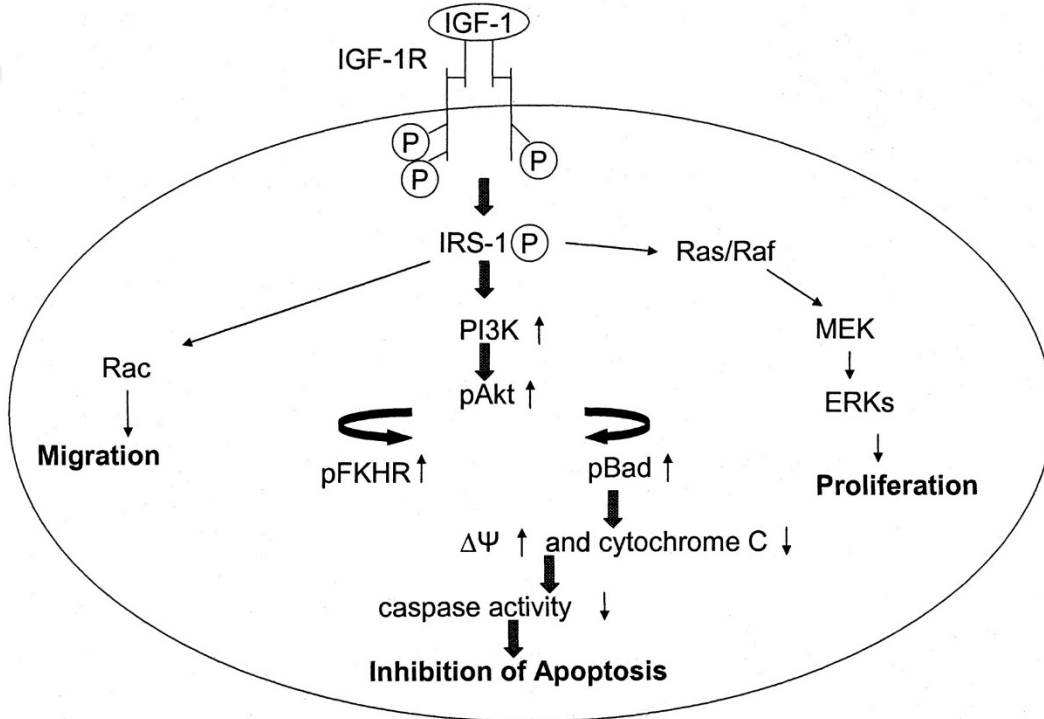
ZnT8, veziküllerde depolama ve sonrasında sekresyon yapılması için olmazsa olmaz bir taşıyıcıdır ve son zamanlarda diyabet için bir biyomarker halini almıştır. Yapılan alışmalarda ZnT8'in bloklanması, beta hücre içi insülin miktarını artırırken sekrete edilen insülinde azalma yaratmıştır (123). Znt8 aracılı kristalize edilen insülinin 6 adedi hegzamer halde depolanır çünkü hegzamer halde bulunan insülin daha stabil ve uzun ömürlüdür.

2.2.2. Znt3'ün Hücre Sağ Kalımındaki Rolü ve İnsülin Direnci

ZnT3 başlıca glutaminerjik nöronlarda vezikül içerisine çinko alınmasını ve glutamat ile sinaptik boşluğa çinko salınmasını sağlar. Sinaptik boşlukta bulunan çinko bağımlı metalloproteinazlar, veziküller ile salınan inkolar tarafından aktive olurlar. Bu metalloproteinazların en büyük görevlerinden birisi pro-BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor)'nin BDNF'ye dönüştürölmesidir. BDNF, nöron gelişiminde, canlılığında ve işlevlerinin sürdürölmesinde önemli rol oynamaktadır (173).

Bunun haricinde beyin, beta adacık hücreleri, adiposit, testiste seminifer tüböl hücreleri gibi birçok hücrede gözlenen ZnT3; temelde apoptozu kontrol eden, hücre sağ kalımında görevli olan ve hücre kitlesinden sorumlu olan bir taşıyıcıdır. ZnT3 knockout farelerde insülin salınımında bozukluklar ve artmış apoptoza bağlı hücre kayıpları meydana geldiği gözlenmiştir. ZnT3 aracılı çinko girişi hem anti-apoptotik Bcl-2 ekspresyonunu artırır hem de oksidan stresi kontrol eder. Aynı zamanda çinko bağımlı çalışan bir reseptör olan IGF-1 reseptörü ZnT lerin işbirliği ile çalışır ve hemen hemen her hücre üzerinde

eksprese edilir. IGF-1 apoptoza karşı hayatta kalma faktörlerinin başında gelir. IGF-1 reseptörünün uyarılması, kaspaz inhibisyonu yapan Akt yolunun fosforillenmesini sağlar. IGF-1 hücre yaşamının devamlılığını, direk olarak kaspaz inhibisyonu üzerinden, indirek olarak ise proapoptotik Bax artışını sağlayan TGF-Beta inhibisyonu üzerinden sağlar (123,124).



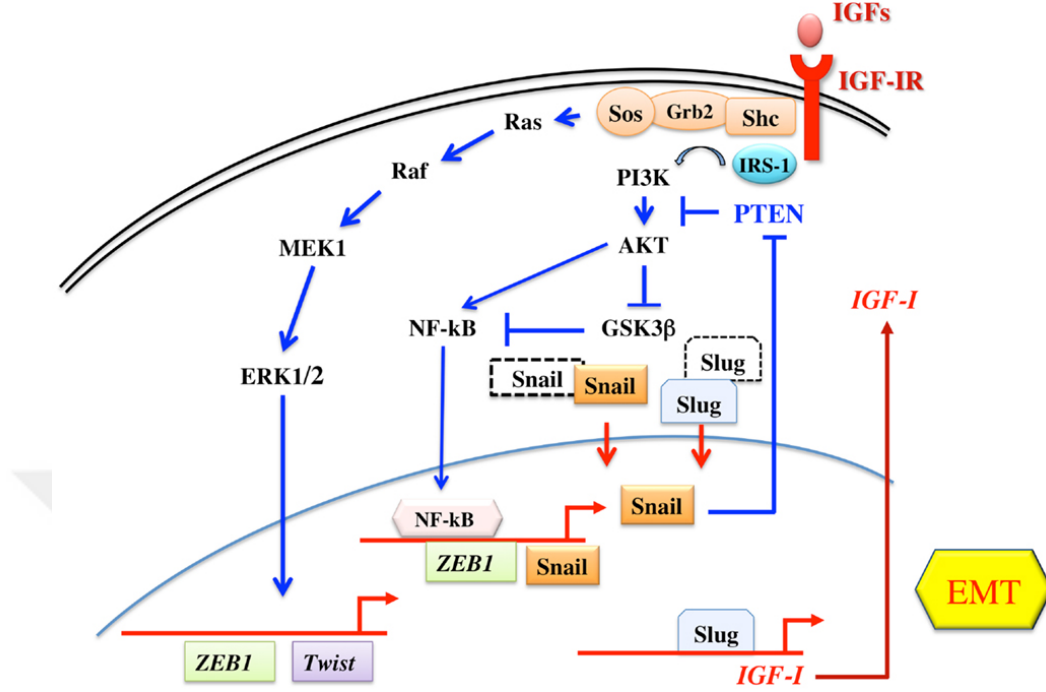
Şekil 8. IGF-1 yolağı

(Patrice Delafontaine, Yao-Hua Song, Yangxin Li. *Expression, Regulation, and Function of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 Binding Proteins in Blood Vessels. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2004;24:435-444*)

Diabet hastalarında hiperglisemiye bağlı gelişen osmotik diürez, idrarla çinko atılımını arttırmakta; ZnT3 ve ona bağlı çalışan hücre içi ve hücre yüzeyi düzenleyiciler bozulmaktadır. Aynı zamanda çinko eksikliği insülin direncini tetiklemekte, GLUT4 sentezini bozmakta ve insüline bağımlı enerji metabolizmasını kötü yönde etkilemektedir.

Bunların hepsi birçok dokuda hücre kaybını tetiklemekte ve sağ kalım üzerinde olumsuz olarak birçok rol oynamaktadır.

ZnT-3 bağımlı çinko inhibisyonu altında çalışan ve aktivasyonu için hücre içi çinkonun kritik düzenlenmesini gerektiren glukojen sentaz kinaz-3 betanın da klinik önemi oldukça büyüktür. Glukojen sentaz kinaz-3 beta (GSK-3 β), bir serin/treonin protein kinaz olup glukojen sentaz enzimini fosforilleyerek inaktive eder. Ek olarak GLUT-4 ekspresyonunu, IRS-1 ekspresyonunu ve beraberinde PI3K/AKT/mTOR aktivasyonunu baskılayarak insülinin post-reseptör yolağını bozar (125,126). Kısacası bir insülin direnci yaratır ve insülinin anabolizan ve sağ kalım fonksiyonunu ortadan kaldırır. Aşırı arttığı durumlardan bir tanesi olan diyabet ve beraberinde gözlenen çinko eksikliğinde nöronal hücre gelişimi ve sağ kalımında bozukluklar olduğu çalışmalarla gösterilmiştir (127).



Şekil.9 IRS-1 ve PI3K/AKT - GSK-3β ilişkisi

(Malaguarnera Roberta, Belfiore Antonino. *The Emerging Role of Insulin and Insulin-Like Growth Factor Signaling in Cancer Stem Cells. Frontiers in Endocrinology* .2014; vol. 5;p: 10)

Çinkonun ZnT3 üzerinden etki ederek GSK-3β yi inhibe ettiği birçok çalışmada gösterilmiştir (128). GSK-3β 'nin aşırı ekspresyonu çinko eksikliği ile birlikte gözlenen alzheimer hastalığında artmış seviyelerde bulunmuştur. Alzheimer hastalığının patofizyolojik mekanizmalarından birisi olan eksitotoksisite; diyabetik nöropati, diyabetik retionpati ve diyabete bağlı kognitif bozukluklar gibi komplikasyonlarda da gözlenmektedir. Bu nedenle çinko eksikliğinin sık gözleendiği bir hastalık olan diyabette, GSK-3β aşırı ekspresyonunun bu komplikasyonlarda rol alabilmesi olasıdır.

2.3. PI3K/AKT/mTOR Yolağı

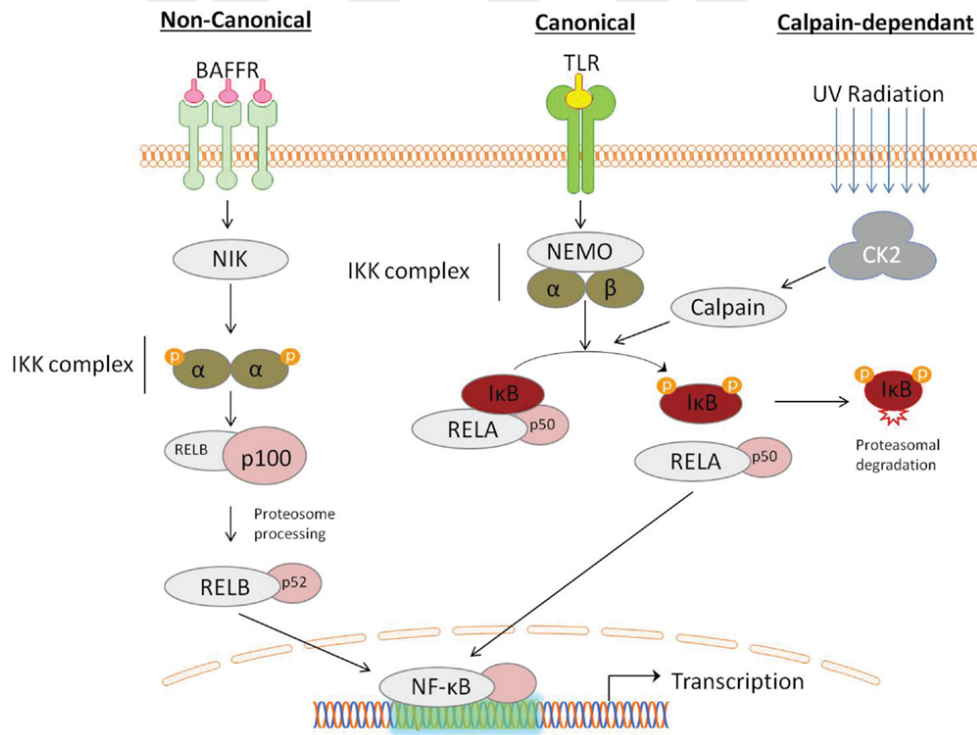
PI3K/Akt/mTOR yolağı, hücre bölünmesini düzenleyen önemli bir hücre içi haberleşme yolağıdır. Bu nedenle direk olarak hücre proliferasyonu, sağ kalım ve kanser ile ilişkilidir. PI3K aktivasyonu sonucu AKT'nin fosforillenerek plazma membranına lokalize olmasını ve aktifleşmesini sağlar. AKT'nin proliferasyon üzerinde bir çok rolü mevcuttur. Bunların başlıcaları; CREB (cAMP response element-binding protein) aktivasyonu, p27 inhibisyonu, FOXO'nun sitoplazmaya lokalizasyonu ve p70 aktivasyonunu sağlayan mTOR aktivasyonudur (129). CREB hücrel bir transkripsiyon faktörüdür. DNA üzerindeki cAMP yanıt bölgelerine bağlanarak hücre proliferasyonunu etkileyen genlerin transkripsiyonlarının aktivasyonunu ya da inhibisyonunu sağlayarak görev yapar. CREB tarafından kontrol edilen transkripsiyonların başlıcaları : c-fos, BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor), tirozin hidroksilaz ve bir çok nöropeptid'dir (130). CREB'in nöronal plastisite, öğrenme ve bellek oluşumu üzerinde kanıtlanmış önemli rolleri bulunmaktadır. (131) CREB seviyelerinde azalmanın Alzheimer hastalığının gelişiminde rolü bilinmektedir ve CREB seviyelerini arttırmak tedavi protokollerinden bir tanesidir. p27 ise Rb (retinablastoma) geninin aktivasyonunu engelleyerek hücre bölünmesini G1 seviyesinde durdurmakta, yani hücre proliferasyonu inhibe etmektedir. mTOR aktivasyonu ise hücre proliferasyonunun uyarılmasında anahtar rolü üstlenmektedir. PI3K/Akt/mTOR yolağını aktive ettiği bilinen faktörlerin başında EGF, IGF-1 ve insülin gelmektedir (132,133). Bu yolak, özellikle nöral hücrelerde proliferasyonu ve büyümeyi artırırken, stabilizasyonu ve farklılaşmayı azaltmaktadır. Sağlıklı bir nöral hücre büyüme ve farklılaşması için Akt aktivasyonu ve inhibisyonun denge halinde bulunması gereklidir (132,133).

Akt aynı zamanda pro-apoptotik genlerin inhibisyonu ile proliferasyonu kontrol eder. Bu inhibisyon 2 yoldan sağlanır.

İlk yol FOXO, IκB ve GSK-3β'nın inhibisyonunu ile ilgili olan indirekt inhibisyonudur. FOXO (Forkhead family transcription factors), defosforile haldeyken çekirdeğe girerek p27 ve diğer pro-apoptotik genlerin transkripsiyonlarını artırır (134).

Akt, FOXO'yu fosforile ederek FOXO'nun sitoplazmaya lokalize olmasını sağlar yani çekirdeğe girmesini önler.

I κ B, hücrede hayatta kalma ve proliferasyonun düzenleyicilerinin en önemlilerinden Nf- κ B (Nuclear factor kappa B)'nin temel inhibitörüdür. I κ B, RelA'ya bağlanarak RelA'nın çekirdeğe lokalizasyonunu ve Nf- κ B'nin sentezini engeller. I κ B kinazlar (IKK) ise I κ B'yi fosforile ederek yıkımını sağlar, Nf- κ B'nin sentezini artırır. Akt aktivasyonu ise IKK α 'nın aktivasyonu sağlayarak Nf- κ B sentezinde bir artışa sebep olur. Nf- κ B ise apoptozda başlatıcı etki yaratan kaspaz ailesinin ve pro-apoptotik bir gen olan Bcl-XL'nin inhibisyonu yapar (135).



Şekil 10. IKK ve NF- κ B ilişkisi

(Godwin Peter et al. Targeting Nuclear Factor-Kappa B to Overcome Resistance to Chemotherapy . *Frontiers in Oncology* . 2013; vol. 3; p: 120)

GSK-3 β ise p53 başta olmak üzere bir çok pro-apoptotik genlerin aktivasyonunu sağlayarak apoptozu tetiklemektedir ve Akt tarafından inhibitörük kontrol altındadır. GSK-3 β ve Akt ile ilişkisi ayrı bir başlık olarak verilmiştir.

Akt'nin pro-apoptotik gen inhibisyonunda ikinci yol ise direk yoldur. Akt, Bcl-2 ailesine ait BAD gibi pro-apoptotik genleri direk olarak fosforile ederek onların inhibisyonuna sebep olur (136).

2.4. Nöral Hücrelerin Glukoza Yanıtı ve Proliferasyon

Beyinde bulunan nöronal kök hücreler, yenilenme ve proliferasyon ile sessiz kalma ve farklılaşma arasındaki dengeyi iyi kurmak zorundadır. P3IK/Akt sinyalizasyonu bu dengenin sağlanmasında büyük rol alır. Nöronal hücreler, sistemik değişiklikleri algılamada son derecede başarılıdır. Kan glukoz seviyeleri arttığında sentezi artan insülin ve IGF-1, PI3K/Akt sistemini aktive eder. Aktiflenen Akt; mTOR aktivasyonu, Rb aktivasyonu, FOXO'nun fosforilasyonu ve sitoplazmaya lokalizasyonu ile proliferasyonu sağlar (134). Öte yandan glukoz seviyeleri az olduğunda PI3K/Akt yolağının aktivasyonu azalır. Böylelikle FOXO'nun sitoplazmadaki lokalizasyonu kaybolur ve çekirdeğe girerek p27 ve p21 gibi tümör süpresör genlerin aktivasyonunu sağlar, hücre G1 fazında askıda kalır. G1 fazında kalma, hücrelerin farklılaşması için bir uyarıcıdır ancak buradaki temel mekanizmalar tam bilinmemektedir. (134).

2.5. Glukojen Sentaz Kinaz 3 Beta

Glukojen sentaz kinaz 3 beta (GSK-3 β), hedefindeki proteinin serin ve treonin aminoasitlerine fosfat bağlayarak görev yapan bir serin/treonin protein kinazdır. İlk keşfedilen fonksiyonu glukojen sentazı fosforilleyerek onu inaktive etmesidir (137). Bundan sonra yaklaşık 40 protein üzerinde etkisi kanıtlanmıştır.

GSK-3 β glukojen sentezini baskılamasının yanı sıra bir çok basamakta glukoz homeostazını kontrol eder. Bu basamaklardan başlıcaları IRS1'in, fosfoenolpiruvat karboksilaz ve glukoz 6-fosfatın fosforillenmesidir (137).

GSK-3 β aynı zamanda hücre proliferasyonu, apoptozu ve sağ kalımı ile ilişkili genlerle yakın ilişki içerisinde. Örneğin, GSK-3 β , Beta-katenini fosforile ederek yıkımını sağlar (138). Beta katenin hücre proliferasyonunu sağlayan Wnt yolağının en önemli ara sinyal moleküllerindedir. Bu yüzden GSK-3 β da Wnt yolağında önemli bir regülatör olarak görülmektedir. Aynı zamanda GSK-3 β apoptozu düzenleyen bir çok genin transkripsiyonunu sağlamaktadır. Bu genlerin başında p53 ve Bax gelmektedir (139).

Pro-apoptotik genlerin aktivasyonu ile birlikte hücre sağ kalımı düzenleyici genlerde de bir inhibisyon yaratan GSK-3 β 'nin henüz tüm etki mekanizmaları bilinmemektedir. Örneğin bazı çalışmalar, aşırı GSK-3 β ekspresyonunun apoptozda artışla sonuçlandığını gösterirken, daha az sayıdaki çalışmalar $\alpha\beta$ knockout farelerin embriyonik dönemde aşırı apoptozla bağlı ölümlerini göstermektedir (140). Bununla birlikte apoptozu tetiklediği ve hücre sağ kalımını kötü yönde etkilediğini gösteren çalışmalar sayıca üstündür. GSK-3 β , IRS-1 bağımlı yolda negatif kontrol sağladığı için, GSK-3 β 'nin aşırı aktivasyonu insülinin etkilerine karşı direnç geliştirmektedir. Öte yandan tip 2 diyabette gözlenen insülin direncinin, GSK-3 β seviyelerinde yapılan inhibisyon ile azaldığı gözlenmiştir (141).

GSK-3 β 'nin aktivitesinin düzenlenmesi bir çok faktöre bağlıdır. GSK-3 β 'nin serin-9 ve serin-21 rezidüleri üzerinden fosforillenmesi aktivitesini azaltırken, tirozin-216 ve tirozin-279 rezidüleri üzerinden fosforillenmesi etkisini arttırmaktadır (142). Hücre içerisindeki bu 2 uçlu düzenlenmesi, hücrenin mitotik indeksine bağlıdır. Örneğin, Beta kateninin GSK-3 β tarafından fosforillenmesi, Axin aracılı olmaktadır. Axin, beta-kateninin aktif bölgeleri ile GSK-3 β etkileşimi sağlarken, hücreye gelen bir proliferasyon sinyali, axin'i stabilize ederek GSK-3 β 'nin aktivasyonunu engeller. Wnt'nin kanonikal yolunda GSK-3 β 'nin kontrolü başlıca Axin-Beta-katenin geri-bildiriminden sağlanır (142).

Öte yandan insülin, IGF-1 ya da EGF gibi faktörler tarafından IRS-1'in aktive edilmesi sonucu oluşan Akt, yukarıda bahsedildiği gibi IRS bağımlı yolda GSK-3 β 'yi inhibe eden en önemli moleküldür.

Bazı çalışmalarda ketaminin de GSK-3 β 'yi inhibe ettiği gözlenmiştir (143). Ketamin, NMDA reseptörleri üzerinden etki eden bir glutamat antagonistidir ve daha önce bahsedildiği gibi eksitotoksistelerde rol alan temel reseptördür. Buna paralel olarak, yapılan başka çalışmalarda, patofizyolojisinde eksitotoksistenin yer aldığı hastalıklarda GSK-3 β 'nin seviyelerine bakılmış ve olası rolü incelenmiştir. Sonuç olarak Alzheimer hastalığı, depresyon, iskemik ve hemorajik inmeler, diabetik retinopati gibi hastalıklarda GSK-3 β 'nin seviyelerinde artış gözlenmiştir. Alzheimer hastalığının erken dönemlerinde tedavi edici rolü olup olmadığı araştırılmaktadır (144).

2.6. Metforminin Etkisi ve Etki Mekanizması

Metformin, biguanidler grubunda yer alan ve pre-diayabet ile Tip 2 diyabetin ilk basamak tedavisinde uzun yıllardır kullanılan bir ilaçtır. Temel etki mekanması karaciğer tarafından üretilen glukozu (9) ve insülin direncini azaltmaktır(10).

Metformin kan şekerini esas olarak karaciğer glukoz üretimini durdurarak düşürür. Tip 2 diyabet hastasında normal bir insana göre 3 kat daha hızlı glukoneogenez gözlenir, metformin tedavisi ise bunu 1/3 oranında azaltır (145). Hepatik glukoz üretimine ek olarak metformin periferik insülin direncini de azaltmakta, periferik dokularda glukoz alınımını arttırmaktadır. Metformin uygulanımı sonucunda GLUT4 enhancer faktörün fosforilasyonu artmakta ve dokulara GLUT4 aracılı glukoz girişinde bir artış olmaktadır (146). Metformin aynı zamanda yağ asidi oksidasyonunu arttırmakta, gastrointestinal kanaldan glukoz emilimini azaltmaktadır (147).

