



**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**SİSTEİN-S-SÜLFAT İLE TETİKLENEN HÜCRE
ÖLÜMÜNDE KORTEKS VE HİPOKAMPAL
NÖRONLARDA KASPAZ 3 BAĞIMLI VE KASPAZ
BAĞIMSIZ APOPTOTİK SÜRECİN in-Vitro
İNCELENMESİ**

Aysel ALPHAN

**Mayıs 2023
DENİZLİ**

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

SİSTEİN-S-SÜLFAT İLE TETİKLENEN HÜCRE ÖLÜMÜNDE KORTEKS VE
HIPOKAMPAL NÖRONLARDA KASPAZ 3 BAĞIMLI VE KASPAZ BAĞIMSIZ
APOPTOTİK SÜRECİN in-Vitro İNCELENMESİ

Aysel ALPHAN

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Esat ADIGÜZEL
2. Danışman: Prof. Dr. Vural KÜÇÜKATAY

Denizli, 2023

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

Öđrenci Adı ve Soyadı: Aysel ALPHAN

İmza:

YAYIN BEYAN SAYFASI

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

Ek -1. Altunay ZM, Alphan A, Adıgüzel E. In vivo experimental models of schizophrenia: mechanisms, features, advantages, disadvantages. **Anatomy**, 2022;16(2):114–123.

ÖZET

SİSTEİN-S-SÜLFAT İLE TETİKLENEN HÜCRE ÖLÜMÜNDE KORTEKS VE HİPOKAMPAL NÖRONLARDA KASPAS 3 BAĞIMLI VE KASPAS BAĞIMSIZ APOPİTOTİK SÜRECİN in-Vitro İNCELENMESİ

Aysel ALPHAN
Doktora tezi, Sinirbilim AD
Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Esat ADIGÜZEL

Mayıs 2023, 106 Sayfa

Sistein-S-Sülfat (SSC) toksisitesinin sülfid oksidaz enzim eksikliği veya molibden kofaktör eksikliğindeki ağır nöropatolojinin nedeni olabileceğine dair Literatürde çalışmalar mevcuttur. SSC'nin nörotoksik etkisi gösterilmiş olup, apoptotik süreç aydınlatılmamıştır. Bu çalışmada, sekonder hipokampal (HT-22) ve primer kortikal nöron (PKN) dizilerinde SSC'nin tetikleyebileceği muhtemel kaspaz bağımlı ve bağımsız apoptotik mekanizmaların araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla HT-22 ve PKN dizilerinde LD₅₀ değerlerini ve apoptotik indükleyici faktör (AIF), kalpain ve sitokrom c inhibitörlerinin güvenli dozlarını belirlemek ve inhibitörlerin SSC'nin toksisitesini baskılamadaki etkisini saptamak için sitotoksisite deneyleri yapıldı. Nöron dizilerine SSC eklenerek zamana bağlı indirgenmiş glutatyon (GSH) miktar analizi ile apoptozun tetiklenme anı saptandı. AIF, sitokrom c, kalpain ve kaspaz düzeyleri kolorimetrik olarak ölçüldü. SSC'nin LD₅₀ değeri HT-22 için 150 µM, PKN için 155 µM olarak bulundu. Kalpain 1, AIF ve sitokrom c inhibitörlerinin, güvenli dozları PKN için sırası ile 10µM, 10nM, 20µM, HT-22 için 10µM, 10nM, 10µM saptandı. Zamana bağlı GSH ölçümlerinde SSC eklenmiş PKN dizilerinde 2-8 saatlik zaman diliminde GSH miktarının arttığı, 8-16 saatlik zaman diliminde azaldığı gözlemlendi. HT-22 dizilerinde 2. ve 8. saatte SSC eklenmiş gruplarda kontrol grubuna göre GSH miktarının arttığı saptandı. PKN dizilerinde kalpain, AIF, sitokrom c ve kaspaz 3 miktarının, HT-22 dizilerinde ise AIF ve kalpain miktarlarının kontrol gruplarına göre daha fazla olduğu belirlendi. AIF, sitokrom c ve kalpain inhibitörlerinin SSC'nin toksik etkisini azalttığı bulundu.

Bu tezde SSC ile indüklenen apoptozisin HT-22 hücre hattında AIF, kalpain aktivitesini artırarak kaspaz bağımsız yolak ile indüklendiği gösterildi. PKN hücre hattında ise SSC etkisinin AIF, sitokrom c ve kalpain ve kaspaz 3 aktivitesini artırarak kaspaz bağımlı (sitokrom c, kaspaz 3 aktivitesi) ve bağımsız (AIF, kalpain aktivitesi) yolakla apoptozisi indüklediği gösterildi. Apoptoz inhibitörlerinin SSC kaynaklı nörotoksisteye karşı tedavi yöntemleri geliştirilmesinde kullanılabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Sistein-S-Sülfat, eksitotoksisite, apoptozis, glutatyon, nörodejenerasyon,

Bu çalışma, Paü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyonu Birimi (Proje No: 2020SABE17) ve TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek Programı (Proje No: 120Z825) tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

In vitro INVESTIGATION OF CASPASE 3-DEPENDENT AND CASPASE-INDEPENDENT APOPTOTIC PROCESS IN CORTEX AND HYPOCAMPAL NEURONS IN CELL DEATH TRIGGERED WITH SISTICIN-S-SULPHATE

ALPHAN, Aysel
PhD. Thesis in Neuroscience
Supervisor: Prof. ESAT ADIGÜZEL (MD)
May 2023, 106 Pages

There are studies in literature that cysteine-S-Sulfate (SSC) toxicity may be the cause of severe neuropathology in sulfite oxidase enzyme deficiency or molybdenum cofactor deficiency. The neurotoxic effect of SSC has been demonstrated, but the apoptotic process has not been elucidated. In this study, it was aimed to investigate the possible caspase-dependent and independent apoptotic mechanisms that SSC can trigger in the secondary hippocampal (HT-22) and primary cortical neuron (PKN) lines.

For this purpose, cytotoxicity experiments were performed to determine the LD₅₀ and the safe doses of apoptotic inducing factor (AIF), calpain and cytochrome c inhibitors in HT-22 and PKN arrays, and to determine the effect of inhibitors on suppressing the toxicity of SSC.

Triggering time of apoptosis was determined via time-dependent reduced glutathione (GSH) quantification analysis by adding SSC to neuron lines. AIF, cytochrome c, calpain and caspase levels were measured colorimetrically.

The LD₅₀ value of SSC was found to be 150 µM for HT-22 and 155 µM for PKN. Safe doses of Calpain 1, AIF and cytochrome c inhibitors were found to be 10µM, 10nM, 20µM respectively for PKN cell line, 10µM, 10nm, 10µM for HT-22 cell line. In time-dependent GSH measurements, it was observed that the amount of GSH increased in PKN sequences with SSC added over a 2-8-hour time period and decreased over an 8-16-hour time period. It was found that the amount of GSH increased in the groups with SSC added at the second and eighth hours in the HT-22 cell line compared to the control group. It was determined that the amount of calpain, AIF, cytochrome C and caspase 3 in the PKN cell line and the amounts of AIF and calpain in the HT-22 sequences were higher than those of the control groups. It was found that AIF, cytochrome c and calpain inhibitors reduced the toxic effect of SSC.

In this thesis, it was demonstrated that SSC-induced apoptosis was induced by a caspase-independent pathway by increasing AIF, calpain activity in the HT-22 cell line. On the other hand, in PKN cell line, it was shown that SSC effect induced apoptosis by increasing AIF, cytochrome c and calpain and caspase 3 activities, by caspase dependent (cytochrome c, caspase 3 activity) and independent (AIF, calpain activity) pathways. It was concluded that apoptosis inhibitors can be used in the development of treatment methods against SSC-induced neurotoxicity.

Keywords: Cysteine-S-sulfate, excitotoxicity, apoptosis, glutathione, neurodegeneration,

This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project number: 2020SABE17) and TUBITAK 1002 Quick Support Programme (Project number: 120Z825)

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim süresince, yol haritamın oluşmasını sağlayan, beraber çalışmaktan gurur duyduğum değerli tez danışmanım Prof. Dr. Esat ADIGÜZEL'E teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca Sinir Bilimleri'ne vermiş olduğu katkılardan ve özveriden dolayı kendisine minnet duyarım.

Tez aşamasının tüm basamaklarında Fizyoloji araştırma laboratuvarında çalışma imkanı sunan, bilgi ve tecrübesinden yararlandığım değerli yardımcı tez danışmanım Prof. Dr. Vural KÜÇÜKATAY'A,

Tez çalışmam süresince bilgi ve tecrübesini esirgemeyen, önemli katkılar sunan hocalarım Doç. Dr. Ayşegül ÇÖRT ve Doç. Dr. Emine KILIÇ TOPRAK'A, laboratuvar çalışmalarında yardımlarından ötürü Araş. Gör. Dr. Melek TUNÇ ATA ve Araş. Gör. Dr. Fatih ALTINTAŞ'A, istatistiksel analizlerin yapılmasındaki katkılarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Hande ŞENOL'A,

Sinir Bilimlerine sunmuş oldukları katkılardan dolayı başta doktora ders döneminde öğrencisi olmaktan büyük onur duyduğum değerli hocam merhum Prof. Dr. Attila OĞUZHANOĞLU'NA ve tüm hocalarıma,

Finansal katkılarından dolayı Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na

Her zaman yanımda olan sevgili eşim Osman Gökhan'a, biricik kızım Reyhan Zehra'ya, aileme ve dostlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, Paü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyonu Birimi (Proje No: 2020SABE17) ve TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek Programı (Proje No: 120Z825) tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç	3
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI	4
2.1. Nörotoksisite	4
2.2. Eksitotoksisite	5
2.3. Kalsiyum Homeostazi	6
2.4. Glutamat ve Eksitotoksik Etkisi	7
2.4.1. Glutamat reseptörleri	9
2.5. Transsülfürasyon Yolağı ve Metabolitlerinin Biyolojik Önemi	11
2.5.1.1. Sistein metabolizması	14
2.5.1.1.1. Sistein katabolizmasında sülfid (SO ₃ ²⁻) ve hidrojen sülfid (H ₂ S):.....	15
2.5.2. Molibden kofaktör ve sülfid oksidaz enzim eksikliği.....	18
2.5.3. Sistein-S-Sülfat (Cysteine-S-sulfate, S-Sulfocysteine, SSC)	19
2.5.4. Glutasyon	21
2.6. Apoptozis	23
2.6.1. Apoptozisde oluşan morfolojik değişiklikler	23
2.6.2. Apoptozisin biyokimyasal süreçleri.....	24
2.6.1.1. Ekstrinsik yolak	26
2.6.1.2. İntrinsik mitokondriyal yolak	26
2.6.1.3. İntrinsik endoplazmik retikulum yolak.....	27
2.6.2. AIF-aracılı apoptotik yolak.....	28
2.7. Nörodejenerasyonda Selektif Hasarlanma	29
2.8. HT-22 Hipokampal Hücre Hattı ve Primer Kortikal Nöronlar.....	30
2.9. Hipotez	30
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	32

3.1. Nöron Kültürü	32
3.1.1. Primer kortikal nöronlar	33
3.1.1.1. Primer kortikal nöronların çözdürülmesi ve kültüre edilmesi	33
3.1.2. HT-22 hipokampal hücre hattı	34
3.1.2.1. HT-22 hipokampal nöronların çözdürülmesi ve kültüre edilmesi	34
3.1.2.2. HT-22 hipokampal nöronların çoğaltılması ve pasajlanması	35
3.1.2.5. HT-22 hipokampal nöronların dondurulması	36
3.1.3. Primer kortikal ve HT-22 hipokampal nöronların diferansiye edilmesi	36
3.1.4. Primer kortikal ve HT-22 hipokampal nöronların sayılması	37
3.2. Deneyleler	37
3.2.1. Sitotoksosite ölçümleri	38
3.2.1.1. Primer kortikal nöronlarda SSC LD ₅₀ değerinin belirlenmesi	39
3.2.1.2. HT-22 hipokampal nöronlarda SSC LD ₅₀ değerinin belirlenmesi	39
3.2.1.3. Kalpain, Sitokrom c ve AIF inhibitörlerinin primer kortikal ve HT-22 hipokampal nöronlarda güvenli dozlarının araştırılması	40
3.2.2. Hücre içi glutatyon ve türevlerinin ölçümü	41
3.2.2.1. T-GSH ve GSSG standartlarına ait regresyon eğrileri:	43
3.2.3. AIF, Kalpain, Sitokrom c ve Kaspaz 3 Aktivite Tayini	45
3.2.3.1. AIF, Sitokrom c, Kalpain ve Kaspaz 3 standartlarına ait regresyon eğrileri:	48
3.3. İstatistiksel Analiz	50
4. BULGULAR	52
4.1. Primer Kortikal ve HT-22 Hipokampal Nöronlarda SSC'nin LD ₅₀ Değerleri.....	52
4.2. Primer kortikal ve HT-22 Hipokampal Nöronlarda İnhibitörlerin Güvenli Dozlarının Değerleri.....	55
4.3. Glutatyon Analizi Bulguları	59
4.4. Apoptoz Sürecinin Belirlenmesine ait Bulgular	63
4.5. İnhibitörlerin SSC Toksisitesini Önlemedeki Bulguları	74
5. TARTIŞMA	78
6. SONUÇ.....	88
7. KAYNAKLAR	90
8. ÖZGEÇMİŞ	106
EKLER	107

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.2.1 Endojen ve eksojen kaynaklı eksitatör etkiye sahip bazı amino asitlerin kimyasal yapıları.....	5
Şekil 2.4.1 Glutamat eksitotoksitesine bağlı hücre ölümü.	8
Şekil 2.5.1 Transsülfürasyon Yolağı.....	13
Şekil 2.5.1.1.1 Sisteinin translasyon sonrası modifikasyonları.....	14
Şekil 2.5.1.1.1.1 Sistein katabolizmasında sülfid ve hidrojen sülfid oluşumu.....	16
Şekil 2.5.2.1 Molibden Kofaktör ve/veya Sülfid Oksidaz enzim eksikliğinde artış gösteren metabolitler..	19
Şekil 2.5.3.1 Sistein katabolizmasında SSC oluşumu.....	20
Şekil 2.5.4.1 Glutasyon metabolizması.	22
Şekil 2.6.1.1 Apoptotik cisimlerin oluşumunda apoptotik hücrenin uğradığı farklı deformasyon biçimleri şematik olarak gösterilmiştir.	24
Şekil 2.6.2.1 Apoptoziste çeşitli yollar.	25
Şekil 2.9.1 Hücrenin antioksidan kapasitesine bağlı olarak apoptotik sürecin olası başlama anları.	31
Şekil 3.1.1.1.1 Primer kortikal nöronların mikroskop görüntüsü.	34
Şekil 3.1.2.1 HT 22 hipokampal nöronların mikroskop görüntüsü.	36
Şekil 3.2.1 Deneylerin iş akış planı şematik olarak gösterilmiştir.	38
Şekil 3.2.2.1.1 T-GSH standartlarına ait regresyon eğrisi.....	44
Şekil 3.2.2.1.2 GSSG standartlarına ait regresyon eğrisi.....	44
Şekil 3.2.3.1.1 AIF standartlarına ait regresyon eğrisi.	48
Şekil 3.2.3.1.2 Sitokrom c standartlarına ait regresyon eğrisi	49
Şekil 3.2.3.1.3 Kalpain standartlarına ait regresyon eğrisi	49
Şekil 3.2.3.1.4 Kaspaz 3 standartlarına ait regresyon eğrisi	50
Şekil 4.1.1 HT-22 hipokampal nöronlarda SSC'nin LD ₅₀ değerinin belirlenmesine dair veriler gösterilmiştir.	53
Şekil 4.1.2 Primer kortikal nöronlarda SSC'nin LD ₅₀ değerinin belirlenmesine dair veriler gösterilmiştir.	54
Şekil 4.2.1 Kalpain 1 inhibitörünün HT-22 ve primer kortikal nöronlarda güvenli doz çalışmasına ait veriler gösterilmiştir.....	56

Şekil 4.2.2 Sitokrom c inhibitörü MA'nın HT-22 ve primer kortikal nöronlarda güvenli doz çalışmasına ait veriler gösterilmiştir.....	57
Şekil 4.2.3 AIF inhibitörü NF'nin HT-22 ve primer kortikal nöronlarda güvenli doz çalışmasına ait veriler gösterilmiştir.	58
Şekil 4.3.1 HT-22 hipokampal nöronlarda GSH miktarının zamana bağlı değişimine ait veriler gösterilmiştir.	60
Şekil 4.3.2 Primer kortikal nöronlarda GSH miktarının zamana bağlı değişimine ait veriler gösterilmiştir.	62
Şekil 4.4.1 HT-22 Hipokampal nöron kültürüne 150 µM SSC eklenmesinden 16 saat sonra apoptotik protein miktarındaki değişimlere ait veriler gösterilmiştir.	65
Şekil 4.4.2 HT-22 Hipokampal nöron kültürüne SSC ve SSC+Kalp1 İnh. eklenmesinden 24 saat sonra kalpain miktarındaki değişime ait veriler gösterilmiştir. .	67
Şekil 4.4.3 HT-22 Hipokampal nöron kültürüne SSC ve SSC+NF eklenmesinden 24 saat sonra AIF miktarındaki değişime ait veriler gösterilmiştir.	68
Şekil 4.4.4 HT-22 Hipokampal nöron kültürüne SSC ve SSC+MA eklenmesinden 24 saat sonra sitokrom c miktarındaki değişime ait veriler gösterilmiştir.....	69
Şekil 4.4.5 HT-22 Hipokampal nöron kültürüne SSC eklenmesinden 24 saat sonra kaspaz 3 miktarındaki değişime ait veriler gösterilmiştir.	70
Şekil 4.4.6 Primer kortikal nöron kültürüne SSC ve SSC+Kalp 1 inh. eklendikten 24 saat sonra kalpain miktarındaki değişime ait veriler gösterilmiştir.	71
Şekil 4.4.7 Primer kortikal nöron kültürüne SSC ve SSC+NF eklendikten 24 saat sonra AIF miktarındaki değişime ait veriler görülmektedir.....	72
Şekil 4.4.8 Primer kortikal nöron kültürüne SSC ve SSC+MA eklendikten 24 saat sonra sitokrom c miktarındaki değişime ait veriler gösterilmiştir.....	73
Şekil 4.4.9 Primer kortikal nöronlara 24 saat süreyle SSC verilmesine karşı kaspaz 3 miktarındaki değişime ait veriler gösterilmiştir.	74
Şekil 4.5.1 HT-22 hipokampal nöronlarda NF, Kalp 1 inh. ve MA'nın SSC toksisitesini önlemede % nöron canlılığına olan etkisine ait veriler gösterilmiştir.	75
Şekil 4.5.2 Primer kortikal nöronlarda NF, MA ve Kalpain 1 inhibitörünün SSC toksisitesini önlemede % nöron canlılığına ait veriler gösterilmiştir.	76

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.4.1.1 Glutamat reseptörlerinin sınıflandırılması.....	10
Tablo 3.2.1.3.1 Tabloda inhibitörlerin güvenli dozlarının belirlenmesi için oluşturulan deney grupları görülmektedir.	40
Tablo 3.2.2.1 Tabloda hücre içi glutatyon ve türevlerinin ölçümü için oluşturulan deney grupları görülmektedir.	42
Tablo 3.2.3.1 Tabloda inkübasyon süresi 24 saat süren HT-22 hipokampal ve primer kortikal nöron kültürlerine ait deney grupları görülmektedir.	46
Tablo 4.1.1 Tabloda HT-22 hipokampal nöron kültüründe SSC'nin LD ₅₀ değerinin belirlenmesine ait tanımlayıcı veriler görülmektedir.	53
Tablo 4.1.2 Tabloda Primer kortikal nöron kültüründe SSC'nin LD ₅₀ değerinin belirlenmesine ait tanımlayıcı veriler görülmektedir.	54
Tablo 4.2.1 Tabloda kalpain 1 inhibitörünün HT-22 ve primer kortikal nöronlarda güvenli doz çalışmasına ait tanımlayıcı veriler görülmektedir.	55
Tablo 4.2.2 Tabloda sitokrom c inhibitörü MA'nın HT-22 ve primer kortikal nöronlarda güvenli doz çalışmasına ait tanımlayıcı veriler görülmektedir.	57
Tablo 4.2.3 Tabloda AIF inhibitörünün HT-22 ve primer kortikal nöronlarda güvenli doz çalışmasına ait tanımlayıcı veriler görülmektedir.	58
Tablo 4.2.4 Tabloda İnhibitörlerin (Kalp1 inh. MA, NF) HT-22 ve primer kortikal nöronlarda güvenli doz çalışmasına ait istatistiksel bulgular görülmektedir.	59
Tablo 4.3.1 Tabloda HT-22 ve primer kortikal nöronlarda SSC inkübasyonunun zamana bağlı GSH değişimine ait tanımlayıcı veriler görülmektedir.	60
Tablo 4.3.2 Tabloda HT-22 hipokampal nöronlara SSC verilmesi ile ilerleyen zaman aralıklarında kontrol ve SSC gruplarında GSH miktarındaki değişimlerin % oran değerleri görülmektedir.	61
Tablo 4.3.3 Tabloda HT-22 ve primer kortikal nöronlarda GSH miktarının zamana bağlı değişimi çalışmasına ait istatistiksel bulgular görülmektedir.	63
Tablo 4.4.1 Tabloda HT-22 hipokampal nöron kültürünün 16 saat süreyle SSC inkübasyonunda; kalpain, sitokrom c, AIF ve kaspaz 3 salınım miktarına ait tanımlayıcı veriler görülmektedir.	64
Tablo 4.4.2 Tabloda primer kortikal ve HT-22 hipokampal nöron kültürlerinin SSC ile inkübasyonunda; kalpain, sitokrom c, AIF ve kaspaz 3 salınım miktarının belirlenmesine ait istatistiksel bulgular görülmektedir.	66