Metforminin moleküler mekanizmalar tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Metforminin etkisini gösteren bir çok mekanizma ileri sürülmüştür. Bunların arasında en çok kabul görenler; 1. AMP-bağımlı protein kinaz (AMPK) aktivasyonu, 2. protein kinaz A (PKA)'nın aktivasyonu sonucu yüksek glukagon seviyelerinin arttırdığı siklik AMP (cAMP)'nin azalması, 3. mitokondriyal gliserofosfat dehidrogenaz inhibisyonudur (148).

Metforminin karaciğer glukoz üretimini baskılayabilmesi için AMPK'yı aktive etmesi şarttır (148). AMPK insülin sinyalizasyonunda, vücut enerji dengesinin devam ettirilmesinde, glukoz ve yağların metabolizmasının kontrolünde son derece önemli bir

enzimdir. AMPK aktivasyonu sonucu hepatik glukoneogenetik genlerden fosfoenolpiruvat karboksilaz ve glukoz-6-fosfataz inhibe olur (149). Fakat metforminin hangi mekanizmalar aracılığıyla AMPK aktivasyonunda artış yarattığı henüz bilinmemektedir.

AMPK aynı zamanda periferik insülin duyarlılığını da arttırmaktadır. Metformin verilmesi ile iskelet kasında AMPK aktivasyonunda artış olduğu gösterilmiştir (150). AMPK aktivasyonu aynı zamanda periferik dokularda GLUT4 taşıyıcılarının hücre membranına göçüne de sebep olmaktadır. Buradaki mekanizma TBC1D1'nin fosforilasyonu sonucu Rab-GTPaz aktive olmasına bağlıdır ve bu enzim çinko bağımlı bir enzimdir. Çinko eksikliğinde periferik dokularda hücre yüzeyine GLUT4 ekspresyonunda bir azalma meydana gelir (151).

Metforminin aynı zamanda hücre proliferasyonu ve sağ kalımı üzerinde hem AMPK bağımlı hem de AMPK bağımsız etkileri mevcuttur. Yapılan çalışmalarda metforminin fizyolojik dozlarda kullanımı sonucu, diyabet hastalarında artan pankreatik beta hücrelerinde gözlenen harabiyeti ve kaybı azalttığı gösterilmiştir (13). Bununla birlikte bir çok nöroprotektif etkisi ve nöronal sağ kalımı gösteren çalışmalar da mevcuttur. Metforminin post-iskemik hasarı hafiflettiği (14), iskemi esnasında nöroprotektif etki sağladığı (15), iskemik hasardan sonra iyileşme sürecini hızlandırdığı (16), Alzheimer hastalığında B-amiloid plak oluşumunu geriletmediği (17) gösterilmiştir.

Metforminin nöroprotektif etkisi ve hücre sağ kalımına olan yararının tam mekanizması temelde 2 mekanizma ile açıklanabilir. Metformine bağlı AMPK artışı, apoptozun ve kaybın arttığı hücrelerde Akt aktivasyonunu arttırarak hücrenin sağ kalımı üzerine olumlu etki yaratmaktadır. Aynı zamanda kalp hücrelerinde AMPK'dan bağımsız olarak, MAPK aracılı koruyucu etki yarattığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (152).

Metforminin Akt üzerindeki rolü henüz net değildir. Bazı çalışmalarda hücre harabiyeti sonucu sağ kalımı arttırdığı gösterilen metforminin, öte yandan artmış proliferasyon ve azalmış apoptoz ile seyreden kanser hücrelerinde ters etki yarattığı gösterilmiştir. Metforminin bu etkisi dokular arası da farklılık göstermektedir. Örneğin

metforminin endometriyal stromal hücrelerde (153), pankreatik beta hücrelerinde (13) Akt aktivasyonunu arttırdığını gösteren çalışmaların yanı sıra, hepatositlerde ve bağırsak hücrelerinde Akt'nin fosforilasyonuna bağlı olarak aktivasyonunu azalttığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (153). Nöronlar üzerindeki etkisini araştıran her hangi bir çalışma bulunmamaktadır.

2.7. S100 Kalsiyum Bağlayıcı Protein β

S100 Kalsiyum Bağlayıcı Protein ya da diğer adıyla S100- β , S100 protein ailesinin bir üyesi olup, bütün S100 proteinleri gibi bir çok hücrenin sitoplazma ve çekirdeğinde yaygın olarak bulunurlar. S100 protein ailesinin üyelerinin hücre farklılaşması, büyüme siklusunun düzenlenmesi ve devamlılığı gibi görevleri bulunmaktadır.

S100 protein ailesinden olan S100- β ise merkezi sinir sisteminde glial hücrelerden, özellikle endotelial komşuluğa sahip ve matürasyonunu tamamlamış astrositlerden sekrete edilmektedir (154).

S100- β , santral sinir sisteminde bir çok göreve sahiptir; nöritlerin uzaması, hücre içerisine Ca^{+2} girişini arttırarak nöronalmatürasyonun düzenlenmesi, astrositer ve aksonal proliferasyonun sağlanması, PKC bağımlı fosforilasyonun inhibitörük kontrolü gibi. S100- β , gelişmekte olan santral sinir sisteminde bir nörotrofik faktör gibi görev yaparken, erişkin hücrelerde özellikle PKC bağımlı fosforilasyonun kontrollü bir şekilde devamlılığını sağlamaktadır. S100- β nın kontrol ettiği PKC bağımlı fosforilasyon, santral sinir sistemin glial ve nöronal proliferasyonun hücre içi haberleşme sisteminde önemli bir rol oynamakta olup artmış PKC aktivitesinin santral sinir sistemi tümörleri (155), bipolar hastalık (156), alzheimer, epilepsi ve ALS ile ilişkisi bulunmuştur (155).

2.7.1. S100- β 'nın Tanısal Kullanımı

Fizyolojik koşullarda astrositler içerisinde sentezlenen S100- β , nöronal hasar sonucunda hücrelerin içerisinden ekstraselüler matrikse ve kan beyin bariyeri hasarı varlığında kan dolaşımına sızdığı bilinmektedir. Bu nedenle kan S100- β seviyelerinin

ölçümü son 10 yıldır santral sinir sistemi ve kan beyin bariyeri hasarlarında tanı ve takip amacıyla kullanılmaktadır. Periferik kanda S100- β düzeylerinin ölçümü; eksitotoksisite ile seyreden santral sinir sistemi iskemileri, travmaları ve epilepside makroskopik değişiklikler henüz meydana gelmeden moleküler düzeyde hasarı gösterebilen değerli bir parametredir (157).

Bununla birlikte periferik kandaki S100- β seviyelerinde artışın tek nedeni hücrel hasara bağlı hücreden dışarı sızma olmadığı, aynı zamanda S100- β 'nin ekspresyonunun hasar sonrasında arttığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (158). Santral sinir sistemindeki hasar sonrasında ekspresyonu artan S100- β 'nin, bFGF-FGF Reseptörü kompleksinin hücre içerisindeki etkisini artırarak nöronal ve glial rejenerasyon ve sağ kalımı olumlu yönde etkilediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (159). Bu bilgiler ışığında S100- β 'nin nörodejenerasyon sonrası ekspresyonundaki artışın, hasar sonrası rejenerasyon derecesi ile koreledir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

Optik Okuyucu	: Biotek Hybrid Reader (Freidrichshall, Almanya)
Qubit analizör	: Invitrogen(Carlsbad, CA, ABD)
ELISA Yıkama	: Biotek Instruments (Winooski, ABD)
Santrifüj	: Sigma 3-18K (Harz, Almanya)
Hassas Terazi	: Kern und Sohn GmbH (Balingen, Almanya)
Hassas Terazi	: Radwag (Radom, Poland)
pH metre	: Ohaus Starter 3100 (New Jersey, ABD)
Homojenizatör	: Next Advance (New York, ABD)
Girdap karıştırıcı	: Elektro-mag (İstanbul, Türkiye)
Sıcak su banyosu	: Lab Companion (Palm Bay, ABD)
Derin dondurucu	: Elcold Lab 85 (Hobro, Danimarka)
Işık mikroskobu	: Olympus BX51 (Japonya)
ICP-OES	: Thermo ICAP-6000 (Massachusetts, ABD)
IHC Boyayıcı	: Leica Bond Max (Newcastle, Birleşik Krallık)

3.2. Yöntemler

Proje için İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nden 35980450-050.99 sayı numarası ile etik kurul onayı alındı. 6-8 haftalık Sprague Dawley ırkı, 40 erkek sıçan (ortalama ağırlıkları 300 ± 50 gr) çalışmaya dahil edildi. Deney süresince 20-22 °C oda sıcaklığında, %55- 60 nem içeren ortamda ve 12 saat gün ışığı/ 12 saat karanlık çevriminde standart ve çinkosu düşük pelet yem içeren beslenme ve yaşam koşulları sağlandı. Standart pelet yemin çinko içeriği 85mg/kg; besinsel içeriği %20 protein, %6 sellüloz, %2 yağ; metabolize edilebilir enerji değeri 2600 kcal/kg'dır. Çinkosu düşük yem MBD Yem Ticareti (Gebze/Türkiye) firmasında,

"Altromin C 1040 Çinko eksikliği diyeti" formülüne bağlı kalarak özel olarak üretilmiş olup çinko içeriği 4mg/kg olup diğer içerikleri standart yem ile aynıdır. Sıçanların tesadüfi şekilde seçilmesiyle oluşturulan deney ve kontrol grupları şu şekilde özetlenmektedir:

1. Kontrol grubu (K)

Standart pellet yemi ile beslenmiştir, 35. günde 2.5 ml serum fizyolojik intraperitoneal olarak injekte edilmiştir.

2. Glutamat grubu (G)

Standart pellet yemi ile beslenmiş ve her gün, tek doz 3 ml hacminde serum fizyolojik gavaj ile verilmiştir. 35. günde 4mg/kg D-glutamik asit 2.5 ml serum fizyolojik içerisinde çözdürülerek intraperitoneal olarak injekte edilmiştir.

3. Metformin + Glutamat grubu (MG)

Standart pellet yemi ile beslenmiş ve her gün, tek doz 100 mg/kg metformin 3 ml hacminde gavaj ile verilmiştir. 35. günde 4 mg/kg D-glutamik asit 2.5 ml serum fizyolojik içerisinde çözdürülerek intraperitoneal olarak injekte edilmiştir.

4. Çinko eksikliği + Glutamat grubu (ÇG)

Çinko eksikliği yaratmak için Altromin firmasının çinkodan fakir diyet (C1040) deskripsiyonuna göre hazırlanmış pellet yem (5mg/kg çinko içeren) ile beslenmiş ve her gün, tek doz 3 ml hacminde serum fizyolojik gavaj ile verilmiştir. 35. günde 4mg/kg D-glutamik asit 2.5 ml serum fizyolojik içerisinde çözdürülerek intraperitoneal olarak injekte edilmiştir.

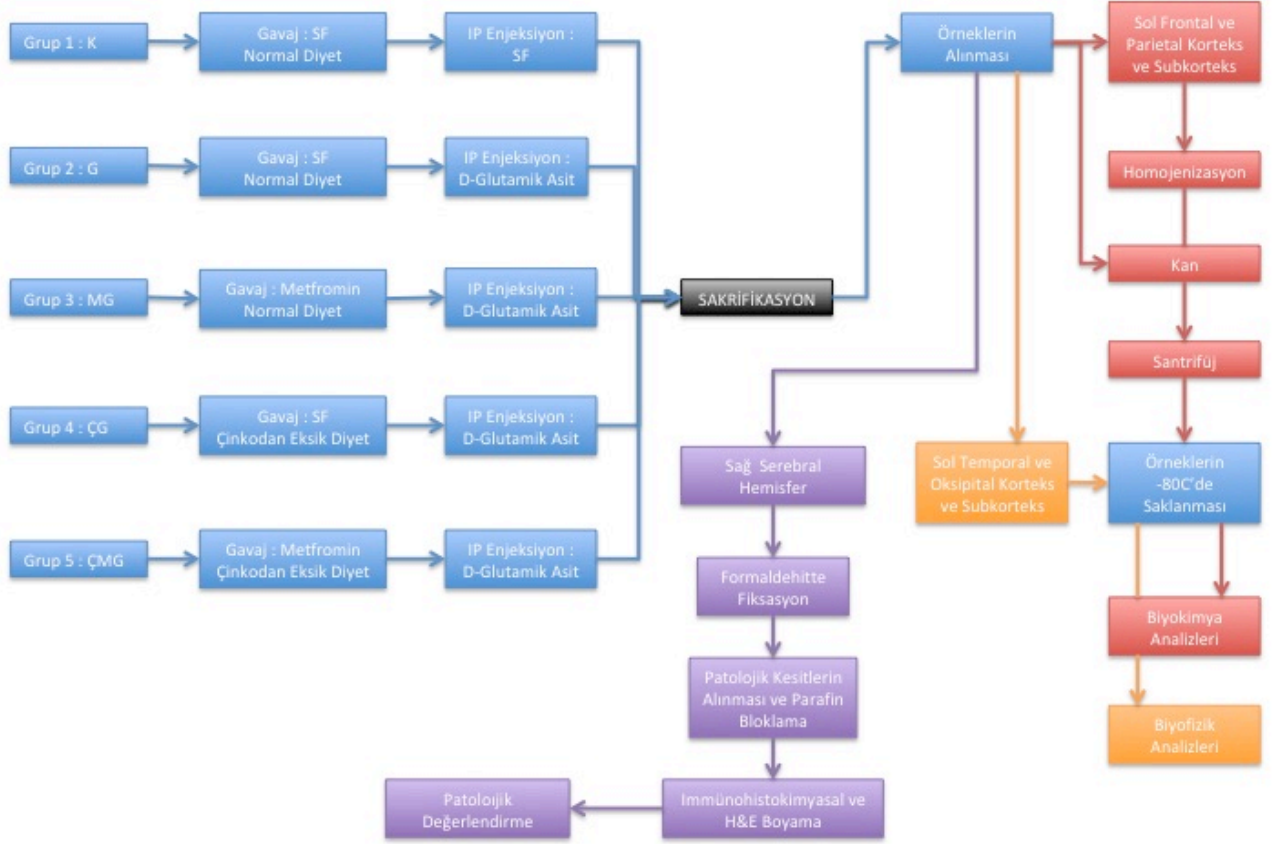
5. Çinko eksikliği + Metformin + Glutamat grubu (ÇMG)

Çinko eksikliği yaratmak için Altromin firmasının çinkodan fakir diyet (C1040) deskripsiyonuna göre hazırlanmış pellet yem (5mg/kg çinko içeren) ile beslenmiş ve her gün, tek doz 100 mg/kg metformin 3 ml hacminde gavaj ile verilmiştir. 35. günde 4 mg/kg D-glutamik asit 2.5 ml serum fizyolojik içerisinde çözdürülerek intraperitoneal olarak injekte edilmiştir.



Şekil 11 . Çalışmaya ait deney grupları

Çalışmamıza ait deney gruplarında uygulanan yöntemsel süreçleri Şekil 2'de özetlenmiştir.



Şekil 12. Çalışmada uygulanan yöntemsel süreçler

Çalışmamızda araştırılan patolojik, biyokimyasal ve biyofiziksel parametreler Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. Çalışmada incelenen parametreler

Belirteçlerin tipi	Parametre
Nörodejenerasyonun derecesi	GSK-3 β (ELISA yöntemi ile) (Serum ve Homojenat) Hematoksilen Eozin Boyama Sonrası Işık Mikroskobu Altında İntakt Nöronların Kantitatif Sayımı
Çinko seviyelerinin belirlenmesi (Serum ve Doku)	Çinko Düzeyleri (ppm)
Protein oksidasyon belirteçleri (Serum ve Homojenat)	İleri oksidasyon protein ürünleri (AOPP) Protein bağlı ileri glikasyon son ürünleri (prAGEs)
Lipid peroksidasyon belirteçleri (Serum ve Homojenat)	Lipid hidroperoksidleri (L-OOHs) Malondialdehid (MDA)
Rejenerasyonun derecesi	S100 Kalsiyum Bağlayıcı Protein Beta (S100- β) (İmmunohistokimyasal)
Antioksidan sistem belirteçleri (Serum ve Homojenat)	Cu-Zn süperoksit dismutaz (Cu-Zn SOD) Katalaz

3.2.1. Gavaj

Sıçanlara 35 gün boyunca her gün saat 9:00-10:00 aralığında 18 gauge'lık metal besleme sondası ile gavaj yapıldı. MG ve ÇMG gruplarına gavaj ile 100mg/kg dozundaki metformin 3ml hacminde verildi. Verilen metforminin doz seçimi, metforminin sıçanlardaki farmakokinetiği ve oral biyoyararlanımı göz önünde bulundurularak yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda sıçanlarda metforminin bağırsak ve hepatic ilk geçiş etkisi hesaplandıktan sonra oral biyoyararlanımı %29.9 olarak belirtilmektedir (160). Bu durum göz önüne alındığında, çalışmamızda vermeyi planladığımız 100mg/kg dozun insanlarda Food and Drug Administration (FDA)'ın belirttiği maksimum günlük dozun üst sınırı olarak kabul edilen 2500mg/gün'e yakın olmasından kaynaklanmıştır. 35 günlük uygulama süresi belirlenirken, metforminin nöroprotektif etkisinin en kısa süreyle 21-35 gün arasında ortaya çıktığını gösteren çalışmalar göz önünde bulundurulmuştur (161,162).

Gavajın sıçanlar üzerinde yarattığı stresin çalışmamızın sonuçlarını etkilememesi için diğer gruplara (K,G,ÇG) gavaj ile 3ml serum fizyolojik verildi.

3.2.2. İntraperitoneal Enjeksiyon

Sıçanlara 35. gün alt abdominal dış kadrandan intraperitoneal enjeksiyon yapıldı. G, MG, ÇG ve ÇMG grubundaki sıçanlara 4mg/kg D-glutamik asit (toz) 2.5 ml izotonik serum fizyolojik içerisinde çözdürüldükten sonra intraperitoneal olarak enjekte edildi. Glutamata bağlı nörotoksisite yaratmak amacıyla D-glutamik asitin kullanılma nedeni, D-glutamik asitin sıçanlarda deamine olamaması ve kan beyin bariyerinden geçebilmesi olmuştur. D-glutamik asidin intraperitoneal uygulama dozu belirlenirken, literatürde söz konusu dozun konvülsiyon yaratan fakat mortalite riski minimum kabul edilen doz olması göz önünde bulunduruldu (163).

İntraperitoneal enjeksiyonun sıçanlar üzerinde yarattığı stresin çalışmamızın sonuçlarını etkilememesi için kontrol grubuna da intraperitoneal enjeksiyon ile 2.5ml serum fizyolojik verildi.

3.2.3. Kan ve Doku Örneklerinin Alınması

Sıçanlara intraperitoneal olarak ketamin/ksilazin (50mg/kg / 10 mg/kg) anestezi kombinasyonu uygulandı ve intrakardiyak kan alınarak oluşturulan hipovolemiye bağlı olarak sakrifikasyon gerçekleştirildi. Kan örnekleri 10 dakika + 4 °C’de santrifüj edilerek serum elde edildi. Post-mortem sıçanlardan soğuk zincire dikkat edilerek serebrum çıkartıldı. Çıkartılan serebrum 2 hemisfere ayrıldı. Sağ hemisfer tartılarak %10'luk tamponlanmış formalin içerisinde fikse edildi. Sol hemisferin frontal ve pariyetal ile temporal ve oksipital kortikal ve subkortikal dokuları ayrıldı ve tartıldı. Temporal ve oksipital kortikal ve subkortikal dokular ependorflara alınarak -80°C’de saklandı. Frontal ve pariyetal kortikal ve subkortikal örnekler fosfat tamponu (pH 7,4) kullanılarak buz kalıpları içerisinde cam homojenizatör yardımı ile %20’lik doku homojenatları haline getirildi. Doku homojenatları daha önceden etiketlenmiş tüplere alındı ve 5000 g’de +40°C’ de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar ependorflara bölünerek çalışma anına kadar -80°C’ de derin dondurucuda saklandı.

3.2.4. GSK-3 β Seviyelerinin ELISA Yöntemi ile Ölçümü

GSK-3 β ELISA kiti Aviva Systems Biology'den temin edildi (MA, ABD). GSK-3 β ELISA kiti, biyotinlenmiş GSK-3 β antikoru ve Avidin-HRP konjugatı kullanan, enzim immünoassay yöntemi esasına göre çalışmaktadır. Analiz edilen süpernatant önceden anti-GSK-3 β kaplanmış platelere eklenerek 37°C'de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresinin ardından kuyular boşaltıldı ve biyotinlenmiş GSK3-Beta detektör antikoru eklendi. 37°C'de 1 saat inkübe edildikten sonra 3 kere yıkandı. Daha sonra kuyular boşaltılarak, Avidin-HRP konjugatı ile 37°C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kuyular 5 kere yıkandı. Sonrasında kuyulara TMB substratı eklenerek 15 dakika daha inkübe edildi. Enzim substrat reaksiyonu mavi renkli bir ürün meydana getirdi. Son olarak, reaksiyonu durdurmak için eklenen stop solüsyonu ile mavi renkli ürünün rengi sarıya döndü. Renkli ürünün optik dansitesi optik okuyucuda 540 nm'de spektrofometrik olarak ölçüldü. Her örneğin GSK-3 β konsantrasyonu, standart eğriden hesaplandı.

3.2.5. Çinko Seviyelerinin Ölçümü

Asitte çözdürülmüş dokular ve serumdaki çinko seviyeleri Thermo marka ICAP 600 serisi indüktif eşleşmiş plazma optik emisyon spektrofotometresinde (ICP-OES) 206 nanometre dalga boyunda ölçüldü.

3.2.6. Patolojik İncelemeler

3.2.6.1. Histopatoloji

Tüm beyin dokuları 24 saat 20 mL %10 formalinde fiske edildikten sonra makroskopik olarak frontal korteks ve subkortikal dokular ile temporal korteks ve subkortikal dokuları içerecek şekilde kesitler alındı. Kesitler makroskopik olarak kasetlere alındı, sonra kapalı sistem doku takip cihazında alkol, aseton, ksilen, parafin

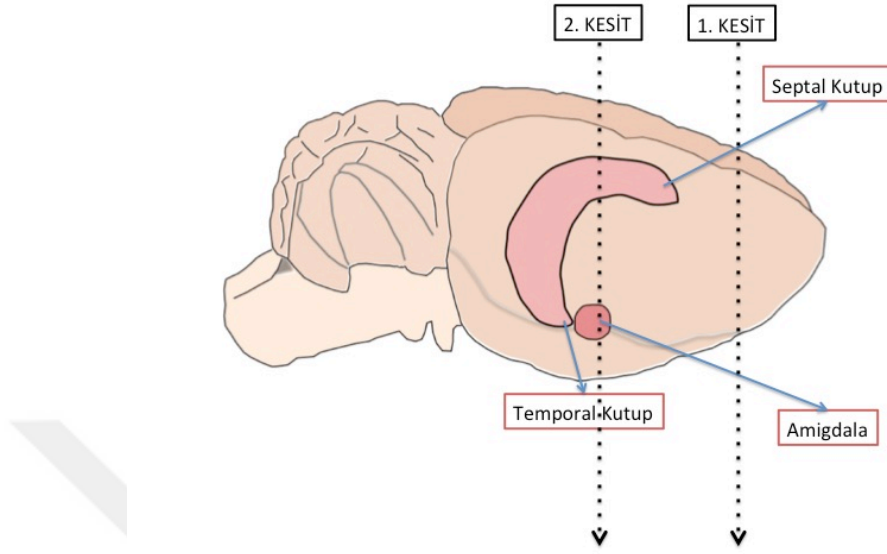
aşamalarından geçerek dehidrate edildi. Ardından parafin bloklama yapıldı. 4µm'lik kesitler alınarak her bloğa hematoksilin-eozin (H&E) boyama uygulandı. Boyalı lamlara kapamasolüsyonu damlatılıp, lamelle kapatıldı. H&E değerlendirilmesindejenere hücre oranı herhangi bir düzeyde kortikal ve subkortikal alanda üçer alanda x40 ve x100 objektifler kullanılarak Image Pro Plus 7 (Media Cybernetics, MD, ABD) programı kullanılarak belirlendi.