Tablo 4.4.3 Tabloda HT-22 hipokampal nöron kültürünün 24 saat süreyle SSC ve SSC+Kalp1 İn. inkübasyon sonunda; kalpain salınım miktarına ait tanımlayıcı veriler görülmektedir.....	66
Tablo 4.4.4 Tabloda HT-22 hipokampal nöron kültürünün 24 saat süreyle SSC ve SSC+NF inkübasyon sonunda; AIF salınım miktarına ait tanımlayıcı veriler görülmektedir.....	67
Tablo 4.4.5 Tabloda HT-22 hipokampal nöron kültürünün 24 saat süreyle SSC ve SSC+MA inkübasyon sonunda; sitokrom c salınım miktarına ait tanımlayıcı veriler görülmektedir.....	68
Tablo 4.4.6 Tabloda HT-22 Hipokampal nöron kültürünün 24 saat süreyle SSC ile inkübasyonunda kaspaz 3 salınım miktarına ait tanımlayıcı veriler görülmektedir.....	69
Tablo 4.4.7 Tabloda primer kortikal nöron kültürünün 24 saat süreyle SSC ve SSC+Kalp1 İn. ile inkübasyonu sonunda; kalpain salınım miktarına ait tanımlayıcı veriler görülmektedir.....	70
Tablo 4.4.8 Tabloda primer kortikal nöron kültürünün 24 saat süreyle SSC ve SSC+NF inkübasyonunda AIF salınım miktarına ait tanımlayıcı veriler görülmektedir.....	71
Tablo 4.4.9 Tabloda Primer kortikal nöron kültürünün 24 saat süreyle SSC ve SSC+MA ile inkübasyonu sonunda sitokrom c salınım miktarına ait tanımlayıcı veriler görülmektedir.....	72
Tablo 4.4.10 Tabloda primer kortikal nöron kültürünün 24 saat süreyle SSC inkübasyonunda kaspaz 3 salınım miktarına ait tanımlayıcı veriler görülmektedir.....	73
Tablo 4.5.1 Tabloda primer kortikal ve HT-22 hipokampal nöron kültürlerinin SSC ile inkübasyonunda inhibitörlerin (Kalp 1 inh., MA, NF) SSC toksisitesini önlemede % nöron canlılığına etkisinin belirlenmesine ait istatistiksel bulgular görülmektedir.....	77

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AH	Alzheimer Hastalığı
AIF	Apopitoz İndükleyici Faktör
ALS	Amyotrofik lateral skleroz
AMPA	α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolpro- pionik asit
Apaf-1	Apoptotik proteaz aktive eden faktör
ASK1	Apopitoz Sinyal Düzenleyen Kinaz1
ATF	Aktive Edici Transkripsiyon Faktör
ATP	Adenozin Trifosfat
BiP	Bağlayıcı immünoglobulin Proteini
Ca²⁺	Kalsiyum iyonu
CAT	Sistein Amino Asit Transferaz
CBS	Sistasyonin β -Sentaz
CDO	Sistein Dioksijenaz
c-FLIP	FLICE İnhibitör Protein
CHOP	C/EBP Homolog Protein
CO	Karbon Monoksit
CSA	Sistein Sülfirik Asit
CSAD	Sistein Sülfirik Asit Dekarboksilaz
CSE	Sistasyonin γ -Lizaz
DF	Dilüsyon Faktörü
DIABLO	Düşük pI ile doğrudan IAP Bağlayıcı Protein
DISC	Ölüm İndükleyici Sinyalleşme Kompleksi
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
Endo G	Endonükleaz G
ER	Endoplazmik Retikulum
FADD	Fas ile ilişkili ölüm alanı
FasL	Fas Ligandı
FBS	Fetal Sığır Serumumu
GDH	Glutamat Dehidrogenaz
GOT	Glutamat Oksaloasetat Transaminaz
GS	Glutasyon Sentetaz
GSH	Glutasyon
GSSG	Glutasyon Disülfid
H₂S	Hidrojen Sülfür (Hidrojen Sülfid)
HTAU-DH	Hipotaurin Dehidrojenaz
HtrA	Yüksek Sıcaklık Gereksinimli Proteini A
IAP	Apopitoz Protein İnhibitör
IMS	İntermembran Boşluk
IRE-1α	İnositol Gerektiren Protein-1alfa
iGluR	İyonotropik glutamat reseptör
iSOD	izole Sülfid oksidaz eksikliği olan hastalar
JNK	C-Jun-N- terminal kinaz

mARC	mitokondriyal-Amidoksim İndirgeyici Bileşen
mGluR	Metabotropik glutamat reseptör
MoCD	Molibden kofaktör eksikliği olan hastalar
Moco	Molibden kofaktör
MPST	3-merkaptopirüvat sülfür transferaz
MTHFR	N5,N10- metilen tetra-hidrofolat redüktaz
MZ	Methazolamid
Na⁺	Sodyum İyonu
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NF	N-fenilmaleimid
NMDA	N-metil-D-aspartat
NMDAr	N-metil-D-aspartat reseptörü
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
O₂⁻	Süperoksit
OONO⁻	Peroksinitrit
P38-MAPK	P38-Mitojenle Aktive Protein Kinaz
PARP-1	Poli (ADP-riboz) Polimeraz-1
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz
PDO	Persülfid Dioksijenaz
PERK	PKR-benzeri Endoplazmik Retikulum Kinaz
PET	Pozitron Emisyon Tomografisi
PKR	Protein Kinaz R
RT-PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PMCA	Plazmatik Membran Kalsiyum
SAH	S-Adenosil Homosistein
SAM	S-Adenosil-Metionin
Sarco	Sarkoplazmik
Smac	İkincil Mitokondri Kaynaklı Aktivatör
SNc	Substantia Nigra kompakta
SO	Sülfid Oksidaz
SO₃²⁻	Sülfid
SSC	S-Sulfosistein (Sistein-S-Sülfat)
SQR	Sülfid Kinon Oksidoredüktaz
TDP	TAR DNA-Bağlayıcı Protein
TGEV	Bulaşıcı Gastroenterid Virüs
TNF	Tümör Nekrozis Faktör
TRADD	TNF Reseptörü ile İlişkili Ölüm Alanı
TRAIL	TNF-ile ilişkili Apoptozis İndükleyici Ligant
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling
UPR	Katlanma Hatalı Protein (unfolding protein response)
VTA	Ventral Tegmental Alan
WST-8	[2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-monosodyum tuzu]
γ-GCS	gama-Glutamil Sistein Sentetaz

1. GİRİŞ

Sinir sisteminde, kimyasal, biyolojik ve fiziksel ajanların istenmeyen fonksiyonel veya yapısal değişikliklere neden olma kapasitesine nörotoksisite denir. Bu değişiklikler, bazen yalnızca fonksiyonel düzeyde kalmaz, hücre yapısında değişikliğe kadar gidebilir. Nörotoksik ajan için maruziyet süresi ve miktarı önemlidir (Sigel vd 2013). Nörotoksisite endojen nörotoksik ajanlarla da oluşabilir. Buna en önemli örnek glutamattır. Her ne kadar glutamat normal beyin fonksiyonu için gerekli olsa da, konsantrasyonu bir nöronun çevresinde kritik düzeye erişirse, eksitotoksik hücre ölümüne yol açabilir. Nöron apoptozla ortadan kalkabilir (Franco ve Cidlowski 2012, Oliveiral vd 2019). Glutamatın uyardığı, N-metil-D-aspartat (NMDA), kainat ve α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolpro-pionik asit (AMPA) reseptörleri eksitator etkiler oluştururlar. Glutamatın yıkıcı etkileri hücresel düzeyde en fazla incelenen NMDA reseptörleri üzerinden gerçekleşir (Sattler ve Tymianski 2001). Glutamat dışında, endojen nörotoksik ajanlar arasında, kainik asit, kinolik asit, nitrik oksit (NO), bilirubin ve histamin de yer alır (Paulsen ve Carroll 2013).

Eksitoksisite nöronal hücre ölümünün en kapsamlı çalışılan süreçlerinden birisidir. İskemi, travma ve nörodejeneratif bozuklukları içeren birçok santral sinir sistemi hastalıklarında önemli rol oynar. Eksitotoksik mekanizmalarla ilgili yoğun araştırmalara rağmen, nörodejeneratif hastalıklarla ilgili çok az sayıda farmakolojik tedavinin başarılı olduğu gösterilmiştir. Bu başarısızlığın eksitotoksisitenin NMDA-AMPA modelinin aşırı basitleştirmenin bir sonucu olduğu öne sürülmüştür (Lau ve Tymianski 2010). Bu yüzden eksitotoksik hasarı azaltmak için alternatif hedefler son zamanlarda büyük ilgi görmektedir.

Nörodejenerasyonu başlatan geniş yelpaze içerisinde sülfür içeren aminoasitlerin metabolizmasındaki bozuklukların da önemli yer tuttuğu dikkat çekmektedir. Transsülfürasyon yolağı hücrelerde sülfür metabolizması ve redoks regülasyonunda merkezi bir rol oynar. Transsülfürasyon yolağının bozulması, Alzheimer, Huntington, vasküler disfonksiyon ve yaşlanma gibi bazı patolojik şartların oluşmasına katkıda bulunur (Sbodio vd 2019). Homosisteinin total plazma konsantrasyonu arttığı zaman ($>11\mu\text{mol/L}$) bilişsel gerileme, demans ve Alzheimer için değiştirilebilir bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir (Smitha vd 2018). Neticede metihyoninden başlayan ve sülfat iyonunun oluşumuna kadar süregelen metabolik süreçte, enzim veya kofaktör

eksikliğine bağlı sülfür içeren amino asitlerin miktarındaki artış ya toksisiteye ya da eksitotoksik etkiyi uyaran nöronal hasara sebebiyet vermektedir.

Sistein gibi sülfür içeren aminoasitlerin sülfata katabolizması sırasında üretilen toksik bir molekül olan sülfitin oksidasyonu sülfid oksidaz (SO) enzimi aracılığı ile gerçekleşmektedir. SO eksikliği SuOX genindeki mutasyonlardan veya molibden kofaktör (Moco)'nun biyosentezi için gerekli genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır (Sigel vd 2013). Moco eksikliği olan hastalar (MoCD) ve izole SO eksikliği olan hastalar (iSOD) yenidoğan döneminde beslenme güçlüğü, abartılı bir irkilme reaksiyonu, inatçı nöbetler, lens dislokasyonu, kafa dismorfikliği ve ardından ciddi nörolojik anormallikler nedeni ile başvurmaktadır. Hastalık seyri ilerleyici serebral atrofi ve ventriküler dilatasyon nedeniyle psikomotor gerilik şeklinde görülmektedir. Bu hastalar yeni doğan döneminde nöronal gelişimden yoksundur ve yaşamlarının ilk yıllarında ölürlür (Schwarz 2016). Nörogörüntüleme çalışmalarında tipik olarak beyin multikistik lökoensefalopati ve atrofi ile karakterizedir. Laboratuvar bulgularında idrarda, sülfid, S-Sulfosistein (SSC), sülfat, taurin ve tiyosülfat artarken, plazmada SSC ve taurinin arttığı, sistin ve homosisteinin ise azaldığı rapor edilmiştir (Claerhout vd 2018). Sülfid birikimi, her iki hastalıkta da nörodejenerasyonun birincil nedenini teşkil etmektedir.

Ekstraselüler alanda sülfid, proteinlerin disülfid köprülerini bozabilir. Böylece protein katlanmasını, stabilitesini ve aktivitesini etkiler. Disülfid köprülerinin sülfid ile parçalanması sonucu, SSC gibi S-sülfonatlı türler oluşmaktadır (Kishikawa vd 2002). iSOD ve MoCD'de sistein seviyelerinde dramatik bir azalmaya karşı SSC miktarı artmaktadır (Schwarz ve Belaidi, 2013). Bu süreçler vücutta gerçekleşirken, beyindeki lokal hasar nöronların bu metabolik değişikliklere karşı duyarlılığını düşündürmektedir.

SSC'nin eksitotoksik özellikleri ilk defa Olney tarafından ileri sürülmüştür (Olney vd 1975). Daha sonra yapılan çalışmalarda SSC'nin glutamat benzeri etki göstererek eksitotoksik olduğu gösterilmiştir. SSC aracılı nöronal hücre ölümünün NMDA reseptörü üzerinden, kalsiyum akışının, kalpain aktivasyonunu gerçekleştirdiği ve bunun sinaptik proteinlerin proteolitik parçalanmasına neden olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle nöronal SSC'nin birikmesi iSOD ve MoCD'de nörodejenerasyona önemli katkı sağladığı düşünülmektedir (Kumar vd 2017).

SSC Sülfid oksidaz enzim eksikliği veya molibden kofaktör eksikliği olan hastaların idrarında, plazmasında yoğun miktarda tespit edilmektedir. SSC toksisitesinin bu hastalıklarda seyreden ağır nöropatolojinin sebebi olabileceğine dair Literatürde çalışmalar mevcuttur. Yapılan çalışmalarda SSC'nin toksik etkisinin gösterilmesine rağmen hücre ölüm mekanizmaları aydınlatılmamıştır (Grings vd 2016, Kumar vd 2017). SSC'nin apoptotik mekanizmasının açıklanması, sülfid birikmesi gibi toksisiteye bağlı nörodejeneratif hastalıkların tedavi yaklaşımlarına katkı sağlayabilir.

Kaspaz bağımsız yolak, büyük molekül ağırlıklı Deoksiribo nükleik asit (DNA) fragmentasyonu ve nükleer kromatin kondensasyonu ile sonuçlanır (Zhang vd 2002). Kalsiyum bağımlı kalpain ve apopitoz indükleyici faktör (AIF), kaspaz bağımsız apoptotik yolda rol oynamaktadır (Wolf vd 1999, Cande vd 2002). Mitokondriyal transmembran potansiyelindeki bir azalmanın AIF salınımına ve erken apopitoza eşlik ettiği rapor edilmiştir (Brustovetsky vd 2002). Apopitozun indüksiyonunu takiben, AIF dış mitokondriyal membrandan sitozol ve çekirdeğe transloke olur. Memelilerde, önemli bir kaspaz aktivasyon yolu, sitokrom c ile başlatılan yoldur. Bu yolda çeşitli apoptotik uyarılar, mitokondriden sitokrom c salınımına bunu müteakip hücre ölümüyle sonuçlanan bir dizi biyokimyasal reaksiyona neden olur (Jiang ve Wang 2004).

Literatürde, glutamat indüklü ölüm mekanizmasında kortikal nöronlarda; kaspaz3, kalpain ve AIF aktivasyonunun indüklendiği, HT-22 hipokampal nöronlarda AIF ve kalpainin indüklendiği gösterilmiştir (Zhang ve Bhavnani 2006). Buradan hareketle SSC, glutamat benzeri bir etki gösterdiği için apoptotik mekanizmayı açıklamada; korteks ve hipokampusta farklı apoptotik enzim yollarının tetiklendiği öngörülebilir. Korteks ve hipokampustaki nöronlarda, SSC indüklü hücre ölümünde kaspaz bağımlı ve kaspaz bağımsız yolların mekanizmaları aydınlatılmamıştır. Korteks ve hipokampus bölümlerinde mekanizmanın aydınlatılmaya çalışılmasının nedeni bu bölgelerde NMDA reseptörlerinin yoğun olmasından kaynaklanmaktadır. SSC'nin glutamat agonisti olmasından dolayı, NMDA reseptörlerine bu bölgelerde daha fazla etki etmesi, selektif hasarlanabilirliğinde bir göstergesidir.

Nörodejenerasyonda, selektif hasarlanabilirliğin nedeni ile ilgili bulgulara erişmek ve farklı sinir sistemi yapılarındaki toksisiteye bağlı ölüm yollarının mekanizmalarını ortaya koymak nörodejenerasyonda daha spesifik tedavi yöntemlerinin kullanılmasına katkı sağlayabilir.

1.1. Amaç

SSC'nin sebep olduğu eksitotoksik etkinin korteks ve hipokampusta hangi ölüm yollarını tetiklediğini araştırmak. Özellikle İSOD ve MoCD'de nörodejenerasyonu en aza indirecek apoptotik inhibitörleri saptamak. Nörodejenerasyonda selektif hasarlanabilirliğin nörotoksik etki açısından karşılaştırılmasını incelemek. GSH'nin zamana bağlı azalması ile apoptotik sürecin başladığını göstermek.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Nörotoksisite

Nörotoksisite doğal veya yapay toksik maddelere (nörotoksik maddeler) maruz kalmanın sonucunda sinir sisteminin normal aktivitesinin bozulması durumunu ifade eden bir terimdir. Beyinde ve sinir sisteminin diğer bölümlerinde toksik etkiye maruz kalan nöronların sinyal iletim yolları bozulabilir ve hatta nöron kaybı ile sonuçlanabilir (Sigel vd 2013). Nörotoksisite, kemoterapide, radyasyon tedavisinde, ilaç tedavilerinde ve organ nakillerinde kullanılan maddelere maruz kalmanın yanı sıra kurşun ve civa gibi ağır metaller, belirli gıdalara ve gıda katkı maddelerine, pestisitlere, endüstriyel temizleme solventlerine, kozmetiklere ve bazı endojen kaynaklı maddelere maruz kalmaktan kaynaklanabilir. Bazı nörotoksik maddeler doğrudan sinir hücrelerine, bazıları, sinir sisteminin esas olarak bağımlı olduğu metabolik süreçlere etki eder. Güçsüzlük veya uyuşukluk; hafıza, görme kaybı; baş ağrısı; bilişsel ve davranışsal sorunlar ve cinsel işlev bozukluğu gibi semptomlar maruziyetten hemen sonra veya daha uzun dönemde ortaya çıkabilir. Prognoz, maruz kalmanın uzunluğuna ve derecesine ve nörolojik hasarın şiddetine bağlıdır (Soleimani vd 2016, Cadet vd 2007). İlaç ve tedavilerin yol açtığı fizyolojik işlevde veya çevreye uyum sağlamada herhangi bir bozulma yan etki olarak kabul edilir. Bu nedenle, fonksiyonel ve yapısal değişiklikler minimal veya geri dönüşümlü olsa bile, nöronlarda, aksonopati veya miyelinopati gibi en yaygın morfolojik anormallikler oluşabilir (Ezza ve Khadrawy 2014).

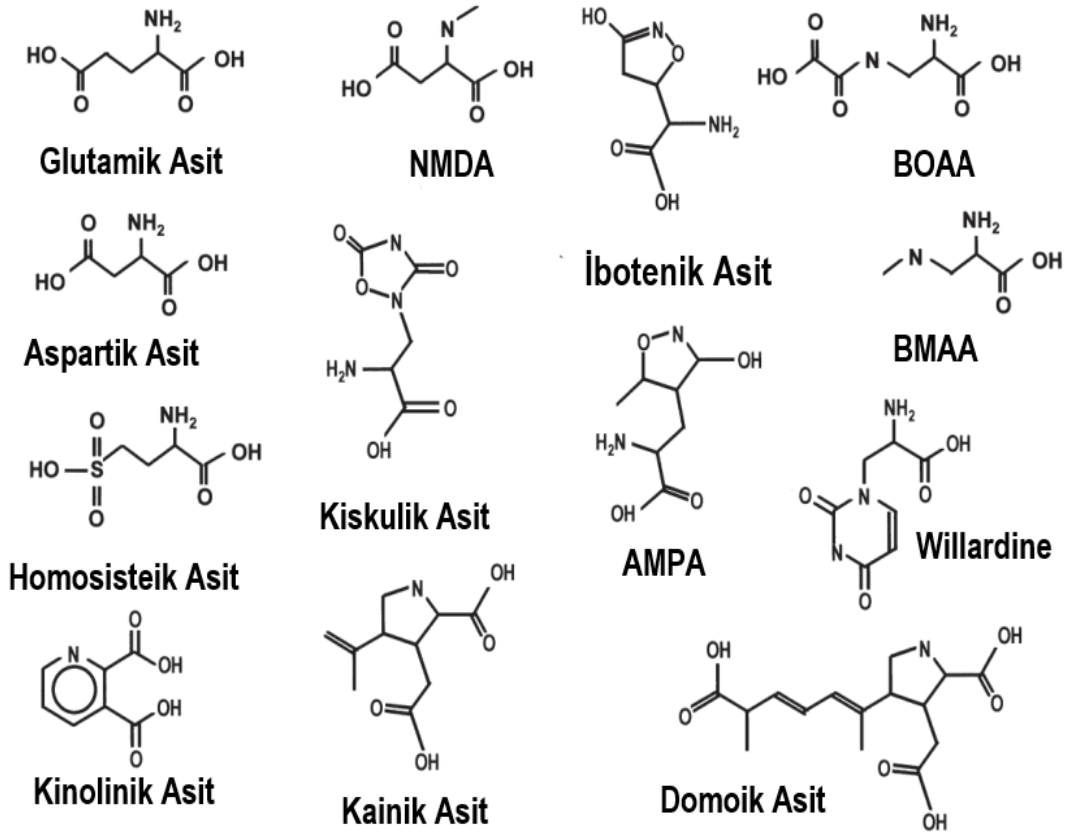
Sodyum, potasyum, magnezyum, kalsiyum, kobalt, nikel, bakır, molibden gibi metallerin iyonları hücrelerin yaşamsal faaliyetlerini sürdürmesinde önemli işlevlere sahip olmakla birlikte toksik dozları çeşitli patolojik süreçleri başlatmaktadır (Sigel vd 2013). Örneğin iskemi sırasında intrasellüler artan kalsiyum miktarının nöronal hasara ve ölüme sebep olduğu bilinmektedir (Banoa ve Ankarcona 2018).

Lucas ve Newhouse tarafından, fare retinası üzerinde glutamatın etkisi incelenirken ilk kez glutamatın nörotoksik olduğu tanımlanmıştır (Lucas ve Newhouse 1957). Daha sonra bu nörotoksik etkinin eksitatör aminoasitlerin yapmış olduğu etkiden kaynaklandığı gösterilmiştir (Olney vd 1978).

2.2. Eksitotoksisite

Eksitotoksisite terimi ilk kez glutamat reseptör aktivasyonunun sebep olduğu hızlı nöronal hücre ölümünü tanımlamak için kullanılmıştır (Olney vd 1971). Bu terim daha sonra nöronlarda farklı glutamat reseptörü alt tiplerinin aktivasyonu ile daha uzun süren hücre ölümü süreçlerini tanımlamak için kullanılmıştır (Wang ve Swanson 2020).