3.2.6.2. İmmünohistokimya

Parafin bloklardan elde edilen 4 µm'lik kesitler önceden poly-L- Lysin ile kaplanmış lamlara alındı. Kesitler bir gece 56 C°'lık ısıda etüvde bekletildi. İmmünohistokimyasal boyama için kullanılacak S100-β antikorunun EP32 klonu Cell Marque (CA,ABD) firmasından, sekonder Bond Polymer Refine DAB kiti ise Leica (Newcastle, Birleşik Krallık) firmasından temin edildi. 1:400 'lük dilusyonda s100 β immünohistokimyasal boya Leica Bond Max IHC Stainer cihazında 32 dakika inkübe edilerek boyama tamamlandı.

İncelemede Olympus BX51 ışık mikroskobu kullanıldı.

İmmünohistokimyasal olarak uygulanan S100-β değerlendirilmesinde herhangi bir düzeydeki nükleer boyanma immünreaktif olarak değerlendirildi. Kortikal ve subkortikal alanda üçer alanda immünreaktivitenin olduğu hücreler x40 ve x100 objektifler kullanılarak belirlendi. Daha sonra x400 objektif kullanılarak toplam 100 hücredeki pozitif nükleer reaksiyon veren hücreler saptandı ve 100 hücrede pozitif boyanmış hücre sayısı olarak belirlendi.

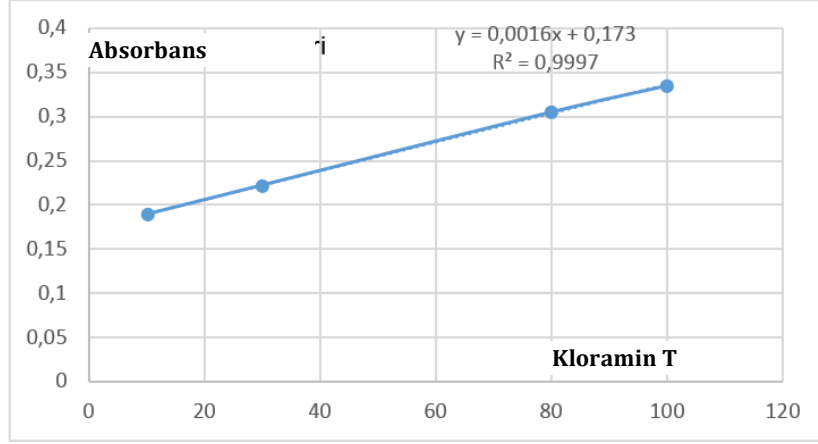


Şekil 13. Makroskopik ince kesitler alınan bölgeler

3.7.2. Biyokimyasal Kolorimetrik Analitik Yöntemler

3.2.7.1. İleri oksidasyon protein ürünleri

AOPP düzeylerinin analizi, Hanasand ve arkadaşlarının spektrofotometrik yönteminde (167) modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirildi. 5 µL örnek ve 200 µL sitrik asit (20 mmol/L) bir mikropalak içinde karıştırıldı. Ardından, 5 µL 1,16 M potasyum iyodür mikropalak kuyucuklarına eklendi ve reaksiyon karışımının absorbanı bir dakikalık inkübasyonun sonunda 340 nm'de reaktif körüne karşı okundu. Kontrolsüz olarak ortaya çıkabilen renk değişimlerinin yol açtığı, standart kloramin eğrisinden olası sapmaların önüne geçmek için tüm okumalar potasyum iyodür eklendikten bir dakika sonra yapıldı. Kloramin-T ile hazırlanan standart eğride absorban değerleri 0-100 µmol/litre aralığında lineerite göstermektedir (Şekil 14).AOPP konsantrasyonları, kloramin-T eşdeğeri olarak litrede mikromol olarak ifade edildi.



Şekil 24. Kloramin T standartları

3.2.7.2. Lipid peroksidasyon biyobelirteçlerinin analizi

3.2.7.2.a. Malondialdehid

MDA, tiyobarbitürik asitle (TBA) reaksiyona girerek, 535 nm'de maksimum absorbans veren renkli bir ürün meydana getirmektedir. Lipid peroksidasyonunun etkinliği, mikropalak okuyucuda çalışmaya olanak sağlamak amacıyla üzerinde hacimsel modifikasyonlar yapılan Buege ve Aust'un kolorimetrik yöntemi (169) ile çalışıldı. 125 µL örnek, 375 µL 0.75 % TBA, 250 µL 30% TCA ve ve 100 µL 5 M HCl içerisinde 15 dakika boyunca 95 oC'de kaynatıldı ve soğutuldu. Karışıma 5000 × g'de 5 dakika süreyle santrifüj uygulanması sonucunda elde edilen süpernatantın absorpsiyonu 532 nm'de reaktif körüne karşı okundu. Örneklerdeki MDA konsantrasyonu molar ekstinksiyon katsayısı $\epsilon=31,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kullanılarak hesaplandı ve µmol/mg protein olarak ifade edildi.

3.2.7.2.b. Lipid hidroperoksitler

L-OOH varlığında, asidik ortamdaki ferro (Fe+2) iyonları, ferri (Fe+3) iyonlarına okside olur. Oluşan ferrik iyonlar, ferrik ksilenol oranj FOX2 ile bire bir oranda renkli çözünür bir kompleks (mavi-mor) oluşturur (170). 50 µL hacmindeki örnekler mikrosantrifüj reaksiyon tüplerine alındı. Ardından, üzerine 950 µL FOX2 reaktifi eklenerek karıştırıldı. Örnekler FOX2 reaktifi ile oda sıcaklığındaki 30 dakikalık inkübasyonun sonunda 20 oC 3000 × g'de 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpernatant

fraksiyonunun absorpsiyonu 560 nm’de reaktif körüne karşı okundu. Hesaplamalarda molar ekstinksiyon katsayısı olarak $\epsilon=4.46 \pm 0.23 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ değeri kullanıldı.

3.2.7.3. Proteine bağlı ileri glikasyon son ürünlerinin analizi

Proteine bağlı AGE’lerin analizi spektrofotometrik yöntemle gerçekleştirildi. Floresans interferansının önüne geçmek için örnekler Yanar ve Arkadaşlarının yöntemine göre ön işlem uygulandı (165). Örneklerdeki proteinler buz üstünde 20 dakika boyunca %100’lük TCA ile çöktürüldü. Örneklerin 15 dakika süreyle $5000 \times g$ ’de santrifüjlenmesinin ardından, %100’lük TCA ile pelletler üç kere yıkandı. Sonraki aşamada protein içeren pelletler 6 M guanidin-HCl çözöldü ve floresans değerleri okundu (165). Örneklerin 350 nm’deki eksitasyon ile maksimum 440 nm emisyonundaki floresans şiddetleri kaydedildi. Floresans şiddeti FU/mg protein olarak ifade edildi.

Enzimatik redoks homeostazisi biyobelirteçlerinin değerlendirilmesi

3.2.7.4. Enzimatik Redoks Homeostazisi Belirteçleri

3.2.7.4.a. Cu-Zn SOD aktivitesi

Örneklerdeki Cu-Zn SOD (EC 1.15.1.1) aktivitesi, Sun ve Oberley’in yöntemiyle (171) belirlendi. Bu yöntemde, ksantin-ksantin oksidaz sistemi tarafından oluşturulan süperoksit radikalının, Cu, Zn-SOD enzimi tarafından ortadan kaldırılamadığında, reaksiyon ortamında bulunan nitroblue tetrazolium (NBT) bileşiğinin süperoksit radikal anyonu tarafından indirgenmesi esasına dayanır. pH değeri 10.2’ye ayarlanan 0.3 mmol/L ksantin, 0.6 mmol/L Na₂EDTA, 150 µmol/L NBT, 400 mmol/L Na₂CO₃, and 1 g/L BSA analiz karışımındaki substrat hidrolizinin inhibisyon oranı ölçülerek enzim aktivitesi saptandı. 25 µL’lik örneğe 972 µL analiz karışımı ve 13 µL ksantin oksidaz (167 U/L) eklendi. 20 dakikalık inkübasyonun sonunda mor renk oluşumu gözlenir. Inkübasyon süresinin sonunda 250 µL 0.8 mmol/L CuCl₂ mikroplağa eklenerek reaksiyon durduruldu. Absorbans değeri 560 nm’de reaktif körüne karşı okundu.

Bir ünite Cu-Zn SOD, süperoksit radikal anyonunu %50 oranında dismutasyona uğratan enzim aktivitesi olarak tanımlanmaktadır.

3.2.7.4.b. Katalaz aktivitesi

CAT aktivitesi (E.C.1.11.1.6) Aebi yöntemine göre (172) belirlendi. H₂O₂'nin yıkılma hızı 240 nm'de kinetik olarak izlendi. 10 µL örnek üzerine 30 mM H₂O₂ içeren PBS'den 750 µL eklenerek 1 dakika boyunca absorbans değişimi kaydedildi. Aktiviteyi hesaplamak için 43.6 M⁻¹cm⁻¹ molar absorptivite değeri kullanıldı. Bir ünite katalaz dakikada yıkılan 1 µmol H₂O₂ olarak tanımlanmaktadır, CAT aktivitesi U/mg protein olarak ifade edildi.

3.2.8. Total protein miktarının değerlendirilmesi

Doku örneklerindeki protein düzeylerinin ölçümü, Qubit analizör ile (Invitrogen, Carlsbad, CA) ile florometrik olarak gerçekleştirildi.

Serum örneklerinin total protein miktarı biüret yöntemi ile tayin edildi. Biüret reaktifinin hazırlanmasında öncelikle 8 g sodyum hidroksit bir miktar suda 1 L'lik balon jodede çözüldü. Ardından sırasıyla, 15 g sodyum potasyum tartarat, 5 g bakır sülfat pentahidrat, 5 g potasyum iyodür, hazırlanmış olan sodyum hidroksit çözeltisi içerisinde çözüldü ve çözelti 1 L'ye tamamlandı. Biüret reaktifi, tüm proteinlerde bulunan –CONH–bağı ile mor renkli kompleks oluşturmaktadır. Örneklerde oluşan mor rengin absorbansı 550 nm'de okundu. Seri dilüsyonla hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki albumin çözeltileri (2,5 – 80 mg/ml) ile oluşturulan standart eğrisi aracılığıyla örneklerin protein konsantrasyonu hesaplandı.

3.3. İstatistiksel yöntemler

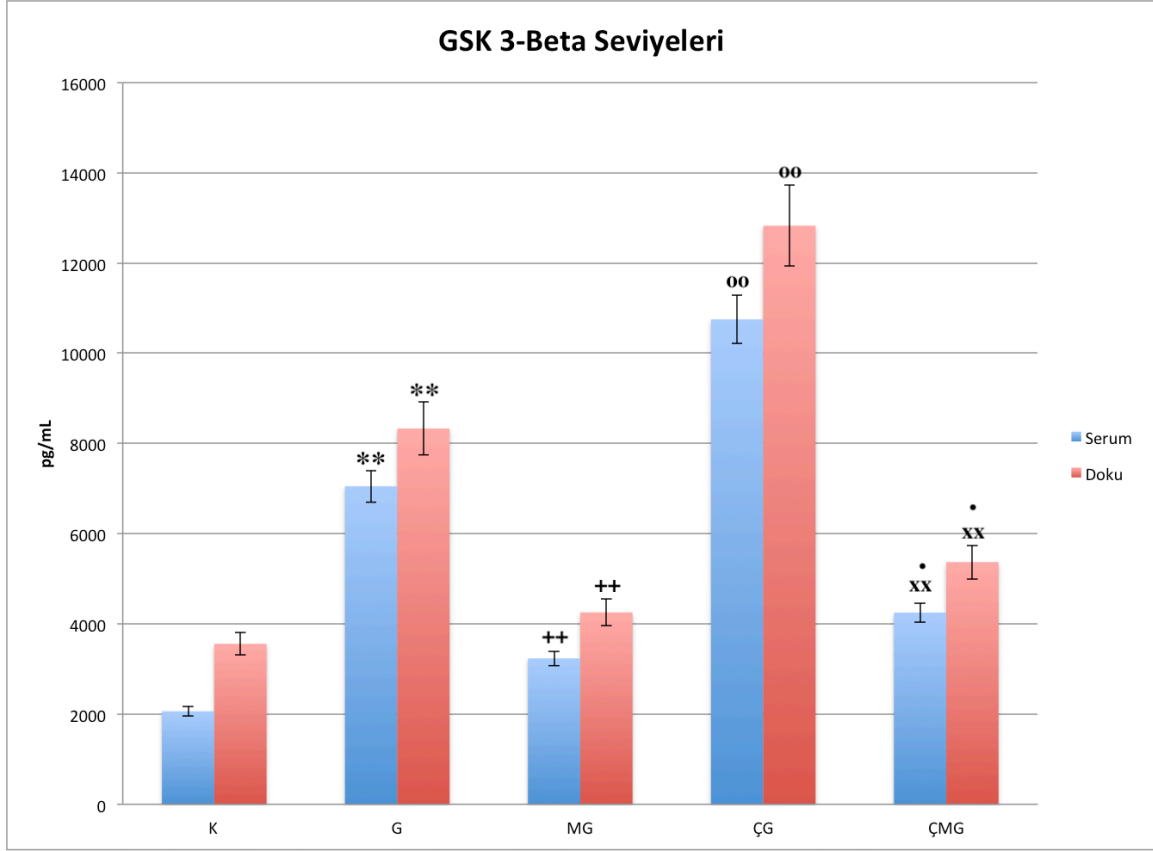
Çalışmamızın verileri ortalama ± standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel analiz Statistical Package of Social Sciences (SPSS) programı (SPSS Inc.: IL, USA, sürüm 12.0) kullanılarak yapıldı. Normallik testi için Kolmogorov-Smirnov testi kullanıldı. Gruplar arası kıyaslamada non-parametrik Mann Whitney U testi kullanıldı. Ortalama ve standart hata hesaplanamayan sayısal verilerin analizi, tek örneklem t testi kullanılarak yapıldı. p<0.05 değeri tüm istatistiksel analizler için anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. GSK-3 β Seviyeleri

Serumda bakılan non-fosforile (aktif) GSK-3 β seviyeleri G grubunda K grubuna göre ileri düzeyde anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p<0,01$) . MG grubunda G grubuna göre ileri düzeyde anlamlı şekilde düşük bulundu ($p<0,01$). ÇG grubunda ise G grubuna göre ileri düzeyde anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p<0,01$). ÇMG grubunda ÇG grubuna göre ileri düzeyde anlamlı şekilde düşük bulundu ($p<0,01$). MG grubunda ise ÇMG grubuna göre anlamlı derecededüşük bulundu ($p<0,05$) (Şekil 12).

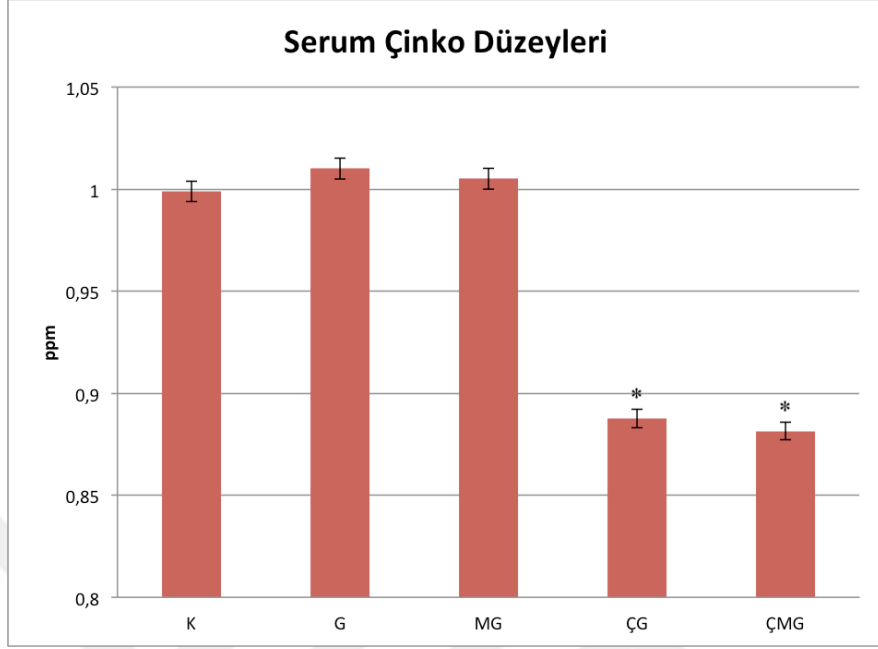
Doku homojenatlarında bakılan non-fosforile (aktif) GSK-3 β seviyeleri G grubunda K grubuna göre ileri düzeyde anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p<0,01$) . MG grubunda G grubuna göre ileri düzeyde anlamlı şekilde düşük bulundu ($p<0,01$). ÇG grubunda ise G grubuna göre ileri düzeyde anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p<0,01$). ÇMG grubunda ÇG grubuna göre ileri düzeyde anlamlı şekilde düşük bulundu ($p<0,01$). MG grubunda ise ÇMG grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0,05$) (Şekil 12).



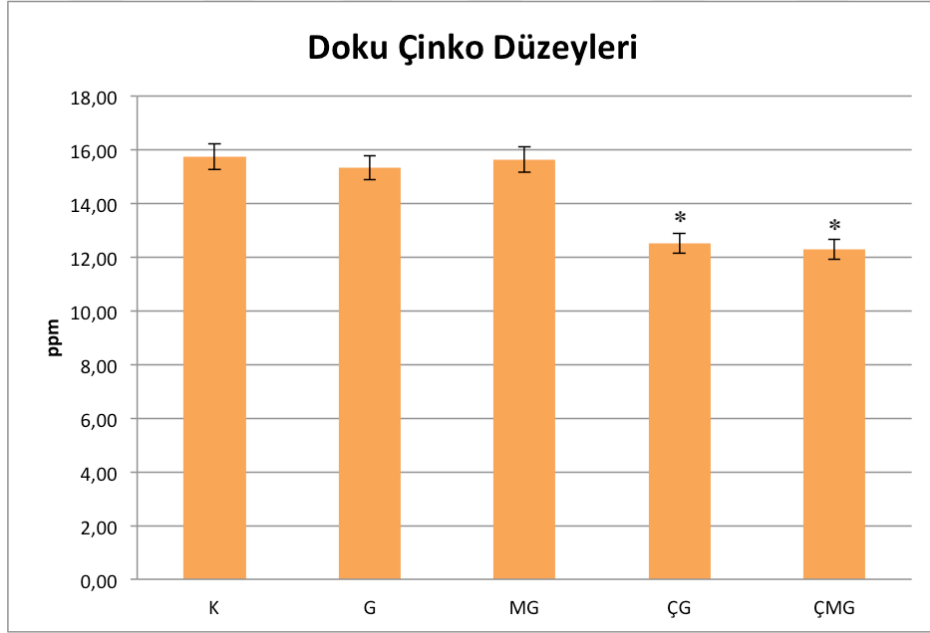
Şekil 15. Serum ve doku GSK-3 β enzim düzeyleri
 (G \rightarrow K: **p<0.01, MG \rightarrow G: ++p<0.01, ÇG \rightarrow G: ⁰⁰p<0.01, ÇMG \rightarrow ÇG: ^{xx}p<0.01,
 ÇMG \rightarrow MG: [.]p<0.05)

4.2. Çinko Düzeyleri

Serum çinko seviyeleri ÇM ve ÇMG gruplarında diğer gruplara göre anlamlı derecede düşük saptandı (p<0,05) (Şekil 13). Benzer şekilde doku çinko seviyeleri de ÇM ve ÇMG gruplarında diğer gruplara göre anlamlı derecede düşük saptandı (p<0,05) (Şekil 14).



Şekil 16. Serum serbest çinko iyonu seviyeleri
(ÇG , ÇMG → tüm gruplar: *p<0.05)

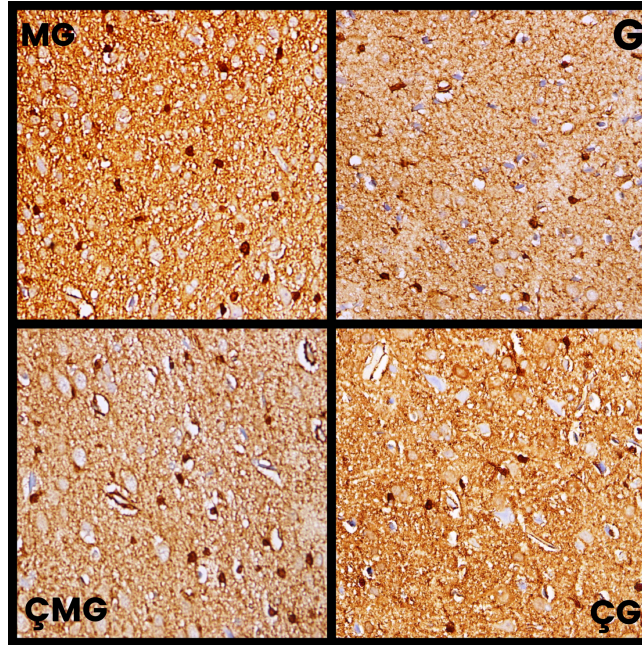


Şekil 17. Doku çinko iyonu seviyeleri
(ÇG , ÇMG → tüm gruplar: *p<0.05)

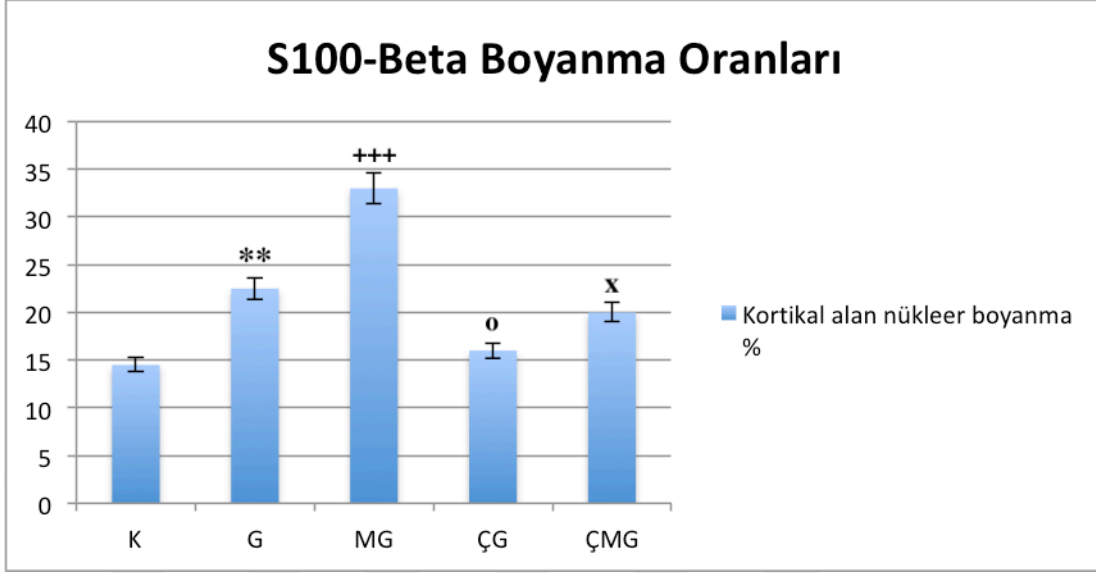
4.3. S-100 Kalsiyum Bağlayıcı Protein β

Kortikal S-100- β boyanma oranları G grubunda MG grubuna göre ileri düzeyde anlamlı şekilde düşük bulundu ($p<0,01$) . ÇG grubunda ise G grubuna göre anlamlı şekilde düşük bulundu ($p<0,05$). ÇG grubunda ÇMG grubuna göre anlamlı şekilde düşük bulundu ($p<0,05$). ÇMG grubunda ise MG grubuna göre çok ileri düzeyde anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0,001$) (Şekil 16). Metforminin kortikal nörorejenerasyon oranı çinkosu normal diyet ile beslenen grupta çinkosu yetersiz diyet ile beslenen gruba göre %97 oranında daha fazla olduğu saptandı.