Glutamat veya eksitator amino asitlerin aşırı salınımı ile beraber glutamat reseptörlerinin hiperaktivasyonu, intrasellüler kalsiyum iyonu (Ca^{2+}) artışına neden olur. Böylece kalsiyuma bağımlı yollar aktive olarak eksitotoksik nöronal ölümü indüklenir (Dong vd 2009, Choi 2020). Endojen ve eksojen kaynaklı eksitator etkiye sahip bazı amino asitlerin kimyasal yapıları **Şekil 2.2.1**'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2.1 Endojen ve eksojen kaynaklı eksitator etkiye sahip bazı amino asitlerin kimyasal yapıları. (BMAA; β -metilamino-L-alanin, BOAA; β -oksalilamino-L-alanine (Doblo 1999))

Eksitotoksisite klasik olarak NMDA reseptör aktivasyonu ile nöronal nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından NO ve mitokondriden süperoksit (O_2^-) üretimine sebep olmaktadır (Wang vd 2020, Choi 2020). Farmakolojik ve genetik yaklaşımlar kullanılarak

yapılan çalışmalar NMDA reseptör aktivasyonu ile üretilen süperoksitin mitokondriden ziyade öncelikle Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat (NADPH) oksidazdan kaynaklandığını göstermektedir. NADPH oksidaz'ın plazma membranına lokalize olması süperoksitin ekstraselüler salınımını ve eksitotoksik hasarın hücreden hücreye yayılımını açıklamaktadır (Wang vd 2020). NMDA reseptörü (NMDAr) NADPH oksidaza bağlayan sinyal yolu, Ca^{2+} akışı, fosfoinositol-3-kinaz ve protein kinaz C ζ 'yi içermektedir. Ayrıca non-iyonotropik sinyal yoluyla aktive olan NADPH oksidaz kısmen fosfoinositol-3-kinazın GluN2B reseptör alt birimlerinin C-terminal bölgelerine bağlanmasına aracılık etmektedir (Courseya ve Ligeti 2005). Ortamda bulunan nitrik oksit ve süperoksitin reaksiyonu sonucu oldukça sitotoksik olan peroksinitrit ($OONO^-$) oluşur. Peroksinitrit, lipid peroksidasyonu, DNA hasarı, protein nitrasyonu ve eksitotoksikite sırasında meydana gelen hücre ölümünden sorumlu başlıca tür olarak tanımlanmaktadır (Bedard ve Krause 2007, Radi 2018, Wang vd 2020).

2.3. Kalsiyum Homeostazı

Kalsiyum iyonları büyüme, farklılaşma, membran uyarılabilirliği, enzim metabolizmasının fosforilasyon ve defosforilasyon yoluyla kontrolü, C kinaz fonksiyonları, kalmodulin-düzenli enzim fonksiyonları, kalpainleri içeren fonksiyonlar, ekzositozda çeşitli moleküllerin salgılanması, sinaptik aktivite ve programlı hücre ölümü gibi hücre fonksiyonlarının yürütülmesinde önemli intrasellüler ikincil habercilerdir. Nöronlar sitozolik Ca^{2+} seviyelerinin sıkı bir şekilde kontrol edilmesini sağlamak için özel homeostatik mekanizmalara sahiptir (Brini vd 2014, Hangen vd 2018). İntrasellüler alanda Ca^{2+} endoplazmik retikulum (ER) ve mitokondri organelleri tarafından düzenlenir. Nöronlara Ca^{2+} girişi iyonotropik glutamat reseptörleri ve voltaj bağımlı kalsiyum kanalları gibi plazma membran reseptörleri yoluyla gerçekleşir. Dinlenme halinde serbest Ca^{2+} seviyeleri düşük düzeyde tutulmaktadır (Sattler ve Tymianski 2000). Böylece iyon kanalı gözeneginin yakınında veya intrasellüler Ca^{2+} salınım bölgelerinde meydana gelen lokal Ca^{2+} yükselmeleri etkili bir şekilde enzimleri veya komşu iyon kanallarını aktive edebilmektedir (Arundine vd 2003).

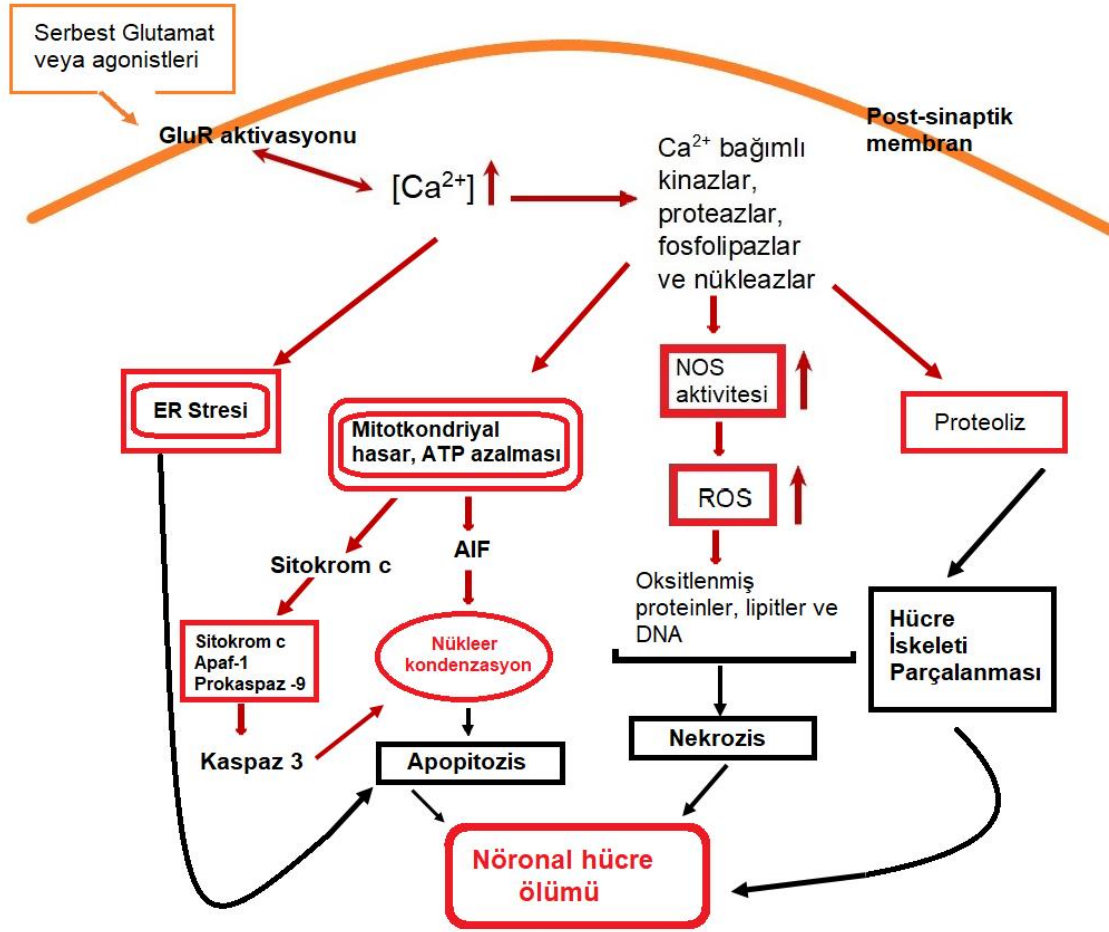
Nöronlar hem intrasellüler kalsiyum düzeyini hem de Ca^{2+} iyonu lokasyonunu Ca^{2+} girişi, akışı, tamponu ve internal depolanma arasındaki kompleks etkileşim yoluyla kontrol edebilmektedir. Fizyolojik şartlar altında bu prosesler aynı hücrede birbirinden bağımsız sinyal kaskadı ile sağlanmaktadır (Choi 1988). Ca^{2+} homeostazını korumak için iki ana sistem vardır. Birincisi plazma membran kalsiyum (PMCA) pompası içeren PMCA taşıyıcılar ve sodyum iyonu (Na^+)/ Ca^{2+} eşanjörü (değiştirici). İkincisi, ER ve sitoplazma arasındaki yüksek konsantrasyon gradiyentini koruyan sarkoplazmik retikulum

(sarco)/ER/ Ca^{2+} Adenozin Trifosfataz (ATPaz) kompleksidir (Nunez ve Hidalgo 2019, Rodriguez-Chavez vd 2021). Bununla birlikte aşırı Ca^{2+} akışı veya intrasellüler hücre depolarındaki Ca^{2+} salınımı Ca^{2+} düzenleyici mekanizmaların kapasitesini aşan seviyeler Ca^{2+} yüklerini arttırabilir. Normalde dinlenim halinde olan veya düşük seviyelerde çalışan Ca^{2+} bağımlı süreçlerin uygunsuz aktivasyonu metabolik dengesizliklere ve nihai hücre ölümüne sebep olmaktadır (Arundine ve Tymianski 2003). İntrasellüler Ca^{2+} 'da aşırı yükselmeler ya doğrudan hücre yapısına zarar veren proteazları, lipazları, fosfotazları ve endonükleazları aktive edebilir veya hücre ölümüne aracılık eden oksidatif serbest radikallerin oluşumunu indükleyebilir. Nükleazların aktivasyonu çekirdekdeki kromatinin ve DNA parçasının organizasyonunu bozar. Kalsiyum ile aktive olan kalpain gibi proteazlar hücre iskeletine ve diğer organellere saldırmaktadır. Protein kinaz C gibi kalsiyum bağımlı sitozolik kinazlar sitoplazmik proteinlerin fosforilasyon durumunu değiştireceğinden hücre fonksiyonunu bozmaktadır. Bunun dışında hücre içi kalsiyum tarafından aktive edilen fosfolipaz A₂ gibi lipazlar da hücre zarına ve diğer organellere saldırarak hücre fonksiyonlarına zarar vermektedir (Doblo 1999, Rodriguez-Chavez vd 2021).

2.4. Glutamat ve Eksitotoksik Etkisi

Glutamat, hafıza, öğrenme, bilişsel, emosyonel, endokrin ve diğer visseral fonksiyonları kontrol edebildiği için, merkezi sinir sisteminin fizyolojisinde önemli rol oynar (Gao ve Bao 2011). Majör eksitator nörotransmitter olarak kabul edilen glutamat, tüm nöronların %80'den fazlasında bulunur ve tüm sinapsların %40'ı glutamaterjiktir (Ezza ve Khadrawy 2014, Attwell ve Laughlin 2001).

Pre-sinaptik sinir terminalleri ve astrositlerden ekstrasellüler alana glutamatın aşırı salınımı sonucunda post sinaptik membranda özellikle NMDA reseptörleri gibi glutamat reseptörleri aşırı uyarılır. Post-sinaptik nöronlarda Ca^{2+} artışı Ca^{2+} bağımlı enzimlerin aktivasyonunun yanı sıra ROS serbest radikallerin oluşumuna sebep olur. Ca^{2+} ve ROS'ta aşırı bir artış mitokondriyal membran potansiyelinin çökmesine, mitokondriyal faktörlerin (Sitokrom-c ve AIF) salınımına yol açar. Sitokrom c, Apoptotik proteaz aktive eden faktör (Apaf-1) ve prokaspaz-9 ile birleşerek apoptozom kompleksini oluşturur. Kompleks kaspaz-3 yolağı ile nükleer kondensasyon ve DNA parçalanması sonucunda eksitotoksositeye bağlı apoptotik hücre ölümüne sebep olur (**Şekil 2.4.1**) (Banoa ve Ankarcona 2018, Rivero-Seguraa vd 2019).