Subkortikal S-100- β boyanma oranları G grubunda MG grubuna göre ileri düzeyde anlamlı şekilde düşük bulundu ($p<0,01$) . ÇG grubunda ise G grubuna göre anlamlı şekilde düşük bulundu ($p<0,05$). ÇG grubunda ÇMG grubuna göre anlamlı şekilde düşük bulundu ($p<0,05$). ÇMG grubunda ise MG grubuna göre ileri düzeyde anlamlı şekilde düşük bulundu ($p<0,01$). Metforminin subkortikal nörorejenerasyon oranı çinkosu normal diyet ile beslenen grupta çinkosu yetersiz diyet ile beslenen gruba göre %97 oranında daha fazla olduğu saptandı.

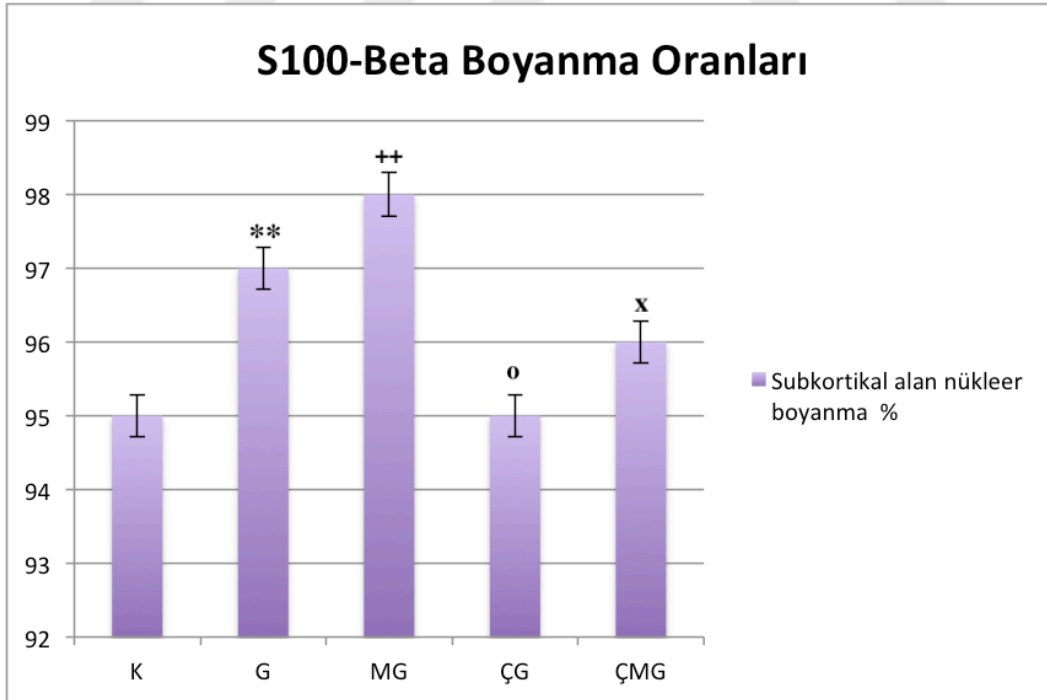


Şekil 18. Kortikal ve subkortikal beyin dokusunda nükleer S100 β boyanmaları



Şekil 19. Kortikal S100-β boyanma oranları (%)

(G → MG: **p<0.01, MG → ÇMG: +++p<0.001, ÇG → G: ^op<0.05, ÇMG → ÇG: ^xp<0.05)



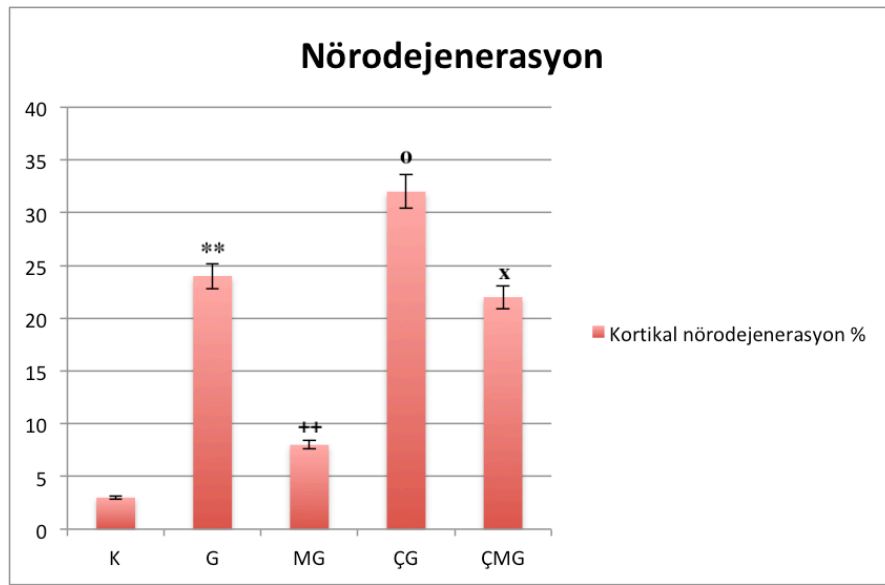
Şekil 20. Subkortikal S100-β boyanma oranları (%)

(G → MG: **p<0.01, MG → ÇMG: ++p<0.01, ÇG → G: ^op<0.05, ÇMG → ÇG: ^xp<0.05)

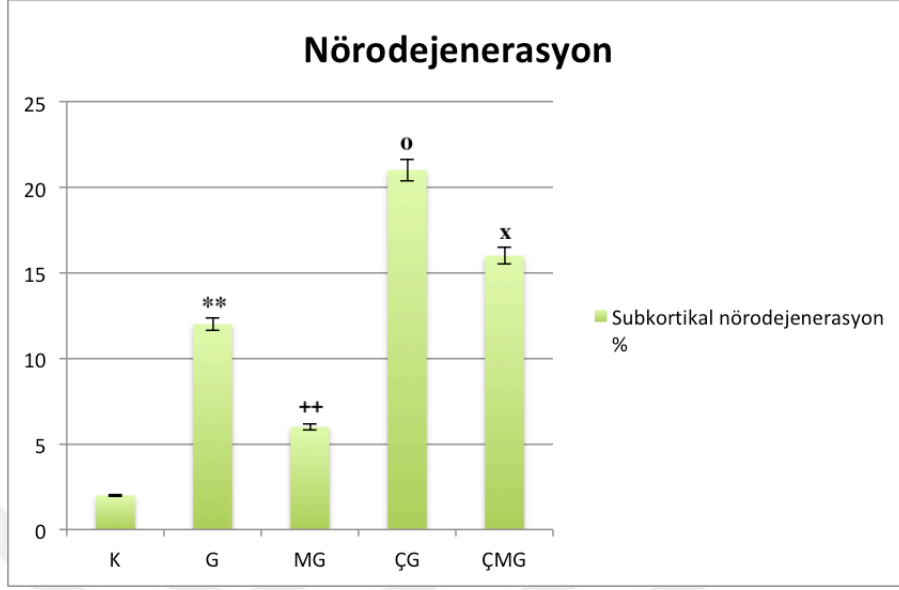
4.4. Nörodejenerasyon

Hematoksilen eozin boyamasında görülen kortikal dejenere nöron sayısı oranları G grubunda MG grubuna göre ileri düzeyde anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p<0,01$) . ÇG grubunda ise G grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p<0,05$). ÇG grubunda ÇMG grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p<0,05$). ÇMG grubunda ise MG grubuna göre ileri düzeyde anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,01$) (Şekil 18). Metforminin kortikal nöroprotektif etkisinin oranı çinkosu normal diyet ile beslenen grupta çinkosu yetersiz diyet ile beslenen gruba göre %136 oranında daha fazla olduğu saptandı.

Subkortikal dejenere nöron sayısı oranları G grubunda MG grubuna göre ileri düzeyde anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p<0,01$) . ÇG grubunda ise G grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p<0,05$). ÇG grubunda ÇMG grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p<0,05$). ÇMG grubunda ise MG grubuna göre ileri düzeyde anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p<0,01$) (Şekil 19). Metforminin subkortikal nöroprotektif etkisinin oranı çinkosu normal diyet ile beslenen grupta çinkosu yetersiz diyet ile beslenen gruba göre %110 oranında daha fazla olduğu saptandı.



Şekil 21. Kortikal nörodejenerasyon oranları (%)
(G→ MG: ** $p<0,01$, MG→ ÇMG: ++ $p<0,01$, ÇG→ G: 0 $p<0,05$, ÇMG→ ÇG: x $p<0,05$)

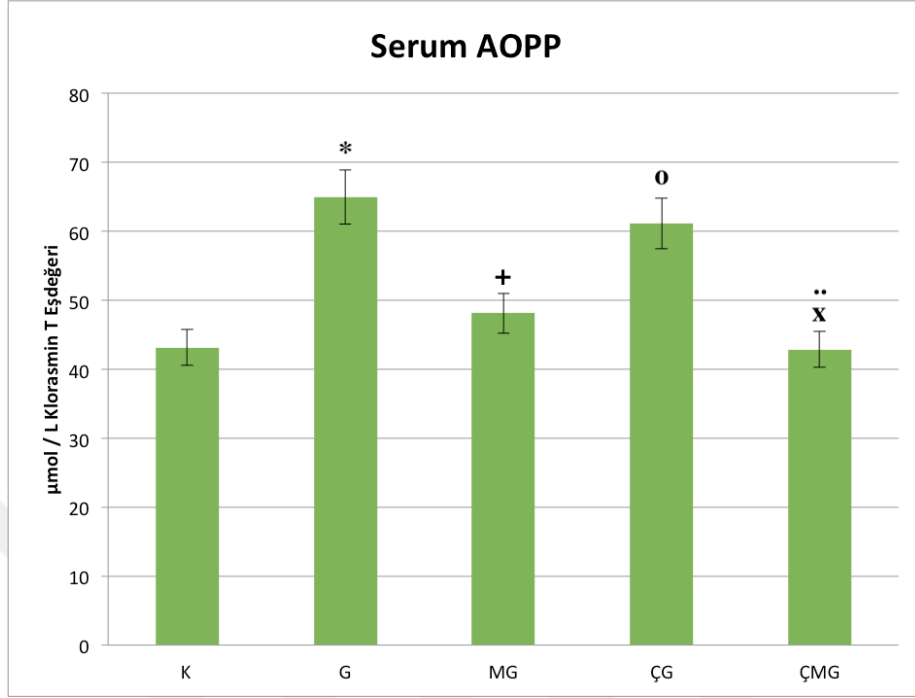


Şekil 22. Subkortikal nörodejenerasyon oranları (%)
 (G→ MG: **p<0.01, MG→ ÇMG: ++p<0.01, ÇG→ G: ^op<0.05, ÇMG→ ÇG: ^xp<0.05)

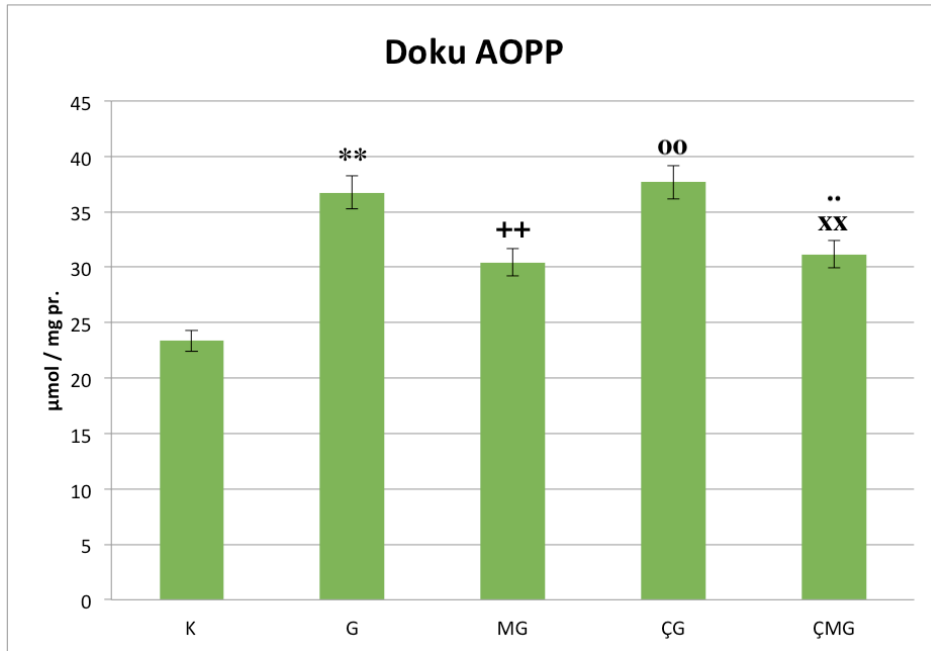
4.5. İleri oksidasyon protein ürünleri (AOPP)

Serumda ölçülen AOPP seviyeleri G grubunda K grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulundu (p<0,05) . MG grubunda ise G grubuna göre anlamlı şekilde düşük bulundu (p<0,05). ÇMG grubunda ÇG grubuna göre anlamlı şekilde düşük bulundu (p<0,05). ÇG grubunda ise G grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu (p<0,05). ÇMG grubunda ise MG grubuna göre ileri seviyede anlamlı derecede yüksek bulundu (p<0,01) (Şekil 20).

Dokuda ölçülen AOPP seviyeleri G grubunda K grubuna göre ileri düzeyde anlamlı şekilde yüksek bulundu (p<0,01) . MG grubunda ise G grubuna göre ileri düzeyde anlamlı şekilde düşük bulundu (p<0,01). ÇMG grubunda ÇG grubuna göre ileri düzeyde anlamlı şekilde düşük bulundu (p<0,01). ÇG grubunda ise G grubuna göre ileri düzeyde anlamlı derecede yüksek bulundu (p<0,01). ÇMG grubunda ise MG grubuna göre ileri seviyede anlamlı derecede yüksek bulundu (p<0,01) (Şekil 21).



Şekil 23. Serum AOPP düzeyleri
 (G → K: *p<0.05, MG → G: +p<0.05, ÇG → G: °p<0.05, ÇMG → ÇG: x p<0.05,
 ÇMG → MG: °°p<0.01)



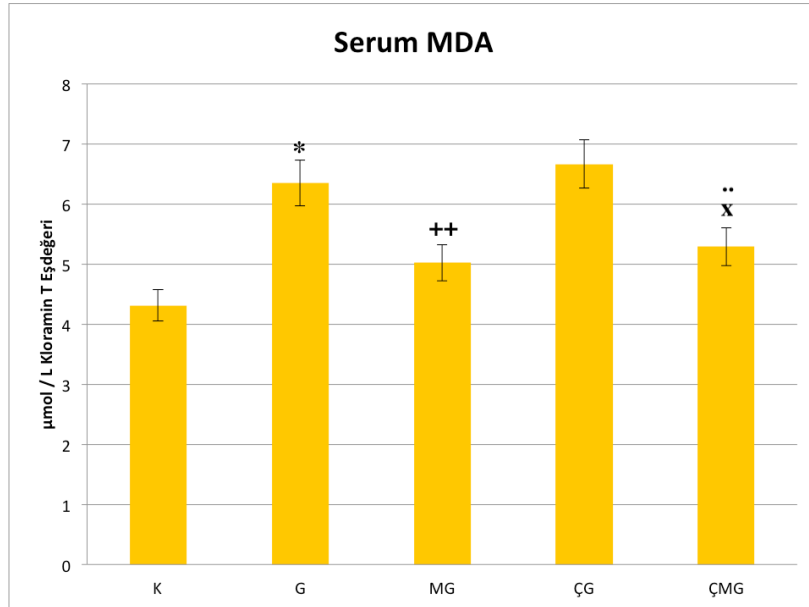
Şekil 24. Doku AOPP düzeyleri
 (G → K: **p<0.01, MG → G: ++p<0.01, ÇG → G: °°p<0.01, ÇMG → ÇG: xxp<0.01,
 ÇMG → MG: °°p<0.01)

4.6. Lipid peroksidasyon biyobelirteçleri

4.6.1. Malondialdehit

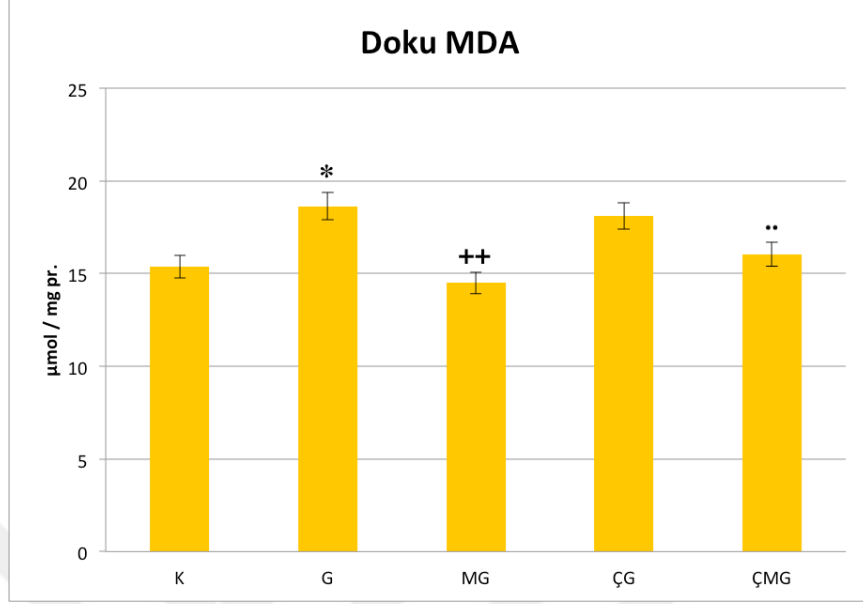
Serumda ölçülen MDA seviyeleri G grubunda K grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p<0,05$) . MG grubunda ise G grubuna göre ileri düzeyde anlamlı şekilde düşük bulundu ($p<0,01$). ÇMG grubunda ÇG grubuna göre anlamlı şekilde düşük bulundu ($p<0,05$). ÇG grubunda ise G grubuna göre anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$). ÇMG grubunda ise MG grubuna göre ileri seviyede anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,01$) (Şekil 22).

Dokuda ölçülen MDA seviyeleri G grubunda K grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p<0,05$) . MG grubunda ise G grubuna göre ileri düzeyde anlamlı şekilde düşük bulundu ($p<0,01$). ÇMG grubunda ÇG grubuna göre anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$). ÇG grubunda ise G grubuna göre anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$). ÇMG grubunda ise MG grubuna göre ileri seviyede anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,01$) (Şekil 23).



Şekil 25. Serum MDA düzeyleri

(G → K: * $p<0,05$, MG → G: ++ $p<0,01$, ÇMG → MG: ** $p<0,01$, diğer gruplar için $p>0,05$)



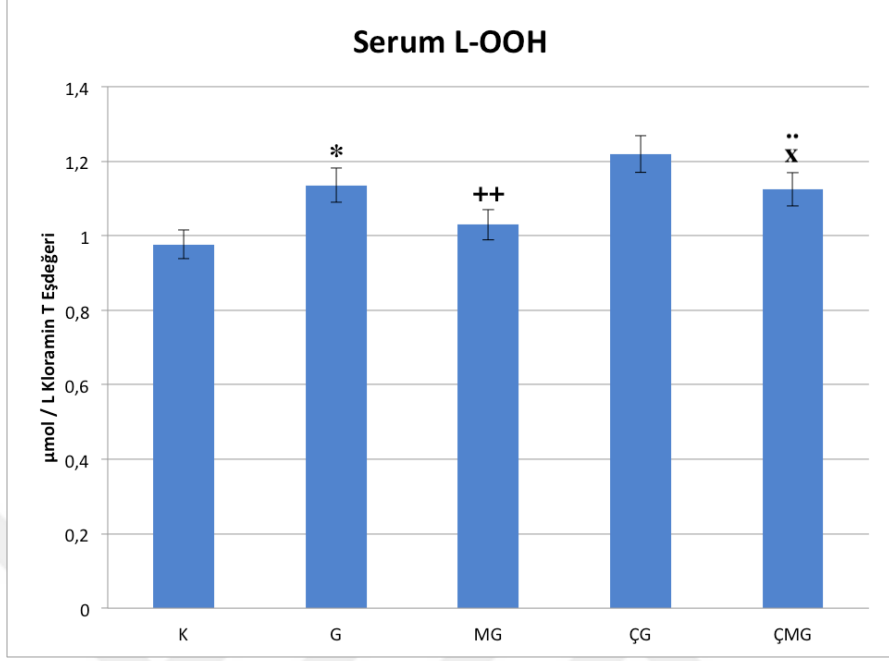
Şekil 26. Doku MDA düzeyleri

(G→ K: * $p<0.05$, MG→ G: ++ $p<0.01$, ÇMG→ ÇG: $\chi^2 p<0.05$, ÇMG→ MG: ** $p<0.01$, diğer gruplar için $p>0.05$)

4.6.2. Lipid hidroperoksit

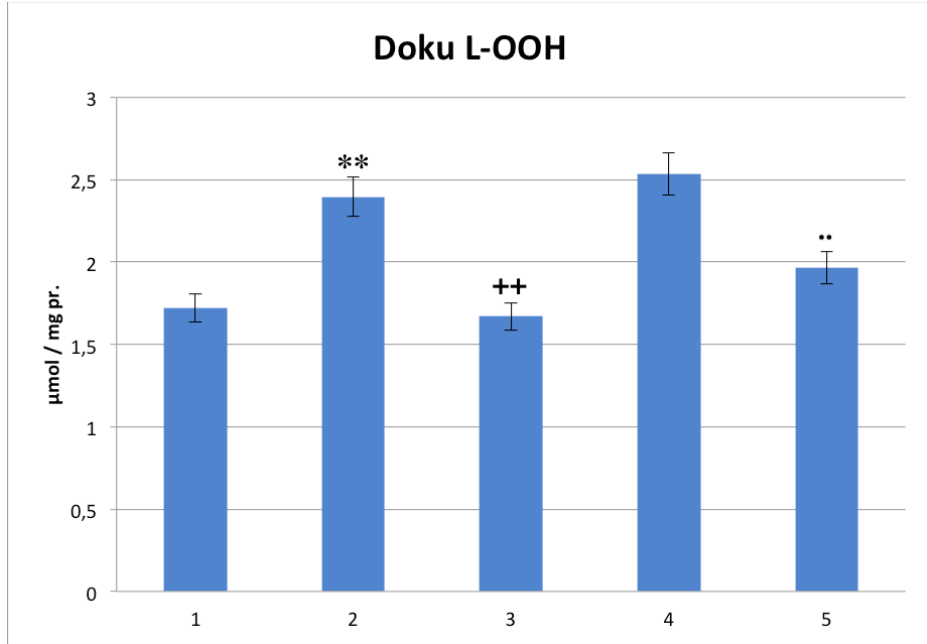
Serumda ölçülen L-OOH seviyeleri G grubunda K grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p<0,05$) . MG grubunda ise G grubuna göre ileri düzeyde anlamlı şekilde düşük bulundu ($p<0,01$) . ÇMG grubunda ÇG grubuna göre anlamlı şekilde düşük bulundu ($p<0,05$) . ÇG grubunda ise G grubuna göre anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$) . ÇMG grubunda ise MG grubuna göre ileri seviyede anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,01$) (Şekil 24).