Şekil 2.4.1 Glutamat eksitotoksitesine bağlı hücre ölümü. Glutamat reseptörlerini uyararak hücre içine hızlı Ca^{2+} girişine yol açar. Ca^{2+} bağımlı enzimlerin aktivasyonu ve ROS üretimi artar. Aşırı Ca^{2+} ve ROS, mitokondriyal membran potansiyelinin çökmesine ve mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözeneklerinin açılmasına yol açar. Sitokrom c ve AIF gibi mitokondriyal faktörlerin salınımı gerçekleşir. Apaf-1 ve kaspaz-9'a sitokrom-c bağlanması ile apoptozom kompleksi oluşarak kaspaz-3 aktifleşir. Nükleer yoğunlaşma ve DNA parçalanması ile apoptotik yolakla sonuçlanır. Alternatif olarak, yoğun Ca^{2+} artışı direk mitokondriyal şişme ve hasara, ATP miktarında azalmaya, NOS ve ROS seviyelerinde artış ile protein, lipit ve DNA'nın oksitlenmesine ve akut nöronal nekroza sebep olur. Ca^{2+} artışı ile indüklenen ER stresi apoptotik yolak ile nöronal hücre ölümüne yol açar. Ca^{2+} 'a bağımlı enzimlerin aktivasyonu ile proteoliz aracılığı ile hücre iskeleti parçalanması ve nihayetinde nöronal hücre ölümü gerçekleşir. (Rodriguez-Chavez vd 2021 ve Flores-Soto vd 2013'den uyarlanmıştır.)

Santral sinir sisteminde sinapslarda, glutamatın temizlenmesi esas olarak difüzyon ve taşıyıcı alım ile komşu glial hücreler tarafından yapılır (Hertz vd 1999). Bununla birlikte, glutamaterjik sinapslar komplekstir, morfolojik karakteristikleri (serbest bırakma bölgelerinin sayısı, dentritik dikenlerin varlığı vb.) farklı olabilir ve büyük ölçüde farklı nöron devrelerindeki sinapslar farklı zaman dilimlerinde sinaptik iletişim sergileyebilir. Dahası glutamat dinamiklerinin kesin zaman seyri mikro anatomik sinaptik

özellikler (sinaptik iletişim boyutu, sinaptik morfolojinin kompleksliği, glial sargı vb.) ve glutamat taşıyıcılarının yoğunluğu tarafından değiştirilebilir (Moreira vd 2020).

Sinaptik bir olay sırasında glutamat konsantrasyonunun 1.1mM'a kadar ulaştığı ve bozunma süresinin 1.2 ms olduğu, ekstrasinaptik bölgelerde ise glutamat konsantrasyonunun 190µM'a ulaştığı bilinmektedir (Dzubay ve Jahr 1999). Sinaptik bağlantı kurulmadan önce ise sinaptik glutamatın 25nM ile 600nM arasında değiştiği düşünülmektedir (Mark vd 2001). Bu bazal konsantrasyon sadece glutamat taşıyıcıları tarafından kontrol edilir. Ayrıca bazal konsantrasyon glutamat reseptörlerini aktive edemez (Herman ve Jahr 2007, Moreira vd 2020).

Eksitotoksistide glutamat dinamikleri; glutamatın temizlenme süresinin gecikmesi, depolarizasyon-indüklü salınımdan bağımsız olarak glutamatın bazal konsantrasyonun üzerinde bulunması gibi parametrelere bağlıdır (Mark vd 2001, Moreira vd 2020). Glutamat dinamiklerinin bozulmasına bağlı hem iyonotropik hem de metabotropik glutamaterjik reseptörlerin aşırı uyarımı ile, Alzheimer, Parkinson, Multiple skleroz, epilepsi, iskemi gibi nörodejeneratif hastalıklarda glutamat eksitotoksitesinin sorumlu olduğu gösterilmiştir (Olloquequi vd 2018).

2.4.1. Glutamat reseptörleri

Glutamat reseptörleri iyonotropik ve metabotropik olmak üzere iki ana sınıfa ayrılmaktadır. İyonotropik glutamat reseptörler (iGluR) ligant kapılı iyon kanallarına sahiptir. iGluR uyarılma sonucu kanaldan intrasellüler alana geçen iyonların farklı geçirgenliklerinden ve farklı glutamat agonistlerinin verdikleri yanıtlardan ötürü NMDA, AMPA ve kainat olmak üzere üç ana sınıfa ayrılır. iGluR'ler hızlı eksitator nörotransmisyona aracılık eder. Metabotropik glutamat reseptörler (mGluR), G-proteinine bağlı ikincil haberci olarak nörotransmisyonda nöromodülatör olarak işlev görmektedir. mGluR'ler agonistlere verdikleri yanıtlar ve farmakolojik etkilerine bağlı olarak sekiz alt birimden oluşan üç gruba ayrılır (Flores-Soto vd 2013, Egbenya vd 2021).

(Tablo 2.4.1.1)

NMDAR'leri öğrenme ve hafızayı içeren kognitif fonksiyonlar ve beyin fizyolojisinin çeşitli işlevleri ile ilişkilidir (Hansen vd 2018, Avila vd 2017). Bu reseptörler merkezi sinir sistemi boyunca yaygın olarak dağılırlar, beyinde hipokampus ve kortekste en yüksek yoğunluğa sahiptir (Kumar 2015). Nöronal hücre membranında sinaptik ve ekstra sinaptik bölgelere lokalize olmuştur (Brickley vd 2003).

Tablo 2.4.1.1 Glutamat reseptörlerinin sınıflandırılması.

Glutamat Reseptörleri						
Fonksiyonel Sınıflandırma	İyonotropik Reseptörler			Metabotropik Reseptörler		
	NMDA	AMPA	Kainat	Grup I	Grup II	Grup III
Alt Birimleri Kodlayan Genler	NR1	GluR1	GluR5	mGluR1	mGluR2	mGluR4
		GluR2	GluR6	mGluR5	mGluR3	mGluR6
	NR2A	GluR3	GluR7			mGluR7
	NR2B	GluR4				mGluR8
	NR2C		KA1			
	NR2D		KA2			
	NR3A					
	NR3B					

NMDAr'leri hem ligand hem de voltaj bağımlı aktive edilebilmektedir. Onların aktivasyonu yalnızca glutamatın bağlanmasına bağlı değildir, aynı zamanda nöronal aktivite boyunca post sinaptik membranın depolarizasyonu ile de aktive olmaktadır (Traynelis vd 2010). NMDAR'leri hem post sinaptik depolarizasyona katkı sunan Na⁺ iyonuna hem de kanalın intrasellüler yanıtını belirleyen Ca²⁺ iyonuna geçirendir. Bununla birlikte Ca²⁺ girişinin fazlalığı hücre ölümüne sebep olan çeşitli olaylara neden olmaktadır (Zhou ve Danbolt 2014, Rodriguez-Chavez vd 2021).

AMPA ve kainat gibi diğer iGluR'lerin aksine, NMDA'ların aktivasyonu taban membran potansiyeli boyunca Mg²⁺ iyonu tarafından bloke edilir (Wang ve Peng 2016).

NMDA reseptör komplekslerinde farklı bağlanma bölgeleri tespit edilmiştir. NMDA, glutamat, diğer agonistler ve kompetitif antagonistlerin bağlandığı bölge ekstraselüler alanda yer almaktadır. Bu bölgeye bağlanma gerçekleştiği zaman iyon kanalı açılarak eksitator etki oluşturmaktadır (Hansen vd 2017). Yine ekstraselüler alanda glisin bağlandığı reseptör modülatör bölgesi ko-agonist olarak davranmaktadır. Katyon ve diğer non-kompetitif antagonistlerin bağlandığı bölgeler kanal içerisinde yer almaktadır. Katyon bölgesine Mg²⁺ iyonu bağlandığı zaman membran boyunca iyon akımını bloke etmektedir. Bu bölge non-kompetitif antagonistler ise agonistlerin yapmış olduğu eksitotoksik etkiyi farmakolojik olarak durdurma potansiyeline sahiptir (Cull-Candy vd 2001). Ayrıca NMDA reseptör kompleksinin ekstraselüler alanında modülatör işlev gören poliamin ve inhibitör etki gösteren çinko bağlanma bölgesi bulunmaktadır (Flores-Soto vd 2013).

NMDA reseptörleri heterotetramer yapıda olup, GluN1, GluN2 ve GluN3 olmak üzere üç ana alt birime ayrılır. GluN1 alt birimi glisin bağlanma bölgesinde, dört alt tipe sahip olan GluN2 alt birimi (GluN2A, GluN2B, GluN2C, GluN2D) glutamat bağlanma bölgesinde, iki alt tipe sahip olan GluN3 alt birimi (GluN3A and GluN3B) bazı durumlarda glisin bağlanma bölgesinde bulunur (Granzotto vd 2022). Merkezi sinir sistemine

dağılan NMDA reseptör komplekslerinin en fazla GluN1 alt birimini içerdiği, heteromer yapının oluşması ve reseptör fonksiyonelliği için GluN1 alt biriminin zorunlu olduğu bilinmektedir (Choi vd 2020).

Glutamat reseptörlerinin AMPA ve kainat sınıfları NMDA reseptörleri ile aynı süper aileye aittir ve yaklaşık %25 homoloji gösterir. AMPA reseptörleri GluR1, GluR2, GluR3 ve GluR4 olmak üzere dört alt birimden oluşur ve aktivasyonu için yalnızca glutamat gereklidir (Burnashev vd 1995). Bununla birlikte AMPA reseptörlerinin katyon akışının özgülüğü değişkendir ve esas olarak alt birimlerin kompazasyonu tarafından yönlendirilir. Kalsiyum geçirgenliği GluR2 alt birimi tarafından kontrol edilmektedir. Büyük ölçüde kalsiyum geçirgenliğine sahip tetramer veya heteromer yapıları eksitotoksistide önemli rol oynamaktadır. GluR2 eksikliği yüksek kalsiyum akışına bağlı eksitotoksik hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır (Flores-Soto vd 2013, Geiger vd 1995). Fizyolojik olarak AMPA reseptörlerinin kendisine yakın NMDA reseptörlerinin magnezyum bloğunu uzaklaştırmak için gerekli olduğu düşünülmektedir (Lau vd 2010).

Kainat reseptörleri, GluR5, GluR6, GluR7, KA1 ve KA2 olmak üzere beş alt birimden oluşur. Kainat reseptör kompleks kanallarının özellikleri AMPA reseptörlerine benzer şekilde glutamat uygulamasını takiben iyon akışına izin vermektedir (Chittajallu vd 1996). Buna rağmen çoğunlukla kalsiyum iyonlarına geçirimsizdir. Kainat reseptörlerinin nöronal membranda post sinaptik ve pre sinaptik bölgelere lokalize olduğu gösterilmiştir. Post-sinaptik olarak kainat kanallarının AMPA reseptörleri gibi NMDA reseptörlerinin magnezyum bloğunun etkisini azaltmada etkili olduğu gösterilmiştir (Frerking vd 2001).

Metabotropik glutamat reseptörleri G-protein bağlı tek-peptit yedi transmembran içeren proteinlerdir. Bununla birlikte G-proteinlerinden bağımsız olarak da sinyal oluşturduğu gösterilmiştir (Heuss vd 1999). mGluR intrasellüler etkileri ve sekans homolojisine dayanarak Grup I, Grup II, Grup III olmak üzere üç gruba ve mGluR1-8 olmak üzere sekiz sınıfa ayrılmaktadır. mGluR ikinci haberci sistemleri sayesinde oldukça yavaş enzimatik yanıt ürettikleri için daha ziyade modülatör işlev görmektedir (Salinska vd 2005).