Dokuda ölçülen L-OOH seviyeleri G grubunda K grubuna göre ileri düzeyde anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p<0,01$) . MG grubunda ise G grubuna göre ileri düzeyde anlamlı şekilde düşük bulundu ($p<0,01$) . ÇMG grubunda ÇG grubuna göre anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$) . ÇG grubunda ise G grubuna göre anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$) . ÇMG grubunda ise MG grubuna göre ileri seviyede anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,01$) (Şekil 25).



Şekil 27. Serum L-OOH düzeyleri

(G → K: * $p < 0.05$, MG → G: ++ $p < 0.01$, ÇMG → ÇG: $p < 0.05$, ÇMG → MG: ** $p < 0.01$, diğer gruplar için $p > 0,05$)



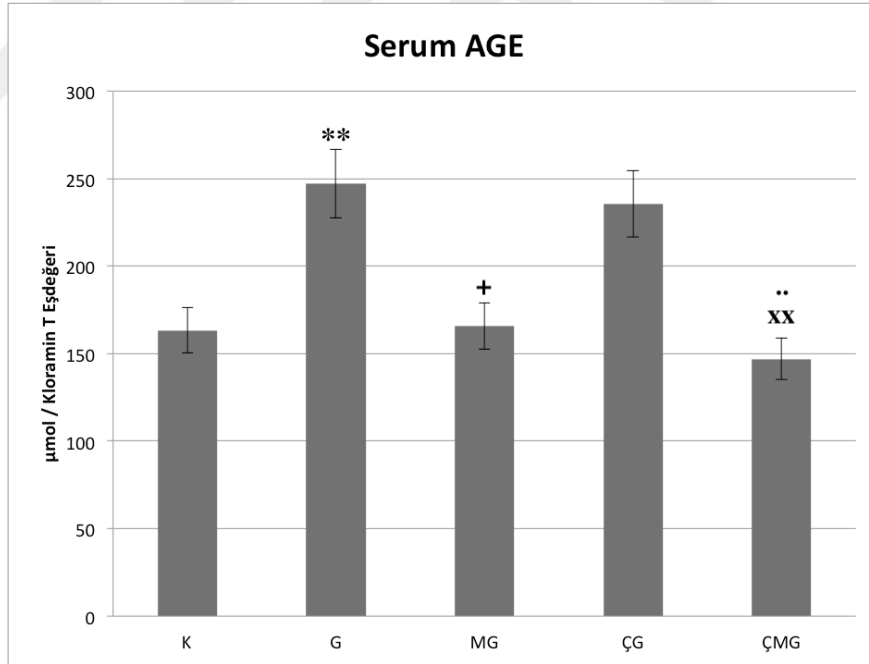
Şekil 28. Doku L-OOH düzeyleri

(G → K: ** $p < 0.01$, MG → G: ++ $p < 0.01$, ÇMG → MG: ** $p < 0.01$, diğer gruplar için $p > 0,05$)

4.7. Proteine bağlı ileri glikasyon son ürünleri

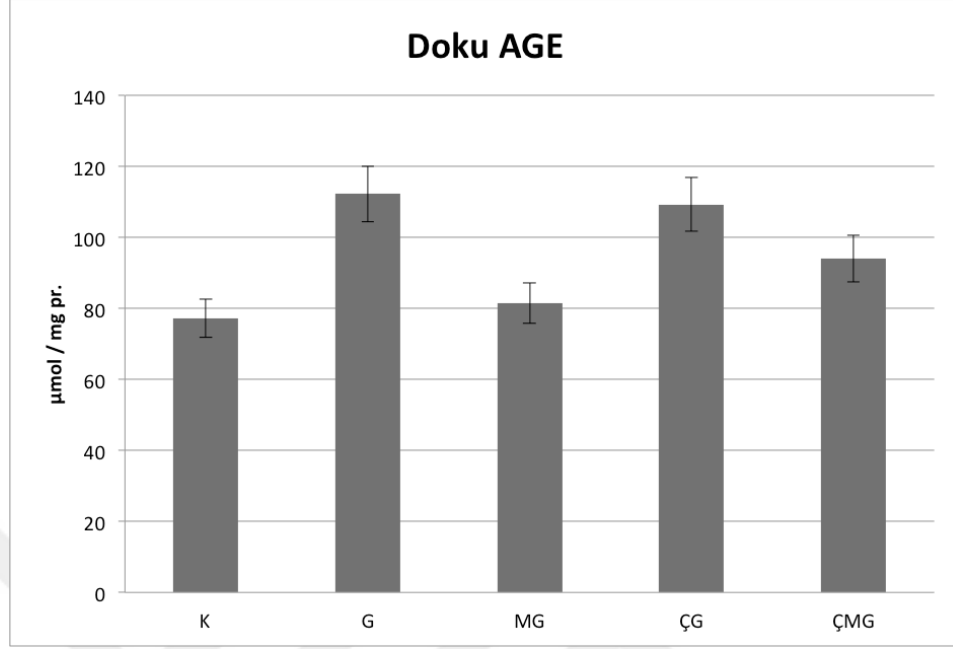
Serumda llen AGE seviyeleri G grubunda K grubuna göre ileri düzeyde anlamlı Şekilde yüksek bulundu ($p<0,01$). MG grubunda ise G grubuna göre ileri düzeyde anlamlı Şekilde düşük bulundu ($p<0,05$). MG grubunda G grubuna göre ileri düzeyde anlamlı Şekilde düşük bulundu ($p<0,01$). G grubunda ise G grubuna göre anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$). MG grubunda ise MG grubuna göre ileri seviyede anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,01$) (Şekil 26).

Dokuda llen AGE seviyelerinde gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı (Şekil 27).



Şekil 29. Serum AGE düzeyleri

(G → K: ** $p<0,01$, MG → G: + $p<0,05$, MG → G: xx $p<0,01$, MG → MG: ** $p<0,01$, diğer gruplar için $p>0,05$)



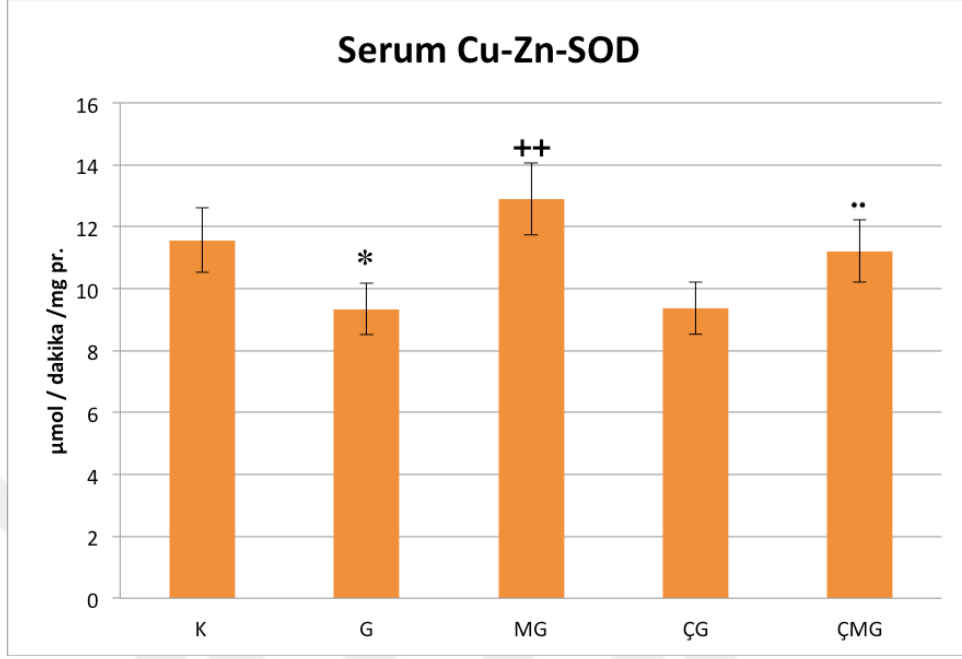
**Şekil 30. Doku AGE düzeyleri
(Tüm gruplar için $p>0,05$)**

4.8. Enzimatik redoks homeostazisi biyobelirteçleri

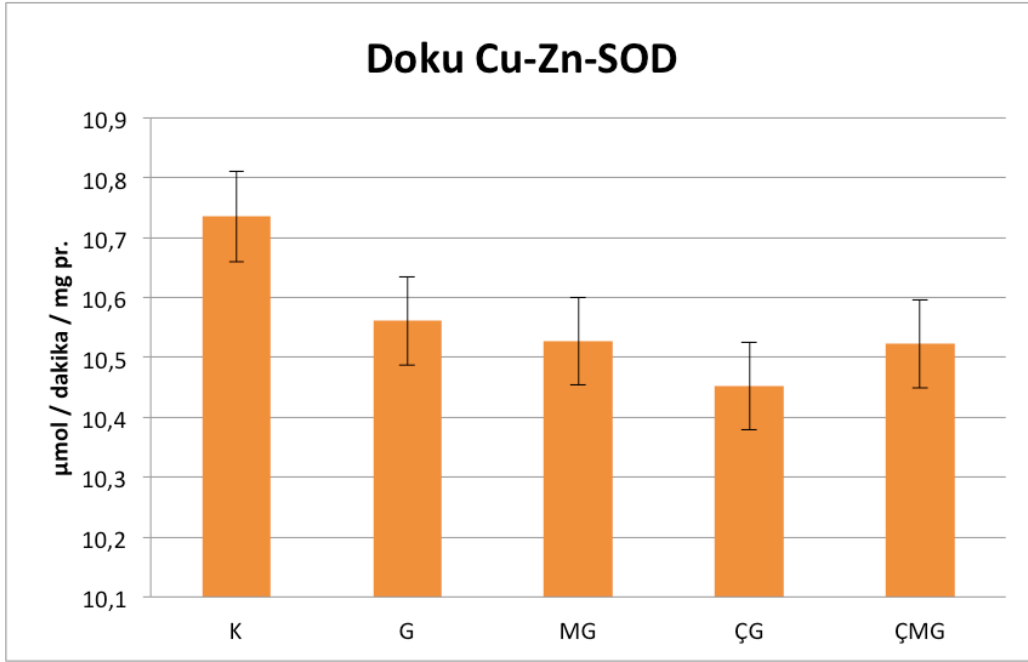
4.8.1. Cu-Zn SOD aktivitesi

Serumda ölçülen Cu-Zn-SOD aktivitesi G grubunda K grubuna göre anlamlı şekilde düşük bulundu ($p<0,05$). MG grubunda ise G grubuna göre ileri düzeyde anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p<0,01$). ÇMG grubunda ÇG grubuna göre anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$). ÇG grubunda ise G grubuna göre anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$). ÇMG grubunda ise MG grubuna göre ileri seviyede anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,01$) (Şekil 28).

Dokuda ölçülen Cu-Zn-SOD aktivitesi seviyelerinde gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı (Şekil 29).



Şekil 31. Serum Cu-Zn-SOD aktivitesi düzeyleri
 (G → K: * $p < 0,05$, MG → G: ++ $p < 0,01$, ÇMG → MG: ** $p < 0,01$, diğer gruplar için $p > 0,05$)

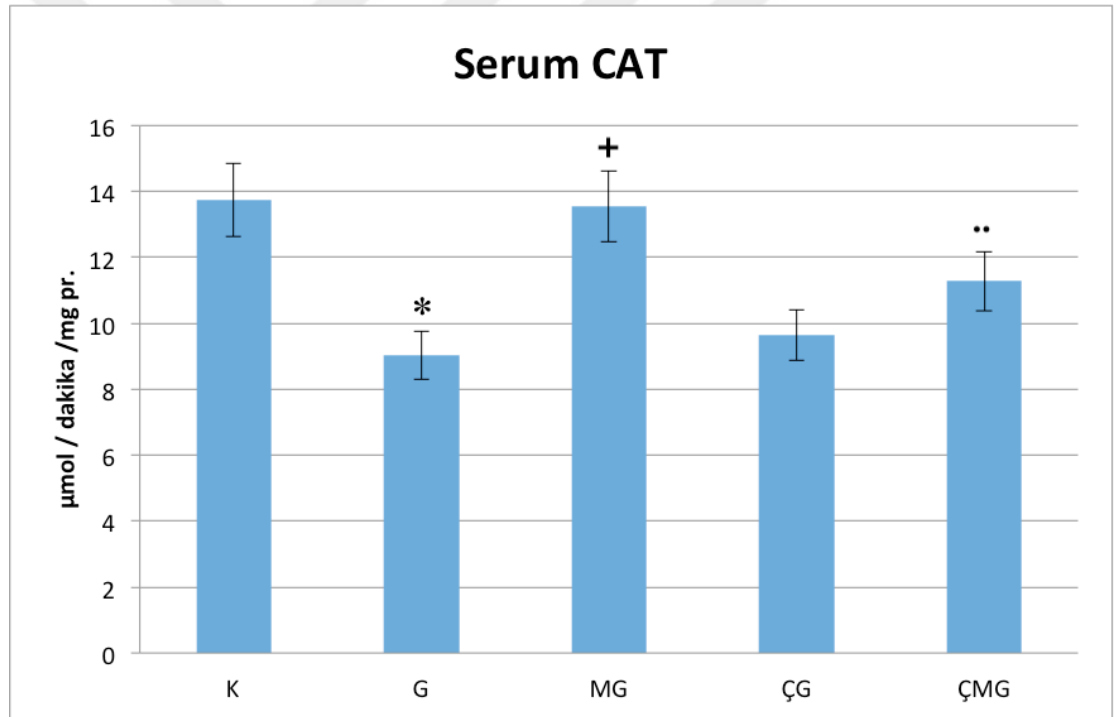


Şekil 32. Doku Cu-Zn-SOD aktivitesi düzeyleri
 (Tüm gruplar için $p > 0,05$)

4.8.2. Katalaz aktivitesi

Serumda ölçülen katalaz aktivitesi G grubunda K grubuna göre anlamlı şekilde düşük bulundu ($p<0,05$) . MG grubunda ise G grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p<0,05$). ÇMG grubunda ÇG grubuna göre anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$). ÇG grubunda ise G grubuna göre anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$). ÇMG grubunda ise MG grubuna göre ileri seviyede anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,01$) (Şekil 30).

Katalaz aktivitesinin dokuda ölçümü teknik problemlerden dolayı gerçekleştirilemedi.



Şekil 33. Doku katalaz aktivitesi düzeyleri

(G→ K: * $p<0,05$, MG→ G: + $p<0,05$, ÇMG→ MG: ** $p<0,01$, diğer gruplar için $p>0,05$)

4. TARTIŞMA

Araştırmamız glutamatın neden olduğu nöronal hasarda metforminin koruyucu rolü olduğunu göstermektedir. Söz konusu nöroprotektif etkinin GSK-3 β ve çinko aracılı olduğunu ileri sürmektedir.

Glutamat memeli beyninde baskın eksitatör nörotransmitter olarak önemli rol oynamaktadır (174). Bununla birlikte, aşırı düzeyde glutamat salınması, eksitotoksisite ile sonuçlanır. Eksitotoksisite; beyin iskemisi de dahil olmak üzere akut ve kronik birçok beyin hastalığı ile ilişkili nöronal hasarlarda önemli bir faktördür (174-176).

Araştırmamız sonucunda elde ettiğimiz histopatolojik bulgularımız, D-glutamik asit uygulanan sıçanların kortikal ve subkortikal bölgelerinde önemli hasar oluştuğu yönündedir. Çinko eksikliği olan sıçanlarda D-glutamik asitin oluşturduğu hasarın daha da belirgin olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 21,22).

Normal beyin gelişimi için optimum düzeydeki çinkonun gerekliliği açıkça bilinmektedir (177). Bazı çalışmalar çinkonun, reseptörler üzerindeki çinko bağlanma yeri ile etkileşerek N-metil-D-asparate (NMDA) reseptörlerini (5 - 7) ve glutamat salınımını (8, 9) inhibe ettiğini bildirmiştir. Böylece çinko eksikliğinde NMDA reseptörleri üzerindeki inhibisyonun ortadan kalkması ve presinaptik nörondan glutamat salgısı artışı, araştırmamızdaki çinkosu yetersiz diyetle beslenen sıçanların kortikal ve subkortikal bölgelerdeki hasarın daha belirgin olmasından sorumlu olabileceği görüşündeyiz.

İskemik veya hemorajik inmeler (5), Alzheimer hastalığı (4), otizm (6), amiyotrofik lateral skleroz (4) gibi hastalıkların patogenezinde aşırı glutamat salınımı yer almaktadır. Bu hastalıklar sırasında glutamaterjik sinir terminallerinden sinaptik yarıklara salınan aşırı glutamat tarafından uyarılan NMDA reseptörleri hücre içerisine kalsiyum girişini artırır. Bu mekanizmanın iskemi sonrası nöronal dejenerasyon (eksitotoksisite) ile ilişkili olduğu çalışmalarla kanıtlanmıştır (10, 11). Bu nedenle, serebral iskemi sırasında sinaptik veziküllerden glutamat ile birlikte salınan çinko, NMDA reseptörleri aracılığıyla meydana gelen kalsiyum girişini bloke eder. Çinkonun yarattığı bu blokaj, aşırı glutamat salınımına bağlı nöronal hasara karşı koruyucu bir etki yapabilir.

Benzer şekilde Alzheimer hastalığında serum çinko seviyelerinin kontrol gruplarına göre azaldığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (35).

Diğer taraftan Ana M. Adamo ve arkadaşları (177), çinko eksikliğinin, insan nöroblastoma hücrelerinde (IMR-32) nöronal proliferasyon üzerindeki etkilerini ve IMR-32 hücreleri ile farklılaştırılmış sıçan kortikal nöronlarının primer kültürlerinde apoptoz üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Araştırmalarında çinko eksikliğinin, hücre döngüsünün G0 / G1 fazında durmasına neden olarak nöroproliferasyonunun inhibe olduğunu göstermişlerdir. Çinko eksikliğinin hem proliferatörlükte olan hem de sessiz nöronlarda apoptotik nöronal ölümü tetiklediğini öne sürmüşlerdir. Bu apoptozun, extracellular-signal-regulated kin ase (ERK) inhibisyonu, kaspaz-3 aktivasyonu ve nükleer faktör-kappa B'ye (NF-κB) bağımlı anti-apoptotik genlerin down-regülasyonuna sebep olabilecek intrinsik bir yol ile gerçekleştiğini ileri sürmüşlerdir.

Benzer bir çalışmada, Rohit Seth ve arkadaşları (178), çinko eksikliğinin, insan nöronal prekürsör hücrelerinde mitokondriyal p53 ve kaspaz bağımlı yollar yoluyla apoptozise neden olduğunu göstermiştir.

Çalışmamızda çinko düzeyi yetersiz diyet ile beslenen sıçanlarda histopatolojik olarak saptanan aşırı D-glutamik asite bağlı nöronal dejenerasyonun, çinko düzeyi normal diyetle beslenen sıçanlara göre anlamlı derecede fazla olması bu bilgiler ile paralellik göstermektedir.

Benzer şekilde GSK-3β aktivasyonunun NF-κB'nin down regülasyonu ve p53 başta olmak üzere birçok pro-apoptotik gen aktivasyonu ile apoptozu başlattığı ileri sürülmektedir. Ayrıca çinkonun, GSK-3β üzerinde inhibisyon yaratan önemli bir eser element olduğu belirtilmektedir. Yapılan çalışmalarda hücre içerisindeki çinko artışının GSK-3β'yı inhibe ettiği gösterilmiştir (31). Sonuç olarak, çinko eksikliğinde ve GSK-3β aktivasyonunda benzer olayların meydana gelmesi, çinko eksikliğinde GSK-3β ekspresyonunun ve/veya aktivitesinin artması ile ilgili olabilir.

GSK-3, tüm memeli dokularında bulunan multifonksiyonel özel bir serin / treonin kinazdır. (179,180). İnsanlarda iki GSK-3 izoformu vardır: GSK-3α ve GSK-3β. GSK-3α ve GSK-3β sırasıyla serin 21 (S21) ve serin 9 rezidülerinden (S9) farklı hücre dışı sinyaller tarafından fosforile edilerek inhibe edilir. GSK-3β merkezi sinir sisteminde,

özellikle de nöronlarda yoğun olarak bulunmakta olup , birçok önemli metabolik ve sinyal proteinlerini, yapısal proteinleri ve transkripsiyon faktörlerini fosforilleyerek regüle etmektedir. Sonuç olarak glikojen metabolizması, embriyogenezis, mitotik regülasyon, inflamasyon ve nöroplastisitede anahtar rol oynamaktadır (180).

Glutamat aracılı uyarımın GSK-3 β seviyelerinde ve aktivitelerinde artışa sebep olduğu belirtilmektedir. Nitekim GSK-3 β 'nın iskemik beyin hasarı, travma gibi artmış glutamat salınımı ile seyreden beyin hasarlarında rol aldığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (22).

Bununla birlikte GSK-3 β 'nin önemli substratlarından biri, spesifik nöronlarda mikrotübül fonksiyonunda kritik bir rol oynayan mikrotübül bağlama proteini Tau'dur (181). Tau fosforilasyonunun, aşırı GSK-3 β eksprese eden transgenik farelerde arttığı belirtilmiştir (182). Benzer şekilde artmış GSK-3 β aktivitesinin Alzheimer hastalarında Tau fosforilasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (23). Ek olarak GSK-3 β aktivasyonunda artış Amiloid Prekürsör Protein (APP) ekspresyonunu arttırmakta, GSK-3 β aktivitesinin baskılanması ile beta-amiloid plak oluşumunu azaltmaktadır (24),

Çalışmamızda da aşırı D-glutamik asite bağlı nörodejenerasyonun gözleendiği gruplarda (G ve ÇG) sıçanların hem kan hem de beyin dokusunda GSK-3 β enzim düzeylerinde anlamlı artışların olduğu belirlenmiştir (Şekil 15). Bulgularımız glutamat fazlalığının GSK-3 β ekspresyonunu artırdığını göstermektedir.

Ayrıca, son yıllarda yapılan çalışmalar, GSK-3 β inhibisyonunun apoptotik sinyalleri zayıflattığını ve nöronal ölümü engellediğini göstermiştir (183,184). GSK-3 β inhibisyonunun serebral iskemiye karşı koruyucu olduğu ve nöronların glutamata bağlı dejenerasyonunu önlediği gösterilmiştir. GSK-3 β inhibisyonunun serebral nöronların survisini arttırdığı ileri sürülmüştür (185-187).

Araştırmamız glutamat artışına bağlı oluşan nörodejenerasyonda, Metforminin GSK-3 β ekspresyonunu ve/veya aktivasyonunu azaltarak nöroprotektif etki gösterdiğini ileri sürmektedir. Histopatolojik bulgularımız, metformin verilen gruplarda glutamat aracılı nörodejenerasyonun, verilmeyen gruplara göre anlamlı şekilde azaldığını ortaya koymaktadır (Şekil 21,22) Ek olarak çalışmamız nörodejenerasyonun anlamlı şekilde azaldığı bu gruplarda GSK-3 β seviyelerinde de anlamlı şekilde azalma olduğunu göstermektedir (Şekil 15).

Çalışmamızda aynı zamanda metformin verilen gruplarda (MG, ÇMG) verilmeyen gruplara göre (G, ÇG) GSK-3 β seviyelerindeki ve nörodejenerasyondaki azalmaya ek olarak nörorejenerasyonun daha yüksek olduğu belirlenmiştir. İmmünohistokimyasal olarak saptadığımız bir nörorejenerasyon göstergesi olan S100 B nükleer boyanma oranları metformin verilen gruplarda verilmeyen gruplara göre daha yüksek düzeyde saptanmıştır (Şekil 19,20)

S100 Kalsiyum Bağlayıcı Protein ya da diğer adıyla S100- β , S100 protein ailesinin bir üyesi olup, bütün S100 proteinleri gibi çeşitli hücrelerin sitoplazma ve çekirdeğinde yaygın olarak bulunurlar. S100 protein ailesinin üyelerinin hücre farklılaşması, büyüme siklusunun düzenlenmesi ve devamlılığı gibi görevleri bulunmaktadır. S100 protein ailesinden olan S100- β ise merkezi sinir sisteminde glial hücrelerden, özellikle endotelial komşuluğa sahip ve olgunlaşmasını tamamlamış astrositlerden salgılanmaktadır (154). S100- β , santral sinir sisteminde bir çok göreve sahiptir; nöritlerin uzaması, hücre içerisine Ca⁺² girişini artırarak nöronal matürasyonun düzenlenmesi, astrositer ve aksonal proliferasyonun sağlanması, PKC bağımlı fosforilasyonun inhibitör kontrolü gibi. S100- β , gelişmekte olan santral sinir sisteminde bir nörotrofik faktör gibi görev yaparken, erişkin hücrelerde özellikle PKC bağımlı fosforilasyonun kontrollü bir şekilde devamlılığını sağlamaktadır (155). S100- β nin kontrol ettiği PKC bağımlı fosforilasyon, santral sinir sistemin glial ve nöronal proliferasyonun hücre içi haberleşme sisteminde önemli bir rol oynamaktadır (155). Aynı zamanda S100- β ekspresyonunun hasar sonrasında arttığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (158). Santral sinir sistemindeki hasar sonrasında ekspresyonu artan S100- β 'nin, bFGF - FGF-Reseptörü kompleksinin hücre içerisindeki etkisini artırarak nöronal ve glial rejenerasyon ve sağ kalımı olumlu yönde etkilediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (159).

Histopatolojik ve immünohistokimyasal bulgularımız, kanda ve beyin dokusu homojenatlarında saptadığımız GSK-3 β enzim düzeyleri metforminin santral sinir sisteminin nörodejenerasyondan koruduğu gibi glutamata bağlı gelişen nöronal hasarda nörorejeneratif etki gösterdiğini ileri sürmektedir. Metforminin söz konusu nöroprotektif etkilerinin GSK-3 β aracılı olduğunu düşündürmektedir.

Metformin, prediyabet ve Tip 2 diyabetin ilk basamak tedavisinde kullanılan biguanid ilaç grubu arasında yer alan bir ajandır. Metforminin temel etkisi, karaciğer tarafından kana verilen glukozu (9) ve insülin direncini azaltması olarak bilinir (10). Etki mekanizmaları arasında en bilineni Adenozin Mono Fosfat Kinaz (AMPK) aktivasyonudur (11). AMPK vücudun hücrel enerji homeostazını sağlayan en önemli düzenleyicilerden biridir (12). Aynı zamanda metforminin terapötik dozlarda kullanımı sonucunda pankreas beta hücrelerindeki kayıp ve harabiyetin de azaldığı bilinmektedir (13).

Metforminin hücre içi enerji metabolizmasındaki olumlu etkilerinden dolayı, santral sinir sistemi üzerinde de koruyucu etkilerinin olduğu ileri sürülmektedir. Bunlar arasında post-iskemik hasarın ortaya çıkışını azaltması (14), iskemi esnasında nöroprotektif etki sağlaması (15), iskemik hasardan sonra iyileşme sürecini hızlandırması (16), Alzheimer hastalığında B-amiloid plak oluşumunu geriletmesi (17) gibi etkilerden söz edilmektedir.

Metforminin insan nöral kök hücreleri (hNSC) üzerinde olumlu etkilerinden söz edilmektedir (69-71). Metforminin bu hücreler üzerindeki nöroprotektif etkisinin AMPK aracılı olduğu belirtilmektedir (69). AMPK, lipid metabolizması, hücre glikozu alımı veya mitokondri biyogenezi gibi hücre içi sistemlerin düzenlenmesinde çok önemli bir role sahip bir faktördür. Enerji homeostazının hücrel mekanizmalarının Alzheimer hastalığının patogeneziyle bağlantılı olduğu (69), bu nedenle insan nöral kök hücrelerinde AMPK'ya bağlı yolların aktivasyonunun, Alzheimer hastalığı için potansiyel bir terapötik hedef olabileceği ileri sürülmektedir. Amiloid Beta verilen hNSC'ler üzerinde yapılan çalışmalarda, AMPK agonisti olan metforminin hücrelerde canlılığını arttırdığı ve kaspaz kaskadı aktivasyonunun temel markeri olan kaspaz 3/9'u azalttığı gözlenmiştir (69). A β uygulanan hücrelerde aynı zamanda , sitoplazmaya mitokondriden salınan disemine sitokrom c'nin kaspaz 9'u aktive ederek apoptozun indüksiyonunun arttığını, Metforminin ise bu salınımı önemli ölçüde önlediği gösterilmiştir (69). Ayrıca, metforminin AMPK aktivasyonu aracılığıyla B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) ve cAMP Responsive Element Binding protein (CREB)'inin ekspresyonunu arttırdığı, CREB artışının ise hücre içerisinde Akt aktivasyonuna neden olduğu belirtilmektedir (69).

Metforminin indüklediği Akt yolağı, hücre bölünmesini ve sağ kalımını düzenleyen önemli bir hücre içi haberleşme yolağıdır. Daha önce belirtildiği gibi Akt aktivasyonu (fosforilasyonu), GSK-3 β inhibisyonu yaratan önemli bir protein kinazdır.

Diğer taraftan GSK-3 β ekspresyonunun ve aktivitesinin hücre yapısı ve içeriğine göre değişiklik gösterdiği bildirilmişse de (28), metforminin kalpte ve uterin kanser hücrelerinde GSK-3 β aktivitesini azaltarak olumlu etki gösterdiğini ileri sürülmüştür (29, 30). Bununla birlikte Theodore P. Ciaraldi ve arkadaşları (188) metforminin iskelet kası ve adipoz dokuda GSK-3 β ekspresyonuna ve aktivasyonuna etkisini incelemişler; metformin tedavisinin, adipositlerde veya iskelet kasında GSK-3 proteini ekspresyonu ve inaktivasyonu üzerinde önemli bir etkisinin bulunmadığını belirtmişlerdir.

Ancak, santral sinir sisteminde metformin - GSK-3 β ilişkisini araştıran herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle araştırmamızda D-glutamik hasarına bağlı nörodejenerasyonda metforminin nöroprotektif etki mekanizmaları GSK-3 β düzeyleri ile ilişkili olarak incelenmiştir.

Bulgularımız, aktif GSK-3 β düzeylerinin metformin verilen gruplarda verilmeyen gruplara göre anlamlı şekilde azaldığını göstermektedir. Bu bulgular, metforminin, GSK-3 β ekspresyonunun azalttığını ve/veya inaktive ettiğini ve buna bağlı olarak nöronlarda aşırı glutamat uyarımına bağlı nörodejenerasyonu azalttığını, nörorejenerasyonu arttırdığını düşündürmektedir.

Bulgularımız aynı zamanda metforminin nöronlar üzerindeki bu protektif ve rejeneratif etkilerinin, yetersiz çinko diyeti ile beslenen gruplarda normal çinko ile beslenen gruplara göre daha az olduğunu ortaya koymaktadır (Şekil 19-22). Bu bulgular, metforminin GSK-3 β inhibisyonunu sadece AMPK-Akt yolakları üzerinden değil, çinko bağımlı yolakları da kullanarak yaptığını düşündürmektedir. Şöyle ki, Akt aktivasyonuna neden olan IRS-1 fosforilasyonu sadece AMPK aracılığıyla değil, direkt olarak hücre içi çinko aracılığıyla da gerçekleşebilir (189). Metformin bu aşamada çinkonun IRS-1 fosforilasyonuna ilave katkı sağlamasına neden olabilir. Bu nedenle yetersiz çinko diyeti ile beslenen sıçanlarda hücre içi çinko seviyelerindeki azalma, metforminin bu gruptaki sıçanlarda protektif ve rejeneratif etkilerinin daha düşük olmasından sorumlu olabilir. Diğer taraftan hücre içi bir diğer protein kinaz olan S6K'nın bazı çalışmalarda GSK-3 β 'da inhibisyon meydana getirdiği bildirilirken bazı

çalışmalarda aktivasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (190,191). S6K'nın GSK-3β üzerine etkisi dokular arasında farklılıklar gösterebilir. S6K'nın çinko tarafından aktive edildiği belirtilmiştir (192). Bu nedenle Metformin santral sinir sisteminde direkt S6K ekspresyonunu ve/veya aktivasyonunu arttırarak GSK-3β inhibisyonu yaratabilir. Konuya açıklık getirilebilmesi için metforminin beynin farklı bölgelerinde S6K ekspresyonuna veya aktivasyonuna etkisini ve GSK-3β ile ilişkisini araştıran ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Son zamanlarda glutamata bağlı nörotoksisitenin altında yatan bir çok mekanizma öne sürölmüştür. Bu bağlamda, mevcut kanıtlar, mitokondriyal solunum zincirindeki bozulmayı öne sürmektedir (193-194). Glutamat uyarımının, kalsiyum homeostazıyla ve mitokondriyal fonksiyonlarla güçlü bir şekilde ilişkili olduğu bilinmektedir (195).

Yapılan alışmalar, glutamat aracılı eksitotoksisitenin oksitadif stres ve mitokondriyal disfonksiyon ile ilişkili olduğunu öne sürmektedir (196,197) Apoptozun, normal beyin gelişimine ve/veya hücresele düzenlenmeye özgü gerekli bir proses olduğu, ancak, nörodejenerasyona sahip hastalarda, oksidatif stresin artışı ile bağlantılı olarak, mitokondriyal solunum mekanizmasının düzenlenmesinin net bir şekilde azaldığı bildirilmiştir (198-200) Glutamat eksitotoksisitesi ve buna bağlı artan oksidatif stres ile mitokondriyal fonksiyon bozukluklarının serebral iskemi, travmatik beyin hasarı, Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı, Alzheimer hastalığı ve amyotrofik lateral sklerozda nöronal ölümlerle sonuçlanan ortak özellik olduğu belirtilmiştir (201). Urrutia PJ ve arkadaşları (202), bir çok nörodejeneratif hastalıkların ortak patognomik bulgularının mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif hasar ve kronik inflamasyon olduğunu belirtmektedir.

Çalışmamızda da glutamat uygulanan sıçanların serumlarında ve beyin dokusu homojenatlarında oksidatif hasar parametrelerinin düzeylerinde artış olduğu belirlenmiştir. Oksidatif stres parametrelerinden lipid peroksidasyon belirteçleri olan MDA ve L-OOH; protein oksidasyon parametresi AOPP, kan ve beyin dokusunda artış gösterirken, glikasyon/glioksidasyon belirteçi olan AGE'nin sadece kanda artış gösterdiği, beyin dokusunda değişiklik göstermediği gözlenmiştir. Anti-oksidan enzimlerden Cu,Zn- SOD ve katalaz aktivitelerinin kanda anlamlı olarak azaldığı, Cu,Zn-SOD aktivitesinin beyin dokusunda değişiklik göstermediği belirlendi. Glutamat

reseptörlerinin beyin dışında testis (203,204) pankreas (205-207), akciğer (208), karaciğer (209), kalp (210) gibi periferik organlarda da bulunduğu çalışmalarda gösterilmiştir.

D-glutamik asit uygulamasına bağlı bu reseptörlerin aşırı uyarılması söz konusu organlarda AGE artışına neden olabilir. Bu durum kandaki AGE düzeylerinin artmasından sorumlu olabilir. Diğer taraftan Xiao-Ting Huang ve ark. (211) glutamat artışının, pankreas β -hücrelerinde NMDA reseptörlerinin aşırı aktivasyonu ile diyabet gelişimine katkıda bulunabileceğini, hipergliseminin β -hücrelerinin işlevini bozduğunu ve apoptozunu hızlandırdığını belirtmişlerdir. Ayrıca Weijun Shen ve ark. GSK-3 β (212) inhibisyonunun insan pankreas B-hücre proliferasyonunu indüklediğini göstermişlerdir. Bu bilgiler doğrultusunda, glutamat verilen sıçanlarda, NMDA reseptörlerinin aşırı uyarılması GSK-3 β ekspresyonunun ve/veya aktivasyonunun artmasına neden olarak pankreas beta hücrelerinde disfonksiyona yaratabilir. Bu durum kanda AGE düzeylerinin artmasına neden olabilir.

Diyabette AGE artışının nörodejenerasyona neden olabileceği bildirilmiştir. AGE'ler, glikoz gibi şekerler ile proteinler, lipidler ve nükleik asitlerdeki amino grupları arasındaki enzimatik olmayan bir reaksiyonla oluşmaya başlayan oksidasyona uğramış bileşikler grubudur (213). AGE'ler, reaktif oksijen türleri (ROS) ve inflamatuvar yanıt üreten ileri glikasyon son ürünleri reseptörlerini aktive eder (214). Reseptör ve AGE'ler arasındaki bu etkileşim süperoksit radikal anyonunun sentezinde artışa neden olur. Bu durum katalaz ve süperoksit dismutaz aktivitesini azaltır (214). Araştırmamızda glutamat verilen sıçanlarda kanda Cu, Zn SOD ve katalaz aktivitelerinin azalması, periferik dokularda artan ROS'u uzaklaştırmak amacıyla söz konusu antioksidanların kullanımının artmasına bağlı gelişmiş olabileceği düşüncesindeyiz.

Alzheimer hastalığında, AGE düzeylerinin kontrole göre üç kat daha yüksek olduğunu, AGE'lerin hem nörofibriler yumaklar hem de A β plakları ile kolokalize olduğu keşfedilmiştir (215). Ayrıca, AGE'lerin beyinin farklı bölgelerinde β -amiloid birikimini hızlandırarak hastalığın ilerlemesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (215). AGE birikiminin, AMPK'nın ve onun sinyal yollarının down-regülasyonuna neden olarak hNSC ölümünü ve mitokondriyal disfonksiyonu arttırdığı bildirilmiştir. (216).

Bu nedenlerle glutamat salgısındaki artışa bağlı kan AGE düzeylerinde artış nörodejenerasyona katkıda bulunabilir.

Diğer taraftan, glutamata bağlı hasar kortekste; hipokampüs, amigdala, bazal gangliyonlar gibi subkortikal yapıların her hangi birinde AGE artışına, Cu,Zn-SOD aktivitesinin azalmasına neden olabilir. Etkilenmeyen bölgeler, etkilenen bölgelerdeki söz konusu parametrelerdeki değişimleri maskeleyebilir.

Nörodejenerasyon çalışmalarının genellikle korteks, hipokampüs ve bazal gangliyonlarda yoğunlaştığı dikkati çekmiştir. Diğer taraftan Emma Perez-Costas ve ark. (36), fare beyinde ışık ve elektron mikroskobu çalışmaları ile GSK-3 β 'nin santral sinir sisteminde korteks, bazal gangliyon ve hipokampüste yoğunlaştığını göstermişlerdir. Bu nedenle çalışmamızda korteks ile hipokampüs ve bazal gangliyonları içeren subkortikal yapıları birlikte araştırdık.

Çalışmamızda, metformin verilen sıçanlarda (GM, GÇM) kanda ve dokuda oksidatif stres parametrelerinin verilmeyen sıçanlara (G, GÇ) göre anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır. Kan Cu,Zn-SOD ve katalaz aktivitelerinde ise anlamlı artışlar olduğu belirlenmiştir.

Çalışmalar (217-219), metforminin protektif etkilerinin, azalmış ROS üretimine ve pro-oksidanlar ile anti-oksidanlar arasında dengenin düzenlenmesine bağlı olduğunu ileri sürmektedir.

Zhao RR ve ark. (220) metformin tedavisinin farelerde pentilenetetrazol (PTZ) ile indüklenen epilepsi modellerinde, kognitif koruma sağladığı, oksidatif stresi azaltarak antioksidan özellik gösterdiğini ileri sürmüştür

Yapılan çalışmalar, oksidatif stresin ve dolayısıyla oksidize lipidler ve proteinler gibi belirteçlerin seviyesinin artmasının Alzheimer hastalığının patogenezinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir (221,222)., Chen Z, Zhong C (223), protein oksidasyonunun, Alzheimer hastalığındaki serebral glukoz metabolizmasını azaltarak nöronal dejenerasyona neden olduğunu ileri sürmüşlerdir. Apelt J ve ark. (224), hayvan model çalışmalarında reaktif azot metabolitlerindeki (RNS) artışın A β birikimiyle ilişkili olduğunu bildirmiştir. Diğer çalışmalar, A β 'nin mitokondriyal proteinlerle etkileşime girebileceğini ve daha sonra elektron transport zinciri fonksiyonunu bozabileceğini, mitokondriyal disfonksiyonu ve ROS oluşumunu stimüle ettiğini ileri sürmektedir (225).

Oksidatif stresin tau hiperfosforilasyonunu geliştirebileceği de bildirilmiştir (226).

Dopaminerjik nöronlarda GSK-3 β 'nin mitokondriyal disfonksiyona neden olarak ROS oluşumunu arttırdığı bildirilmiştir (227) . Araştırmamızda da, gerek normal çinko diyeti gerekse yetersiz çinko diyeti ile beslenen sıçanlarda glutamat uygulamasında gözlediğimiz oksidatif stres artışı GSK-3 β 'nin ekspresyonunun ve/veya aktivitesinin artışı ile ilişkili olabilir.

Çalışmamızda normal çinko diyeti ile beslenen sıçanlara metformin uygulaması, glutamat toksisitesinin yarattığı oksidatif hasarı kan ve beyin dokusu homojenatlarında anlamlı düzeyde azaltırken antioksidan parametrelerde anlamlı artış oluşturmuştur. Daha önce bahsedildiği gibi AGE birikiminin, AMPK 'nın ve onun sinyal yollarının down-regülasyonuna neden olabileceği ileri sürülmüştür (216). Çalışmamızda gözlediğimiz metforminin antioksidan etkisi AGE'nin neden olduğu AMPK 'nın ve onun sinyal yollarının down-regülasyonunu engellemesiyle ilgili olabilir. Diğer taraftan yetersiz çinko diyetiyle beslenen sıçanlara metformin uygulamasının, glutamat toksisitesinin beyin dokusunda yarattığı lipid peroksidasyonunu azaltmadığı dikkati çekmiştir. Bu bulgu metforminin özellikle beyin dokusunda glutamata bağlı gelişen lipid peroksidasyonunu engellemede çinkoya ihtiyaç duyduğunu göstermektedir.

Diğer çalışmaların ve kendi çalışmamızın bulgularına dayanarak metforminin GSK-3 β 'nin ekspresyonunu ve/veya aktivasyonunu direkt olarak ve çeşitli yollarla Akt aktivasyonu ile indirekt olarak azaltarak etki gösterebileceğini düşünebiliriz.

Araştırmamız beyinde metforminin GSK-3 β ve çinko ile ilişkisini araştıran ilk çalışmadır. Metforminin özellikle beyinin hangi bölgelerinde ve hangi yollar ile GSK-3 β yı etkilediğini, çinko yetersizliğinde metforminin antioksidan özelliğinin azalmasının nedenini açıklayan ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak glutamat aracılı beyin hasarında kortikal ve subkortikal organlar etkilenebilir. Glutamat salgısındaki artışın GSK-3 β aracılığı ile oksidatif stres artışına neden olabileceğini söyleyebiliriz. Bulgularımız, metforminin, santral sinir sistemindeki nöroprotektif etkilerini teyid etmektedir. Metformin glutamat aracılı nörodejenerasyonu

engelleyeabileceği gibi n6rorejenerasyonu arttırabilir. Bulgularımız, metforminin, n6roprotektif etkilerini GSK-3 β ekspresyonunu ve/veya aktivasyonunu azaltarak yapabileceğini d6ş6nd6rmektedir. Metforminin n6roprotektif ve n6rorejeneratif etkisinde AMPK aktivasyonunun yanı sıra inko aracılı eşitli yolaklar 6nemli rol oynayabilir.