2.5. Transsülfürasyon Yolağı ve Metabolitlerinin Biyolojik Önemi

Hücrelerde sülfür metabolizması ve redoks regülasyonunda merkezi bir rol oynayan transsülfürasyon yolağı, homosisteinden sülfürün transfer edilmesiyle sisteinin oluştuğu metabolik bir yoldur. Bu yolağın anahtar enzimleri olan sistatyonin β -sentaz (CBS) ve sistatyonin γ -lizaz (CSE) çoklu seviyelerde regüle edilir (Sbodio vd 2019).

Memelilerde yolak, sistein biyosentezi için tek yoldur (Werge vd 2021). Diyetle alınan metiyoninden oluşan homosistein CBS tarafından sistatyonine dönüştürülür. Sistatyonin ise CSE tarafından sisteine dönüştürülür (Sbodio vd 2019). (**Şekil 2.5.1**) Yolak, sistein, glutatyon ve H₂S içeren birkaç sülfür metabolitinin oluşmasına yol açar. Optimal hücrel fonksiyonların sürdürülebilmesi için bu yolağın kontrolü kritik öneme sahiptir (Fu vd 2012, Steegborn vd 1999). Transsülfürasyon yolağının bozulması, Huntington, vasküler disfonksiyon ve yaşlanma gibi bazı patolojik şartların oluşmasına katkıda bulunur (Paul vd 2014).

Homosistein genel sağlık durumu için önemli bir biyo belirteçtir. Homosisteinin diyabet, nörodejeneratif hastalıklar (Sharma vd 2015), kognitif bozukluklar (Setién-Suero vd 2016), böbrek fonksiyon bozukluğu, koroner kalp ve serebrovasküler hastalıklarda bağımsız risk faktörü durumu bilimsel Literatür tarafından yaygın olarak desteklenmektedir (Azzini vd 2020).

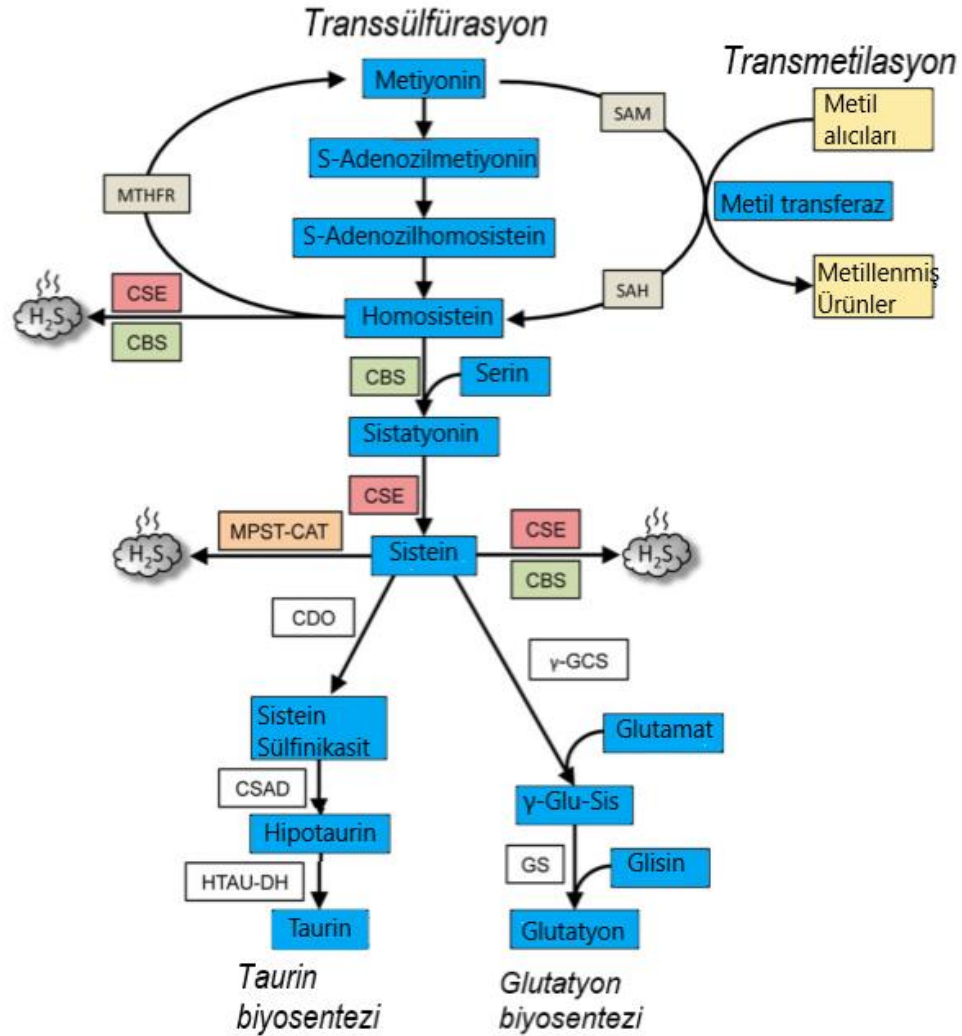
Homosistein diyet proteininde bulunmayan, metiyonin metabolizmasında oluşan sülfür içeren bir aminoasittir (Rehman vd 2020). Homosisteinin metabolizmasının yolakları; transmetilasyon, remetilasyon ve transsülfürasyonu kapsamaktadır (Azzini vd 2020). Transsülfürasyon yolağı, başlangıçta, metiyonin remetillenmesi ile oluşan homosistein döngüsünü oluşturan remetilasyon yolağı ile yakından ilişkilidir. Transmetilasyon metil grubunun bir bileşikten diğerine transferini içerir. Metiyonin, S-adenosil-metionin (SAM) enzim aktivasyonu ile metil grubunu transfer ederek homosisteine dönüşür. Bu reaksiyon SAM ve S-Adenosil Homosistein (SAH) konsantrasyonları ile hücrenin metilasyon dengesini belirler. Homosistein ise N⁵,N¹⁰-metilen tetra-hidrofolat redüktaz (MTHFR) enzim aktivasyonu ile tekrar metiyonine dönüşür (Dash vd 2016). (**Şekil 2.5.1**)

Metiyonin ve homosistein düşük konsantrasyonlarda olduğu zaman remetilasyon döngüsü aktiftir (McRae 2013). Transsülfürasyon yolağı, homosistein ve metiyonin konsantrasyonları arttığında (örneğin post-prandial protein alımı) veya sisteine ihtiyaç duyulduğu zaman çalışmaya başlar. Homosistein, B₆-bağımlı bir enzim olan CBS tarafından sistatyonin aracılığı ile geri dönüşümsüz olarak sistein oluşturmak için modifiye edilir (Verhoef vd 2005).

Protein sentezindeki rolüne ek olarak, sistein temel antioksidan olan glutatyon (GSH) üretiminin önemli bir bileşenidir ve kendisi de antioksidan potansiyele sahiptir. Sistein ve GSH metabolizmasının bozulması sıklıkla anormal redoks homeostazı ve nörodejenerasyonla ilişkilendirilmiştir. Sistein ve GSH tiyol redoks dengesinin korunmasında merkezi bir oynamaktadır. Hem CSE hem de CBS redoks dengesinin düzenlemesinde önemli rol oynar (McBean vd 2015). Transsülfürasyon yolağı ile üretilen sisteinin yaklaşık %50'sinin GSH sentezi için kullanıldığı rapor edilmiştir. Sistein ayrıca

gaz halindeki sinyal molekülü hidrojen sülfür (H_2S) ve diğer sülfür metabolitlerinin öncüsüdür (Mosharov vd 2000).

Sistein, sistein dioksijenaz (CDO), sistein sülfirik asit dekarboksilazın (CSAD) ve hipotaurin dehidrojenaz (HTAU-DH) enzimleri ile taurine oksitlenir (Rose vd 2017). **(Şekil 2.5.1)** Taurin immünomodülasyon, nöromodülasyon, Ca^{2+} homeostazı, anti oksidan ve anti-inflamatuar süreçlerde önemli rol oynar (Vitvitsky vd 2011).

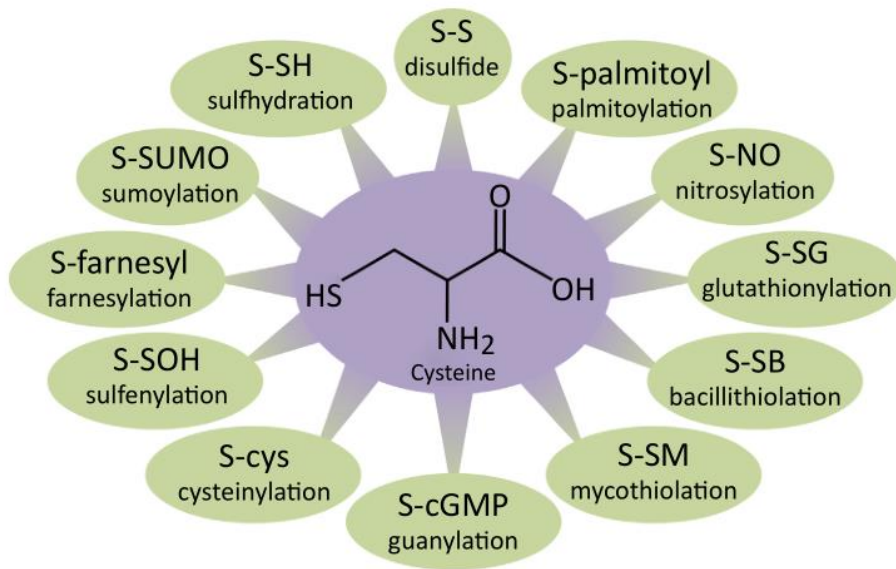


Şekil 2.5.1 Transsülfürasyon Yolağı. Diyette alınan metiyonin sırası ile homosisteine ve sisteine dönüşümünün mekanizması. CBS sistatyonin oluşturmak için serin eşliğinde homosisteine kondanse olur. Sistatyonin substratı CSE'ye bağlanarak sisteini oluşturur. CSE homosisteinden veya sisteinden H_2S oluşturabilir. Sistein ve homosisteinden H_2S üretmek için CSE ile birlikte CBS de kondanse olur. H_2S üretiminde kullanılan üçüncü enzim olan 3-Merkaptopirüvat Sülfür Transferaz (MPST) sistein amino asit transferaz (CAT) ile sisteinden H_2S üretiminde kullanılır. Transsülfürasyon ve transmetilasyon yolağı homosisteinde kesişir. Homosistein N5, N10-metilenetetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) ile metiyonine geri dönüşür. Sistein γ -glutamil sistein sentetaz (γ -GCS) ve glutatyon sentetaz (GS) enzimleri aracılığı ile glutatyona, sistein dioksijenaz (CDO), sistein CSAD ve HTAU-DH enzimleri ile taurine katabolize olur. (Sbodio vd 2019'dan uyarlanmıştır.)