5. KAYNAKLAR

- (1) Meldrum BS, Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology", *The Journal of Nutrition*, (April 2000) 130 (4S Suppl): 1007S–15S.
- (2) Jansen KLR, Faull RLM, Dragunow M. Excitatory amino acid receptors in the human cerebral cortex: a quantitative autoradiographic study comparing the distributions of [³H]TCP, [³H]glycine, [³H]AMPA and [³H]kainic acid binding sites, *Neuroscience* 1989; 32: 587-607
- (3) Li F, Tsien JZ, "Memory and the NMDA receptors". *N. Engl. J. Med.* (2009) 361 (3): 302–3. PMC 3703758
- (4) Hynd MR, Scott HL, Dodd PR, "Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease", *Neurochemistry International*, (October 2004), 45 (5): 583–95.
- (5) Abramov A. Y., Scorziello A., Duchen M. R. Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation, *Journal of Neuroscience*, 2007;27(5):1129–1138. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4468-06.2007.
- (6) Shinohe A, Hashimoto K, Nakamura K, Tsujii M, Iwata Y, Tsuchiya KJ, Sekine Y, Suda S, Suzuki K, Sugihara G, Matsuzaki H, Minabe Y, Sugiyama T, Kawai M, Iyo M, Takei N, Mori N, "Increased serum levels of glutamate in adult patients with autism", *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, (December 2006), 30 (8): 1472–7.
- (7) Manev H, Favaron M, Guidotti A, Costa E, "Delayed increase of Ca²⁺ influx elicited by glutamate: role in neuronal death", *Molecular Pharmacology*, (July 1989), 36 (1): 106–12.
- (8) Murphy, Michael P, "Nitric oxide and cell death", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics* (1999-05-05), 1411 (2): 401–414.
- (9) Kirpichnikov D, McFarlane SI, Sowers JR. Metformin: an update [PDF], *Ann Intern Med.*, 2002;137(1):25–33.
- (10) Collier CA, Bruce CR, Smith AC, Lopaschuk G, Dyck DJ. Metformin counters the insulin-induced suppression of fatty acid oxidation and stimulation of triacylglycerol storage in rodent skeletal muscle, *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 2006;291(1):E182–E189.
- (11) Alexander SP, Benson HE, Faccenda E, Pawson AJ, Sharman JL, Spedding M, Peters JA, Harmar AJ, CGTP Collaborators. *Br J Pharmacol. The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14: enzymes.* 2013 Dec; 170(8):1797-867.
- (12) Russo GL, Russo M, Ungaro, P. AMP-activated protein kinase: a target for old drugs against diabetes and cancer, *Biochem Pharmacol.*, 2013 Aug 1; 86(3):339-50.
- (13) P. Marchetti, S. Del Guerra, L. Marselli et al., "Pancreatic islets from type 2 diabetic patients have functional defects and increased apoptosis that are ameliorated by metformin," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 89, no. 11, pp. 5535–5541, 2004.
- (14) Ashabi G, Khalaj L, Khodaghali F, Goudarzvand M, Sarkaki A, Pre-treatment with metformin activates Nrf2 antioxidant pathways and inhibits

- inflammatory responses through induction of AMPK after transient global cerebral ischemia. *Metab Brain Dis*, (2015) 30:747–754
- (15) Jiang T, Yu JT, Zhu XC, Wang HF, Tan MS, Cao L, Zhang QQ, Gao L, Shi JQ, Zhang YD, Tan L, Acute metformin preconditioning confers neuroprotection against focal cerebral ischaemia by pre-activation of AMPK-dependent autophagy. *Br J Pharmacol* (2014) 171:3146–3157
- (16) Jin Q, Cheng J, Liu Y, Wu J, Wang X, Wei S, Zhou X, Qin Z, Jia J, Zhen X Improvement of functional recovery by chronic metformin treatment is associated with enhanced alternative activation of microglia/macrophages and increased angiogenesis and neurogenesis following experimental stroke, *Brain Behav Immun*, (2014) 40:131–142
- (17) Moritz M, Hettich, Frank Matthes, Devon P. Ryan, Nadine Griesche, Susanne Schröder, Stephanie Dorn, Sybille Krauß, Dan Ehninger, The Anti-Diabetic Drug Metformin Reduces BACE1 Protein Level by Interfering with the MID1 Complex, *PLoS One*. 2014; 9(7): e102420
- (18) Cops KD, White MF, "Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2". *Diabetologia*. (October 2012) 55 (10): 2565–82
- (19) Xu X, Sarikas A, Dias-Santagata DC, Dolios G, Lafontant PJ, Tsai SC, Zhu W, Nakajima H, Nakajima HO, Field LJ, Wang R, Pan ZQ, "The CUL7 E3 ubiquitin ligase targets insulin receptor substrate 1 for ubiquitin-dependent degradation". *Molecular Cell*, (May 2008) 30 (4): 403–14.
- (20) Watcharasit P, Bijur GN, Zmijewski JW, Song L, Zmijewska A, Chen X, Johnson GV, Jope RS, "Direct, activating interaction between glycogen synthase kinase-3beta and p53 after DNA damage.", *Proc Natl Acad Sci USA*, (Jun 2002). 99 (12): 7951–5.
- (21) Sutherland C, Leighton IA, Cohen P, Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signaling, *Biochem J*, 1993 Nov 15; 296 (Pt 1):15-9.
- (22) Hanumanthappa P, Densi A, Krishnamurthy RG, Glycogen synthase kinase-β3 in ischemic neuronal death. *Curr Neurovasc Res*. 2014;11(3):271-8.
- (23) Caricasole A, Copani A, Caraci F, Aronica E, Rozemuller AJ, Caruso A, Storto M, Gaviraghi G, Terstappen GC, Nicoletti F, Induction of Dickkopf-1, a negative modulator of the Wnt pathway, is associated with neuronal degeneration in Alzheimer's brain., *J Neurosci*. 2004 Jun 30; 24(26):6021-7.
- (24) Alvarez G, Muñoz-Montaña JR, Satrústegui J, Avila J, Bogónez E, Díaz-Nido J, Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration, *FEBS Lett*. 1999 Jun 25; 453(3):260-4.
- (25) De-Maw Chuang, Zhifei Wang, and Chi-Tso Chiu, GSK-3 as a Target for Lithium-Induced Neuroprotection Against Excitotoxicity in Neuronal Cultures and Animal Models of Ischemic Stroke, *Front Mol Neurosci*. 2011; 4: 15.
- (26) Loberg RD, Vesely E, Brosius FC 3rd J, Enhanced glycogen synthase kinase-3beta activity mediates hypoxia-induced apoptosis of vascular smooth muscle cells and is prevented by glucose transport and metabolism, *Biol Chem*. 2002 Nov 1; 277(44):41667-73.

- (27) Hashimoto M, Sagara Y, Langford D, Everall IP, Mallory M, Everson A, Digicaylioglu M, Masliah EJ, Fibroblast growth factor 1 regulates signaling via the glycogen synthase kinase-3 β pathway, Implications for neuroprotection. *Biol Chem.* 2002 Sep 6; 277(36):32985-91.
- (28) Jacobs KM, Bhave SR, Ferraro DJ, Jaboin JJ, Hallahan DE, Thotala D "GSK-3 β : A Bifunctional Role in Cell Death Pathways." *Int J Cell Bio.*, 2012: 930710
- (29) James A. McCubrey, Linda S. Steelman, Fred E. Bertrand, Nicole M. Davis, Melissa Sokolosky, Steve L. Abrams, Giuseppe Montalto, Antonino B. D'Assoro, Massimo Libra, Ferdinando Nicoletti, Roberta Maestro, Jorg Basecke, Dariusz Rakus, Agnieszka Gizak, Zoya Demidenko, Lucio Cocco, Alberto M. Martelli, and Melchiorre Cervello: GSK-3 as potential target for therapeutic intervention in cancer, *Oncotarget*, 2014 May; 5(10): 2881–2911.
- (30) Ilouz R, Kaidanovich O, Gurwitz D, Eldar-Finkelman H., Inhibition of glycogen synthase kinase-3 β by bivalent zinc ions: insight into the insulin-mimetic action of zinc., *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Jul 5;295(1):102-6.
- (31) K. L. Kelly and N. B. Ruderman, Insulin-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase association with a 185-kDa tyrosine-phosphorylated protein (IRS-1) and localization in a low density membrane vesicle, *J. Biol. Chem.* 268, 4391–4398 (1993).
- (32) Frederickson CJ, Koh JY, Bush AI, The neurobiology of zinc in health and disease., *Nat Rev Neurosci.* 2005 Jun; 6(6):449-62.
- (33) F. J. Jiménez-Jiménez, J. A. Molina, M. V. Aguilar et al., "Cerebrospinal fluid levels of transition metals in patients with Parkinson's disease," *Journal of Neural Transmission*, vol. 105, no. 4-5, pp. 497–505, 1998.
- (34) L. L. Rulon, J. D. Robertson, M. A. Lovell, M. A. Deibel, W. D. Ehmann, and W. R. Markesbery, "Serum zinc levels and Alzheimer's disease," *Biological Trace Element Research*, vol. 75, no. 1–3, pp. 79–85, 2000.
- (35) Jan Lewerenz and Pamela Maher . Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases—What is the Evidence? *Front Neurosci.* 2015; 9: 469.
- (36) Emma Perez-Costas *et al.* Light and Electron Microscopy Study of Glycogen Synthase Kinase-3 β in the Mouse Brain, *PLoS ONE* 5(1): e8911.
- (37) McEntee WJ, Crook TH, "Glutamate: its role in learning, memory, and the aging brain", *Psychopharmacology*, (1993) 111 (4): 391–401.
- (38) Okubo Y, Sekiya H, Namiki S, Sakamoto H, Iinuma S, Yamasaki M, Watanabe M, Hirose K, Iino M, "Imaging extrasynaptic glutamate dynamics in the brain". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, (April 2010) 107 (14): 6526–31
- (39) Bak, Lasse K.; Schousboe, Arne; Waagepetersen, Helle S. "The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer". *Journal of Neurochemistry*, (2006) 98 (3): 641.
- (40) Ganel R, Rothstein JD, "Chapter 15, Glutamate transporter dysfunction and neuronal death". In Monyer, Hannah, Gabriel A. Adelman, Jonas, Peter. *Ionotropic glutamate receptors in the CNS*. Berlin: Springer. pp. (1999) 472–493

- (41) Zerangue, N, Kavanaugh, MP, "Flux coupling in a neuronal glutamate transporter". *Nature*, (1996) 383 (6601): 634–37
- (42) Shigeri Y, Seal RP, Shimamoto K, "Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs". *Brain Res. Brain Res. Rev.*, (2004) 45 (3): 250–65.
- (43) Zou JY, Crews FT, "TNF alpha potentiates glutamate neurotoxicity by inhibiting glutamate uptake in organotypic brain slice cultures: neuroprotection by NF kappa B inhibition" (2005).
- (44) Danbolt NC (2001). "Glutamate uptake". *Prog. Neurobiol.* 65 (1): 1–105.
- (45) E. R. Kandel, J. H. Schwartz, T. M. Jessell, S. A. Siegelbaum, A. J. Hudspeth, *Principles of neural science*, 5th ed., The McGraw-Hill Companies, Inc., 2013, p. 304
- (46) Lehre KP, Levy LM, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC (1995). "Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations". *J Neurosci.* 15 (3): 1835–53
- (47) Furness DN, Dehnes Y, Akhtar AQ, Rossi DJ, Hamann M, Grutle NJ, Gundersen V, Holmseth S, Lehre KP, Ullensvang K, Wojewodzic M, Zhou Y, Attwell D, Danbolt NC (2008).
- (48) Holmseth S, Scott HA, Real K, Lehre KP, Leergaard TB, Bjaalie JG, Danbolt NC (2009). "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.* 162 (4): 1055–71.
- (49) Underhill SM, Wheeler DS, Li M, Watts SD, Ingram SL, Amara SG (July 2014). "Amphetamine modulates excitatory neurotransmission through endocytosis of the glutamate transporter EAAT3 in dopamine neurons". *Neuron.* 83
- (50) Pow DV, Barnett NL (2000). "Developmental expression of excitatory amino acid transporter 5: a photoreceptor and bipolar cell glutamate transporter in rat retina". *Neurosci. Lett.* 280 (1): 21–4.
- (51) Bai, L., Zhang, X., and Ghishan, F. K. (2003) *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 284, G808 –G814
- (52) Hayashi, M., Yamada, H., Uehara, S., Morimoto, R., Muroyama, A., Yatsushiro, S., Takeda, J., Yamamoto, A., and Moriyama, Y. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 1966 –1974
- (53) Cho, J. H., Chen, L., Kim, M. H., Chow, R. H., Hille, B., and Koh, D. S. (2010) *Endocrinology* 151, 1541–1550 15. Cabrera, O., Jacques-Silva, M. C., Speier, S., Yang, S. N., Kohler, M.,
- (54) Fachado, A., Vieira, E., Zierath, J. R., Kibbey, R., Berman, D. M., Kenyon, N. S., Ricordi, C., Caicedo, A., and Berggren, P. O. (2008) *Cell Metab.*, 7, 545–554
- (55) Naito S, Ueda T (January 1983). "Adenosine triphosphate-dependent uptake of glutamate into protein I-associated synaptic vesicles". *J. Biol. Chem.* 258 (2): 696–9.
- (56) Gras C, Herzog E, Bellenchi GC, Bernard V, Ravassard P, Pohl M, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S (2002). "A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons". *The Journal of*

- Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience. 22 (13): 5442–51.
- (57) Ruel J, Emery S, Nouvian R, Bersot T, Amilhon B, Van Rybroek JM, Rebillard G, Lenoir M, Eybalin M, Delprat B, Sivakumaran TA, Giros B, El Mestikawy S, Moser T, Smith RJ, Lesperance MM, Puel JL (2008). "Impairment of SLC17A8 encoding vesicular glutamate transporter-3, VGLUT3, underlies nonsyndromic deafness DFNA25 and inner hair cell dysfunction in null mice". *American Journal of Human Genetics*. 83 (2): 278–92.
- (58) Muroyama, A., Uehara, S., Yatsushiro, S., Echigo, N., Morimoto, R., Morita, M., Hayashi, M., Yamamoto, A., Koh, D. S., and Moriyama, Y. (2004) *Diabetes* 53, 1743–1753
- (59) Kim AH, Kerchner GA, Choi DW (2002). "Chapter 1, Blocking Excitotoxicity". In Marcoux, Frank W. *CNS neuroprotection*. Berlin: Springer. pp. 3–36.
- (60) Yi JH, Hazell AS (2006). "Excitotoxic mechanisms and the role of astrocytic glutamate transporters in traumatic brain injury". *Neurochem. Int.* 48 (5): 394–403.
- (61) McClure EA, Gipson CD, Malcolm RJ, Kalivas PW, Gray KM (2014). "Potential role of N-acetylcysteine in the management of substance use disorders". *CNS Drugs*. 28 (2): 95–106
- (62) Debanne D, Daoudal G, Sourdet V, Russier M (2003). "Brain plasticity and ion channels". *J. Physiol. Paris*. 97 (4–6): 403–14.
- (63) Maren S, Tocco G, Standley S, Baudry M, Thompson RF (1993). "Postsynaptic factors in the expression of long-term potentiation (LTP): increased glutamate receptor binding following LTP induction in vivo". *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 90 (20): 9654–8.
- (64) Weiler IJ, Greenough WT (August 1993). "Metabotropic glutamate receptors trigger postsynaptic protein synthesis". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (15): 7168–71.
- (65) Steinhäuser C, Gallo V (August 1996). "News on glutamate receptors in glial cells". *Trends Neurosci.* 19 (8): 339–45.
- (66) Crowder JM, Croucher MJ, Bradford HF, Collins JF (June 1987). "Excitatory amino acid receptors and depolarization-induced Ca²⁺ influx into hippocampal slices". *J. Neurochem.* 48 (6): 1917–24.
- (67) Gover TD, Moreira TH, Weinreich D (2009). "Role of calcium in regulating primary sensory neuronal excitability". *Handb Exp Pharmacol.* 194 (194): 563–87.
- (68) J. Moskal, D. Leander, R. Burch (2010). *Unlocking the Therapeutic Potential of the NMDA Receptor*. *Drug Discovery & Development News*.
- (69) Ludolph, AG; Udvardi, PT; Schaz, U; Henes, C; Adolph, O; Weigt, HU; Fegert, JM; Boeckers, TM; Föhr, KJ (2013-05-08). "Atomoxetine acts as an NMDA receptor blocker in clinically relevant concentrations". *British Journal of Pharmacology*. 160: 283–291. PMC 2874851
- (70) Neal, April P.; Stansfield, Kirstie H.; Worley, Paul F.; Thompson, Richard E.; Guilarte, Tomás R. (2010). "Lead Exposure during Synaptogenesis Alters

- Vesicular Proteins and Impairs Vesicular Release: Potential Role of NMDA Receptor-Dependent BDNF Signaling", *Toxicol Sci.* 2010 Jul;116(1):249-63.
- (71) Michelle S. Horning and Paul Q. Trombley. (2001) Zinc and Copper Influence Excitability of Rat Olfactory Bulb Neurons by Multiple Mechanisms. *J Neurophysiol* 86: 1652–1660
- (72) Paoletti, P., Ascher, P. & Neyton, J. High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1–NR2A receptors. *J. Neurosci.* 17, 5711–5725 (1997).
- (73) Fayyazuddin, A., Villarroel, A., Le Goff, A., Lerma, J. & Neyton, J. Four residues of the extracellular N-terminal domain of the NR2A subunit control high-affinity Zn²⁺ binding to NMDA receptors. *Neuron* 25, 683–694 (2000).
- (74) Gielen, M., Sieglér Retchless, B., Mony, L., Johnson, J.W. & Paoletti, P. Mechanism of differential control of NMDA receptor activity by NR2 subunits. *Nature* 459, 703–707 (2009).
- (75) Stephen F. Traynelis, Michele F. Burgess, Fang Zheng, Polina Lyuboslavsky and Jennifer L. Powers, Control of Voltage-Independent Zinc Inhibition of NMDA Receptors by the NR1 Subunit, *Journal of Neuroscience* 15 August 1998, 18 (16) 6163-6175
- (76) Michael Hollmann, Jim Boulter, Cornelia Maron, Lora Beasley, Jane Sullivan, Gerlinde Pecht, Stephen Heinemann, Zinc potentiates agonist-induced currents at certain splice variants of the NMDA receptor, *Science* 10, 943-954(1993)
- (77) Cecília R. A. Santos, Ana Martinho, Telma Quintela, Isabel Gonçalves Neuroprotective and neuroregenerative properties of metallothioneins. *Life* 64;126-135(2011)
- (78) Shi SH, Hayashi Y, Petralia RS, et al. (1999). "Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation". *Science*. 284 (5421): 1811–6.
- (79) Greger IH, Ziff EB, Penn AC (August 2007). "Molecular determinants of AMPA receptor subunit assembly". *Trends Neurosci.* 30 (8): 407–16.
- (80) Hollmann M, Maron C, Heinemann S (1994). "N-glycosylation site tagging suggests a three transmembrane domain topology for the glutamate receptor GluR1". *Neuron*. 13(6): 1331–43
- (81) Boehm J, Kang MG, Johnson RC, Esteban J, Huganir RL, Malinow R (July 2006). "Synaptic incorporation of AMPA receptors during LTP is controlled by a PKC phosphorylation site on GluR1". *Neuron*. 51 (2): 213–25.
- (82) Hayashi Y, Shi SH, Esteban JA, Piccini A, Poncer JC, Malinow R (March 2000). "Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction". *Science*. 287 (5461): 2262–7. PMID 10731148. doi:10.1126/science.287.5461.2262.
- (83) Derkach V, Barria A, Soderling TR (March 1999). "Ca²⁺/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (6): 3269–74.
- (84) Mayer, M. L. (2005). "Glutamate receptor ion channels". *Current Opinion in Neurobiology.* 15 (3): 282–288.

- (85) Derkach V, Barria A, Soderling TR (March 1999). "Ca²⁺/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (6): 3269–74.
- (86) Armstrong N, Jasti J, Beich-Frandsen M, Gouaux E (October 2006). "Measurement of conformational changes accompanying Desensitization in an Ionotropic Glutamate Receptor, Volume 127, Issue 1, 6 October 2006, Pages 85–97
- (87) Platt SR (2007). "The role of glutamate in central nervous system health and disease--a review". *Vet. J.* 173 (2): 278–86.
- (88) Kim DY, Kim SH, Choi HB, Min C, Gwag BJ (2001). "High abundance of GluR1 mRNA and reduced Q/R editing of GluR2 mRNA in individual NADPH-diaphorase neurons". *Mol. Cell. Neurosci.* 17 (6): 1025–33.
- (89) Fukunaga K, Stoppini L, Miyamoto E, Muller D (April 1993). "Long-term potentiation is associated with an increased activity of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II". *J. Biol. Chem.* 268 (11): 7863–7.
- (90) Lisman J, Schulman H, Cline H (March 2002). "The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory". *Nat. Rev. Neurosci.* 3 (3): 175–90.
- (91) Mammen AL, Kameyama K, Roche KW, Huganir RL (December 1997). "Phosphorylation of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole4-propionic acid receptor GluR1 subunit by calcium/calmodulin-dependent kinase II". *J. Biol. Chem.* 272(51): 32528–33.
- (92) Mauceri D, Cattabeni F, Di Luca M, Gardoni F (May 2004). "Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation drives synapse-associated protein 97 into spines". *J. Biol. Chem.* 279 (22): 23813–21.
- (93) Wu H, Nash JE, Zamorano P, Garner CC (August 2002). "Interaction of SAP97 with minus-end-directed actin motor myosin VI. Implications for AMPA receptor trafficking". *J. Biol. Chem.* 277 (34): 30928–34
- (94) Zhu JJ, Qin Y, Zhao M, Van Aelst L, Malinow R (August 2002). "Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity". *Cell.* 110 (4): 443–55.
- (95) Borgdorff AJ, Choquet D (June 2002). "Regulation of AMPA receptor lateral movements". *Nature.* 417 (6889): 649–53.
- (96) Park M, Penick EC, Edwards JG, Kauer JA, Ehlers MD (September 2004). "Recycling endosomes supply AMPA receptors for LTP". *Science.* 305 (5692): 1972–5.
- (97) Howard MA, Elias GM, Elias LA, Swat W, Nicoll RA (February 2010). "The role of SAP97 in synaptic glutamate receptor dynamics". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107(8): 3805–10.
- (98) Malenka RC (November 2003). "Synaptic plasticity and AMPA receptor trafficking". *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1003: 1–11.
- (99) Kessels HW, Malinow R (February 2009). "Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior". *Neuron.* 61 (3): 340–50.

- (100) Jung N, Haucke V (September 2007). "Clathrin-mediated endocytosis at synapses". *Traffic*. 8 (9): 1129–36.
- (101) Ehlers, MD (2000). "Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting". *Neuron*. 28 (2): 511–25.
- (102) Carroll RC, Beattie EC, Xia H, Lüscher C, Altschuler Y, Nicoll RA, Malenka RC, von Zastrow M (November 1999). "Dynamin-dependent endocytosis of ionotropic glutamate receptors". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (24): 14112–7.
- (103) Contractor A, Mulle C, Swanson GT (2011). "Kainate receptors coming of age: milestones of two decades of research.". *Trends Neurosci.* 34 (3): 154–63.
- (104) Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999). "The glutamate receptor ion channels" (abstract). *Pharmacol. Rev.* 51 (1): 7–61.
- (105) Chu Z, Hablitz JJ (October 2000). "Quisqualate induces an inward current via mGluR activation in neocortical pyramidal neurons". *Brain Research*. 879 (1–2): 88–92.
- (106) Platt SR (March 2007). "The role of glutamate in central nervous system health and disease--a review". *Veterinary Journal*. 173 (2): 278–86.
- (107) Gabriel L, Lvov A, Orthodoxou D, Rittenhouse AR, Kobertz WR, Melikian HE (September 2012). "The acid-sensitive, anesthetic-activated potassium leak channel, KCNK3, is regulated by 14-3-3 β -dependent, protein kinase C (PKC)-mediated endocytic trafficking". *The Journal of Biological Chemistry*. 287 (39): 32354–66.
- (108) Sladeczek F., Momiyama A., Takahashi T. (1992). "Presynaptic inhibitory action of metabotropic glutamate receptor agonist on excitatory transmission in visual cortical neurons". *Proc. Roy. Soc. Lond. B* 1993 253, 297-303.
- (109) Endoh T (October 2004). "Characterization of modulatory effects of postsynaptic metabotropic glutamate receptors on calcium currents in rat nucleus tractus solitarius". *Brain Research*. 1024 (1–2): 212–24.
- (110) El Moustaine D, Granier S, Doumazane E, Scholler P, Rahmeh R, Bron P, Mouillac B, Banères JL, Rondard P, Pin JP (October 2012). "Distinct roles of metabotropic glutamate receptor dimerization in agonist activation and G-protein coupling". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109(40): 16342–7.
- (111) Bates B, Xie Y, Taylor N, Johnson J, Wu L, Kwak S, Blatcher M, Gulukota K, Paulsen JE (December 2002). "Characterization of mGluR5R, a novel, metabotropic glutamate receptor 5-related gene". *Brain Research. Molecular Brain Research*. 109 (1–2): 18–33.
- (112) MRC (Medical Research Council), Glutamate receptors: Structures and functions. Archived 2007-09-15 at the Wayback Machine., University of Bristol Centre for Synaptic Plasticity (2003).
- (113) Shigemoto R, Kinoshita A, Wada E, Nomura S, Ohishi H, Takada M, Flor PJ, Neki A, Abe T, Nakanishi S, Mizuno N (October 1997). "Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus". *J Neurosci*. 1997 Oct 1;17(19):7503-22.
- (114) Makoff A , Lelchuk R , Oxer M , Harrington K , Emson P , Molecular characterization and localization of human metabotropic glutamate receptor type 4.,

- Brain Research. Molecular Brain Research [01 Apr 1996, 37(1-2):239-248] (PMID:8738157).
- (115) Skeberdis VA, Lan J, Opitz T, Zheng X, Bennett MV, Zukin RS (June 2001). "mGluR1-mediated potentiation of NMDA receptors involves a rise in intracellular calcium and activation of protein kinase C". *Neuropharmacology*. 40 (7): 856–65.
- (116) Stryer, Lubert (1995). *Biochemistry*. (Fourth ed.). New York: W.H. Freeman and Company. pp. 773–774.
- (117) Jansen E, Ayoubi TA, Meulemans SM, Van de Ven WJ (June 1995). "Neuroendocrine-specific expression of the human prohormone convertase 1 gene. Hormonal regulation of transcription through distinct cAMP response elements". *J. Biol. Chem.* 270(25): 15391–7.
- (118) Patil C, Walter P, Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals.
- (119) Hara T, Takeda TA, Takagishi T, Fukue K, Kambe T, Fukada T (2017). "Physiological roles of zinc transporters: molecular and genetic importance in zinc homeostasis". *J Physiol Sci.* 67 (2): 283–301.
- (120) Nolan, Chris; Margoliash, E.; Peterson, James D.; Steiner, Donald F. (1971-05-10). "The Structure of Bovine Proinsulin". *Journal of Biological Chemistry*. 246(9): 2780–2795.
- (121) Weiss, Michael A. (2009-07-17). "Proinsulin and the Genetics of Diabetes Mellitus". *Journal of Biological Chemistry*. 284 (29): 19159–19163.
- (122) Hua, Q.X. et al. The folding nucleus of the insulin superfamily: a flexible peptide model foreshadows the native state. *J. Biol. Chem.* 2006; 281:
- (123) Petersen AB1, Smidt K, Magnusson NE, Moore F, Egefjord L, Rungby J., siRNA-mediated knock-down of ZnT3 and ZnT8 affects production and secretion of insulin and apoptosis in INS-1E cells, *APMIS*. 2011 Feb;119(2):93-102. doi: 10.1111/j.1600-0463.2010.02698.x. Epub 2010 Dec 1.
- (124) Smidt K1,2, Larsen A3, Brønden A4, Sørensen KS3, Nielsen JV3, Praetorius J3, Martensen PM5, Rungby J3,4,6, The zinc transporter ZNT3 co-localizes with insulin in INS-1E pancreatic beta cells and influences cell survival, insulin secretion capacity, and ZNT8 expression, *Biometals*. 2016 Apr;29(2):287-98. doi: 10.1007/s10534-016-9915-7. Epub 2016 Feb 11.
- (125) Pal R, Bondar VV, Adamski CJ, Rodney GG, Sardiello M (2017). "Inhibition of ERK1/2 Restores GSK3 β Activity and Protein Synthesis Levels in a Model of Tuberous Sclerosis". *Sci. Rep.* 7 (1): 4174.
- (126) Plyte SE, Hughes K, Nikolakaki E, Pulverer BJ, Woodgett JR (Dec 1992). "Glycogen synthase kinase-3: functions in oncogenesis and development". *Biochimica et Biophysica Acta*. 1114 (2–3): 147–62.
- (127) *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 295, Issue 1, 5 July 2002, Pages 102–106
- (128) Ronit Ilouz, Oksana Kaidanovich, David Gurwitz, Hagit Eldar-Finkelman, Inhibition of glycogen synthase kinase-3 Beta by bivalent zinc ions: insight into the insulin-mimetic action of zinc.

- (129) King, D; Yeomanson, D; Bryant, HE (24 March 2015). "PI3King the Lock: Targeting the PI3K/Akt/mTOR Pathway as a Novel Therapeutic Strategy in Neuroblastoma". *Journal of pediatric hematology/oncology*. 37 (4): 245–51.
- (130) Montminy MR and Bilezikjian LM. , Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature*. 1987 Jul 9-15;328(6126):175-8.
- (131) Purves, Dale; George J. Augustine; David Fitzpatrick; William C. Hall; Anthony-Samuel LaMantia; James O. McNamara & Leonard E. White (2008). *Neuroscience* (4th ed.). Sinauer Associates. pp. 170–6.
- (132) Silva; et al. "CREB and Memory". *Annual Review of Neuroscience*. 21: 127–148.
- (133) Peltier, J; O'Neill, A; Schaffer, D. V. (2007). "PI3K/Akt and CREB regulate adult neural hippocampal progenitor proliferation and differentiation". *Developmental Neurobiology*. 67 (10): 1348–61.
- (134) Zhang X, Tang N, Hadden TJ, Rishi AK (2011). "Akt, FoxO and regulation of apoptosis". *Biochim Biophys Acta*. 1813 (11): 1978–1986
- (135) Du K, Montminy M (1998). "CREB Is a Regulatory Target for the Protein Kinase Akt/PKB". *J Biol Chem*. 273 (49): 32377–32379.
- (136) Embi N, Rylatt DB, Cohen P (June 1980). "Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase". *Eur J Biochem*. 107 (2): 519–27.
- (137) Lochhead PA, Coghlan M, Rice SQ, Sutherland C (May 2001). "Inhibition of GSK-3 selectively reduces glucose-6-phosphatase and phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression.". *Diabetes*. 50 (5): 937–46.
- (138) Mills CN, Newshean S, Bonner JA, Yang ES (2011). "Emerging roles of glycogen synthase kinase 3 in the treatment of brain tumors.". *Front Mol Neurosci*. 4: 47.
- (139) Watcharasit P, Bijur GN, Zmijewski JW, Song L, Zmijewska A, Chen X, Johnson GV, Jope RS (Jun 2002). "Direct, activating interaction between glycogen synthase kinase-3beta and p53 after DNA damage.". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99 (12): 7951–5.
- (140) Kotliarova S, Pastorino S, Kovell LC, Kotliarov Y, Song H, Zhang W, Bailey R, Maric D, Zenklusen JC, Lee J, Fine HA (Aug 2008). "Glycogen synthase kinase-3 inhibition induces glioma cell death through c-MYC, nuclear factor-kappaB, and glucose regulation.". *Cancer Res*. 68 (16): 6643–51.
- (141) Jope RS, Yuskaitis CJ, Beurel E (Apr–May 2007). "Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics.". *Neurochem Res*. 32(4–5): 577–95.
- (142) E Beurel, L Song, and RS Jope, Inhibition of glycogen synthase kinase-3 is necessary for the rapid antidepressant effect of ketamine in mice, *Mol Psychiatry*. 2011 Nov; 16(11): 1068–1070.
- (143) Hu S, Begum AN, Jones MR, Oh MS, Beech WK, Beech BH, Yang F, Chen P, Ubeda OJ, Kim PC, Davies P, Ma Q, Cole GM, Frautschy SA (Feb 2009). "GSK3 inhibitors show benefits in an Alzheimer's disease (AD) model of neurodegeneration but adverse effects in control animals.". *Neurobiol Dis*. 33 (2): 193–206. PMID

- (144) Hundal R, Krssak M, Dufour S, Laurent D, Lebon V, Chandramouli V, Inzucchi S, Schumann W, Petersen K, Landau B, Shulman G. Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2000;49(12):2063–9. doi:10.2337/diabetes.49.12.2063
- (145) Collier CA, Bruce CR, Smith AC, Lopaschuk G, Dyck DJ. Metformin counters the insulin-induced suppression of fatty acid oxidation and stimulation of triacylglycerol storage in rodent skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;291(1):E182–E189.
- (146) Rena G, Pearson ER, Sakamoto K (September 2013). "Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights?". *Diabetologia*. 56 (9): 1898–906.
- (147) Kim YD, Park KG, Lee YS, et al. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis through AMP-activated protein kinase-dependent regulation of the orphan nuclear receptor SHP. *Diabetes*. 2008;57(2):306–14.
- (148) Musi N, Hirshman MF, Nygren J, et al. Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002;51(7):2074–81.
- (149) Jeon, SM (15 July 2016). "Regulation and function of AMPK in physiology and diseases.". *Experimental & molecular medicine*. 48 (7): e245.
- (150) Saeedi R, Parsons HL, Wambolt RB, et al. Metabolic actions of metformin in the heart can occur by AMPK-independent mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;294(6):H2497–506.
- (151) Gustavo DiasFerreira, ArianeGermeyer *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, Volume 175, April 2014, Pages 157-162
- (152) Metformin modulates PI3K and GLUT4 expression and Akt/PKB phosphorylation in human endometrial stromal cells after stimulation with androgen and insulin" *J Endocrinol*. 2016 May;229(2)
- (153) Xu H, Zhou Y, Liu Y, Ping J, Shou Q, Chen F, Ruo R, Metformin improves hepatic IRS2/PI3K/Akt signaling in insulin-resistant rats of NASH and cirrhosis.
- (154) Wang DD, Bordey A . "The astrocyte odyssey". *Prog. Neurobiol*. December 2008; 86 (4): 342–67
- (155) Rachana Garg et al. Protein Kinase C and cancer: what we know and what we do not. *Oncogene*. 2014 Nov 6; 33(45): 5225–5237.
- (156) Zarate CA, Manji HK. Protein kinase C inhibitors: rationale for use and potential in the treatment of bipolar disorder. *CNS Drugs*. 2009;23(7):569-82.
- (157) Marchi N, Angelov L, Masaryk T, Fazio V, Granata T, Hernandez N, Hallene K, Diglaw T, Franic L, Najm I, Janigro D (April 2007). "Seizure-promoting effect of blood–brain barrier disruption". *Epilepsia*. 48 (4): 732–42.
- (158) Wu YH, Wang HJ, Wang X. Expression of S100B and GFAP after primary brainstem injury in rat. *Fa Yi Xue Za Zhi*. 2015 Feb;31(1):11-4
- (159) Guglielmo Sorci et al. S100B protein in tissue development, repair and regeneration. *World J Biol Chem*. 2013 Feb 26; 4(1): 1–12.
- (160) Choi YH, Kim SG, Lee MG. Dose-independent pharmacokinetics of metformin in rats: Hepatic and gastrointestinal first-pass effects. *J Pharm Sci*. 2006 Nov; 95(11):2543-52.

- (161) Yi-Wei Wang et al. Metformin: a review of its potential indications. *Drug Des Devel Ther.* 2017; 11: 2421–2429.
- (162) S.P.PatilP.D.JainP.J.GhumatkarR.TambeS.Sathaye. Neuroprotective effect of metformin in MPTP-induced Parkinson's disease in mice. *Neuroscience.* 2014; 277: 747-757
- (163) Mushahwar, I.K. & Koeppe, R.E. *Biochim. Biophys. Acta.*1971; 244, 318-321.
- (164) Sadowska-Bartosz, I. et al., 2014. Oxidative modification of proteins in pediatric cystic fibrosis with bacterial infections. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, pp.1–10.
- (165) Yanar, K. et al., 2015. Ameliorative effects of testosterone administration on renal redox homeostasis in naturally aged rats. *Rejuvenation Research*, 18(4), pp.299–313.
- (166) Reznick, A.Z. & Packer, L., 1994. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in Enzymology*, 233, pp.357–363.
- (167) Hanasand, M. et al., 2012. Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. *Clinica Chimica Acta*, 413(9-10), pp.901–906.
- (168) Sedlak, J. & Lindsay, R.H., 1968. Estimation of total , protein-bound , and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent . *Analytic Biochemistry*, 25(1), pp.192–205.
- (169) Buege, J.. & Aust, S., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52, pp.302–310.
- (170) Wolff, S.P., 1994. Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides. *Methods in Enzymology*, 233, pp.182–189.
- (171) Sun, Y., Oberley, L.W. & Ying, L., 1988. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry*, 34(3), pp.497–500.
- (172) Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, pp.121–126.
- (173) Huang EJ, Reichardt LF (2001). "Neurotrophins: roles in neuronal development and function". *Annual Review of Neuroscience.* 24: 677–736.
- (174) Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 1993; 262: 689–95.
- (175) Chamoun R, Suki D, Gopinath SP, Goodman JC, Robertson C. Role of extracellular glutamate measured by cerebral microdialysis in severe traumatic brain injury. *J Neurosurg* 2010; 113: 564–70.
- (176) Lau A, Tymianski M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *P ugers Arch* 2010; 460: 525–42.
- (177) Ana M. Adamo et al. The Role of Zinc in the Modulation of Neuronal Proliferation and Apoptosis. *Neurotox Res* (2010) 17:1–14
- (178) Rohit Seth et al. inc deficiency induces apoptosis via mitochondrial p53- and caspase-dependent pathways in human neuronal precursor cells . *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 30 (2015) 59–65
- (179) Lau KF et al. Expression analysis of glycogen synthase kinase-3 in human tissues. *J Pept Res.* (1999);54(1):85-91.

- (180) Yao HB et al. Expression of glycogen synthase kinase-3 isoforms in mouse tissues and their transcription in the brain. *J Chem Neuroanat.* (2002);23(4):291-7.
- (181) Lovestone S, Reynolds CH, Latimer D, Davis DR, Anderton BH, Gallo JM, et al. Alzheimer's disease-like phosphorylation of the microtubule-associated protein tau by glycogen synthase kinase-3 in transfected mammalian cells. *Curr Biol* 1994; 4: 1077–86.
- (182) Lucas JJ, Hernandez F, Gomez-Ramos P, Moran MA, Hen R, Avila J. Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *EMBO J* 2001; 20: 27–39.
- (183) Castro A, Martinez A. A new therapeutical strategy for the treatment of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Expert Opin Ther Pat* 2000; 10: 1519–8.
- (184) Cross DAE, Culbert AA, Chalmers KA, Facci L, Skaper SD, Reith AD. Selective small-molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity protect primary neurons from death. *J Neurochem* 2001; 77: 94–102.
- (185) Nonaka S, Chuang DM. Neuroprotective effects of chronic lithium on focal cerebral ischemia in rats. *Neuroreport* 1998; 9: 2081–4.
- (186) Leng Y, Chuang DM. Endogenous alpha-synuclein is induced by valproic acid through histone deacetylase inhibition and participates in neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity. *J Neurosci* 2006; 26: 7502–12.
- (187) Leng Y, Liang MH, Ren M, Marinova Z, Leeds P, Chuang DM. Synergistic neuroprotective effects of lithium and valproic acid or other histone deacetylase inhibitors in neurons: roles of glycogen synthase kinase-3 inhibition. *J Neurosci* 2008; 28: 2576–88.
- (188) Theodore P, Ciaraldi et al. Tissue-specific expression and regulation of GSK-3 in human skeletal muscle and adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291: E891–E898, 2006.
- (189) Miranda ER, Dey CS. Effect of chromium and zinc on insulin signaling in skeletal muscle cells. *Biol Trace Elem Res.* 2004 ;101(1):19-36.
- (190) Juhaszova M et al. Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest.* 2004 ;113(11):1535-49.
- (191) Shin S et al. Glycogen synthase kinase (GSK)-3 promotes p70 ribosomal protein S6 kinase (p70S6K) activity and cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Nov 22;108(47):E1204-13.
- (192) Lynch CJ et al. Zinc stimulates the activity of the insulin- and nutrient-regulated protein kinase mTOR. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001 Jul;281(1):E25-34.
- (193) Brown GC, Vilalta A. How microglia kill neurons. *Brain Res.* 2015; 1628: 288-97.
- (194) Takarada T, Fukumori R, Yoneda Y. Mitochondrial uncoupling protein-2 in glutamate neurotoxicity. *Nihon Yakurigaku Zasshi.* 2013;142:13-6.
- (195) Smaili SS, Ureshino RP, Rodrigues L, Rocha KK, Carvalho JT, Oseki KT, et al. The role of mitochondrial function in glutamate-dependent metabolism in neuronal cells. *Curr Pharm Des.* 2011;17:3865-77.

- (196) Son M, Elliott JL. Mitochondrial defects in transgenic mice expressing Cu, Zn superoxide dismutase mutations: the role of copper chaperone for SOD1. *J Neurol Sci.* 2014;336:1-7.
- (197) Goracci G, Ferrini M, Nardicchi V. Low molecular weight phospholipases A2 in mammalian brain and neural cells: roles in functions and dysfunctions. *Mol Neurobiol.* 2010;41:274-89.
- (198) Pinazo-Durán MD, Zanón-Moreno V, Gallego-Pinazo R, García-Medina JJ. Oxidative stress and mitochondrial failure in the pathogenesis of glaucoma neurodegeneration. *Prog Brain Res.* 2015;220:127-53.
- (199) Repalli J. Translocator protein (TSPO) role in aging and Alzheimer's disease. *Curr Aging Sci.* 2014;7:168-751.
- (200) Pchelina SN, Emel'ianov AK, Usenko TS. Molecular basis of Parkinson's disease linked with mutations in the LRRK2 gene. *Mol Biol (Mosk).* 2014;48:3-14.
- (201) Chabrier PE, Demerlé-Pallardy C, Auguet M. Nitric oxide synthases: targets for therapeutic strategies in neurological diseases. *Cell Mol Life Sci.* 1999;55:1029-35.
- (202) Urrutia PJ, Mena NP, Núñez MT. The interplay between iron accumulation, mitochondrial dysfunction, and inflammation during the execution step of neurodegenerative disorders. *Front Pharmacol.* 2014;5:38.
- (203) Storto, M., Sallese, M., Salvatore, L., Poulet, R., Condorelli, D.F., Dell'Albani, P., Marcello, M.F., Romeo, R., Piomboni, P., Barone, N., Nicoletti, F., De Nicoletti, F. & Blasi, A. (2001) Expression of metabotropic glutamate receptors in the rat and human testis. *J. Endocrinol.* 170, 71–78.
- (204) Nagata, Y., Homma, H., Lee, J.A. & Imai, K. (1999) D-Aspartate stimulation of testosterone synthesis in rat Leydig cells. *FEBS Lett.* 444, 160–164.
- (205) Hayashi, M., Yamada, H., Uehara, S., Morimoto, R., Muroyama, A., Yatsushiro, S., Takeda, J., Yamamoto, A. & Moriyama, Y. (2003) Secretory granule-mediated co-secretion of L-glutamate and glucagon triggers glutamatergic signal transmission in islets of Langerhans. *J. Biol. Chem.* 278, 1966–1974.
- (206) Gonoi, T., Mizuno, N., Inagaki, N., Kuromi, H., Seino, Y., Miyazaki, J. & Seino, S. (1994) Functional neuronal ionotropic glutamate receptors are expressed in the non-neuronal cell line MIN6. *J. Biol. Chem.* 269, 16989–16992.
- (207) Tong, Q., Ouedraogo, R. & Kirchgessner, A.L. (2002) Localization and function of group III metabotropic glutamate receptors in rat pancreatic islets. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282, 1324–1333.
- (208) Said, S.I., Berisha, H.I. & Pakbaz, H. (1996) Excitotoxicity in the lung: N-methyl-D-aspartate-induced, nitric oxide-dependent, pulmonary edema is attenuated by vasoactive intestinal peptide and by inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 4688–4692.
- (209) Storto, M., de Grazia, U., Knopfel, T., Canonico, P.L., Copani, A., Richelmi, P., Nicoletti, F. & Vairetti, M. (2000) Selective blockade of mGlu5 metabotropic glutamate receptors protects rat hepatocytes against hypoxic damage. *Hepatology* 31, 649–655.

- (210) Gill, S.S., Pulido, O.M., Mueller, R.W. & McGuire, P.F. (1998) Molecular and immunochemical characterization of the iono-tropic glutamate receptors in the heart, *Brain Res Bull.* 1998 Jul 15;46(5):429-34.
- (211) Xiao-Ting Huang et al. An excessive increase in glutamate contributes to glucose-toxicity in β -cells via activation of pancreatic NMDA receptors in rodent diabetes. *Scientific RepoRts* 2016: 7:44120
- (212) Weijun Shen et al. Inhibition of DYRK1A and GSK3B induces human β -cell proliferation. *Nature Communications.* 2105: 6:8372
- (213) Yang Y, Song W. Molecular links between Alzheimer's disease and diabetes mellitus. *Neuroscience.* 2013;250:140–50.
- (214) Domínguez RO, Pagano MA, Marschoff ER, González SE, Repettod M, Serra JA. Alzheimer disease and cognitive impairment associated with diabetes mellitus type 2: associations and a hypothesis. *Neurologia.* 2014;29(9):567–72.
- (215) Smith MA, Taneda S, Richey PL, Miyata S, Yan SD, Stern D, et al. Advanced Maillard reaction end products are associated with Alzheimer disease pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U s a.* 1994;91:5710–4.
- (216) A, Palmeira C. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006;212:167–78.
- (217) Khallaghi B, Safarian F, Nasoohi S, Ahmadiani A, Dargahi L. Metformin-induced protection against oxidative stress is associated with AKT/mTOR restoration in PC12 cells. *Life Sci.* 2016;148:286–92.
- (218) Bonnefont-Rousselot D, Raji B, Walrand S, Gardes-Albert M, Jore D, Legrand A. An intracellular modulation of free radical production could contribute to the beneficial effects of metformin towards oxidative stress. *Metabolism.* 2003;52:586–9.
- (219) Ouslimani N, Peynet J, Bonnefont-Rousselot D, Therond P, Legrand A, Beaudeux JL. Metformin decreases intracellular production of reactive oxygen species in aortic endothelial cells. *Metabolism.* 2005;54:829–34.
- (220) Zhao RR, Xu XC, Xu F, Zhang WL, Zhang WL, Liu LM, et al. Metformin protects against seizures, learning and memory impairments and oxidative damage induced by pentylenetetrazole-induced kindling in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;4(18):414–7.
- (221) Butterfield DA, Poon HF, St Clair D, Keller JN, Pierce WM, Klein JB, et al. Redox proteomics identification of oxidatively modified hippocampal proteins in mild cognitive impairment: insights into the development of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 2006;22:223–32.
- (222) Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK, et al. Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2001;60:759–67.
- (223) Chen Z, Zhong C. Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: implications for diagnostic and therapeutic strategies. *Prog Neurobiol.* 2013;108:21–43.
- (224) Apelt J, Bigl M, Wunderlich P, Schliebs R. Aging-related increase in oxidative stress correlates with developmental pattern of beta-secretase activity and beta-amyloid plaque formation in transgenic Tg2576 mice with Alzheimer-like pathology. *Int J dev Neurosci.* 2004;22:475–84.

- (225) Reddy PH, Manczak M, Mao P, Calkins MJ, Reddy AP, Shirendeb U. Amyloid-beta and mitochondria in aging and Alzheimer's disease: implications for synaptic damage and cognitive decline. *J Alzheimers dis.* 2010;20(Suppl. 2):499–512.
- (226) Sultana R, Boyd-Kimball D, Poon HF, Cai J, Pierce WM, Klein JB, et al. Oxidative modification and down-regulation of Pin1 in Alzheimer's disease hippocampus: a redox proteomics analysis. *Neurobiol Aging.* 2006;27:918–25.
- (227) DA-WEI LI et al. Association of glycogen synthase kinase-3 β with Parkinson's disease (Review). *MOLECULAR MEDICINE REPORTS* (2014) 9: 2043-2050