2.5.1.1. Sistein metabolizması

Sistein, hücrel redoks, sülfür metabolizması, protein sentezi ve işlevselliğinde anahtar fonksiyonlara sahip sülfür içeren bir amino asittir. Sistein oksidatif bir ortamda disülfid köprüleri oluşturma özelliği ile proteinlerin yapısında önemli rol oynar. Yüksek reaktivitenin bir sonucu olarak, sistein tiyoller reaktif oksijen türleri ile reaksiyona girerek, sülfenik, sülfirik ve sülfonik asit gibi türler oluştururlar. Sistein ayrıca koenzim A, biotin gibi çeşitli kofaktörlerin sülfür kaynağı olarak kullanılır (Paul vd 2018).

Sistein, çok sayıda farklı translasyon sonrası modifikasyona uğrayabilir. Örneğin, S-palmitoilasyon bir çok nöronal proteinde bulunan lipit modifikasyonun tek geri dönüşümlü şeklidir. En son keşfedilen sülfürhidrasyon inflamasyondan nöroproteksiyona kadar çeşitli fizyolojik yanıtlarda rol oynar. (**Şekil 2.5.1.1**) (Miseta ve Csutora 2000, Paul vd 2018).



Şekil 2.5.1.1.1 Sisteinin translasyon sonrası modifikasyonları. Sistein, kükürt atomunun nükleofilik olduğu ve hücrelerde bir çok translasyon sonrası oksidatif modifikasyona uğrayan bir tiyol grubuna sahiptir. İçeriğe bağlı olarak bu modifikasyonlar çok çeşitli sinyal yollarına katılırlar. (Paul vd 2018)

Yarı esansiyel bir aminoasit olan sistein endojen olarak transsülfürasyon yolağı ile metiyoninden sentezlendiği kadar diyetle de alınabilir (Miseta ve Csutora 2000, Paul ve Snyder 2015). Metiyonin S-adenosilmetiyonine dönüşümünü takiben hücrede önemli bir metil grubu donörü olarak işlev görür. Metil grubu transferinden sonra, S-adenosilhomosistein, adenosin ve homosisteine hidrolize edilir. Sistein CBS tarafından

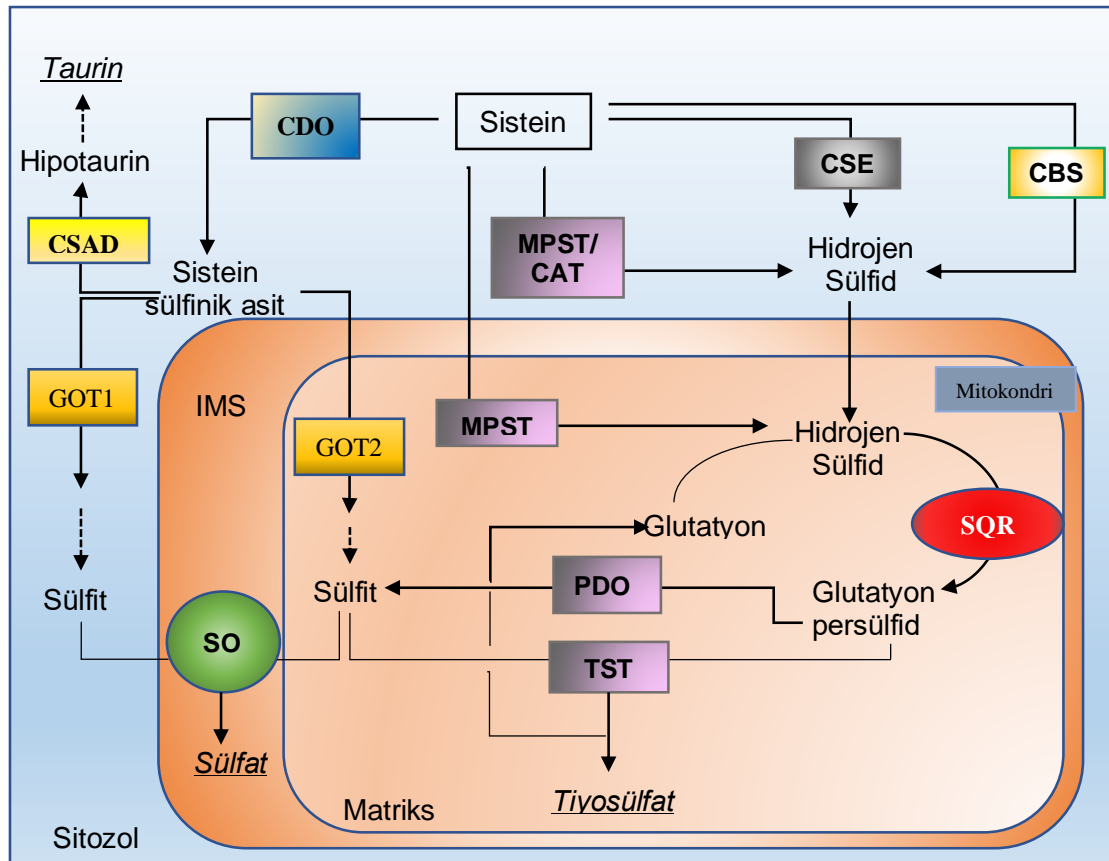
serin ve homosisteinin kondenzasyonu ile oluşturulan sistasyonun CSE enzimi ile katalizlenmesi sonucu sentezlenir. CSE, memelilerde sistein için bilinen tek biyosentetik enzimdir. Bu yüzden eksikliği eksojen sistein bağımlılığına yol açar. CSE karaciğer ve gastrointestinal sistem gibi periferel dokularda yüksek oranda eksprese edilir. CSE'nin beyinde de sentezlendiği ve önemli nöroprotektif fonksiyonlara sahip olduğu gösterilmiştir (Mani vd 2011, Gaull vd 1972).

Hücrelerdeki "serbest" sisteinin büyük çoğunluğu memelilerde başlıca antioksidan işlevi gören glutatyona (γ -glutamilsisteinilglisin GSH) bağlanır. GSH ATP-bağımlı glutamin-sistein sentaz ve GS'nin iki basamaklı reaksiyonu ile glutamat sistein ve glisinden sentezlenir (Soria vd 2016). Sistein ve GSH metabolizmasının bozulması sıklıkla anormal redoks homeostazi ve nörodejenerasyon ile ilişkilendirilmiştir (McBean vd 2015).

Ekstraselüler alanda, sistein sistine oksitlenir. Membranlar arasında sistein ve sistin farklı membran taşıyıcıları tarafından taşınır. Santral sinir sisteminde, glial hücreler beyinde GSH sentezi için sistin-glutamat antiporter (sistem xc-) yolu ile sistin aktarır. Sistein eksitator aminoasit transporter ile geçiş sağlar. Bu transporter defisitleri hücresele GSH'ın azalmasına, oksidatif stres ve nörodejenerasyona sebep olur (Mandal vd 2010, Bundel vd 2011). Protein veya GSH sentezi için kullanılmayan sistein, iki farklı yolla metabolize edilir; oksidatif sistein katabolizması ve H₂S yolağı (Paul vd 2018).

2.5.1.1.1. Sistein katabolizmasında sülfid (SO₃²⁻) ve hidrojen sülfid (H₂S):

Sisteinin katabolizmasında oksidatif yolağın son ürünü taurin ve sülfat iken, H₂S yolağının son ürünü tiyosülfat ve sülfattır. Sülfid, her iki katabolik yoldada ortak bir ara bileşiktir. Sülfid sitotoksik olarak kabul edilir ve nörotoksik S-sülfonat türlerinin oluşumunda yer alır. Sonuç olarak, sistein veya H₂S katabolizmasının son basamaklarındaki bir eksiklik, sülfid birikimi ile ciddi ensefalopati formlarına yol açar (Kohl vd 2019).



Şekil 2.5.1.1.1 Sistein katabolizmasında sülfid ve hidrojen sülfidin oluşumu. Sistein katabolizmasında CBS, CSE ve MPST-CAT enzimleri aracılığıyla dört farklı yoldan hidrojen sülfid oluşur. Hidrojen sülfid intermembran boşluktan (IMS) mitokondriye geçerek iç mitokondriyal membranın matriksinde bulunan sülfid kinon oksidoredüktaz (SQR) ile glutatyon persülfid, ardından persülfid dioksijenaz (PDO) ile ara ürün sülfid oluşur. Sisteinin CDO ile oksidatif katabolizması sonucu oluşan sistein sülfirik asit, sitozolde glutamat oksaloasetat transaminaz 1 (GOT1) ve mitokondriyal matrikste glutamat oksaloasetat transaminaz 2 (GOT2) enzimleri aracılığı ile sülfid oluşumu gerçekleşir. Tüm katabolik yollar sonucunda oluşan sülfid intermembran boşlukta bulunan SO enzimi ile sülfata dönüşür. Altı çizili olanlar son ürünlerdir. (Kohl vd 2019'dan uyarlanmıştır.)

H₂S, memelilerde karbon monoksit (CO) ve nitrik oksit (NO) yanında üçüncü gazotransmitter olarak tanımlanmıştır (Chen vd 2015, Rose vd 2017). Biyolojik bir mediatör olan H₂S vazodilatasyon, sitoproteksiyon, inflamasyon ve anjiyogenezi modüle eder (Yagdia vd 2016). H₂S esas olarak mitokondride oksidasyon yoluyla metabolize edilir. Bununla birlikte H₂S metabolizması sitozolde metilasyon yoluyla gerçekleşir (Yagdia vd 2016). Sistein katabolizması ile oluşan endojen H₂S oluşumunu katalizleyen üç enzim belirlenmiştir: CBS, CSE ve sistein amino asit transferaz (CAT) ile 3-merkaptopirüvat sülfürtransferaz (MPST). CBS ve CSE enzimleri aynı zamanda homosisteini de katabolize ederek sülfid oluşumunu sağlar (Chiku vd 2009) (**Şekil 2.5.1.1**). Bahsedilen enzimlerin dağılımı dokularda değişkenlik göstermektedir. Beyinde

3-MPST/CAT CBS'ye göre daha fazla bulunmaktadır. H₂S'nin depolanma şekli 3-MPST'nin yapısına sülfan sülfür olarak katılmasıyla gerçekleşir (Kimura 2015). CBS özellikle hipokampüs olmak üzere santral sinir sisteminin tamamında bulunur (Abe ve Kimura 1996). CSE ise torasik aort, ileum, portal ve uterusu H₂S oluşumunda baskın enzimdir (Szabo 2007).

Endojen H₂S üretim/katabolizma dengesinin bozulması ile H₂S toksisitesinin indüklendiği gösterilmiştir. Örneğin etilmalonik ensefalopatide H₂S katabolizması yetersiz olduğundan toksik seviyelerde H₂S biriktiği rapor edilmiştir (Tiranti vd 2009). Spontan oksidasyonun azalması nedeniyle hipoksik koşullarda H₂S biriktiği bildirilmiştir. Şöyle ki; CBS ve CSE hipoksik koşullarda mitokondriye transloke olur. Böylece hipoksi durumunda mitokondride toksik H₂S birikir. Başka bir çalışmada iskemi sırasında beyinde biriken H₂S'nin farelerde kalıcı fokal serebral iskemi sonrası beyin hasarının olası bir aracısı olduğu gösterilmiştir. H₂S sentez enzimlerinin inhibisyonu enfarktüs boyutunu azaltmaktadır (Qu vd 2006). Mevcut bilgiler, düzensiz H₂S seviyelerinin kanser, enfeksiyon, diyabet, hipertansiyon ve nörodejeneratif hastalıklar dahil olmak üzere bir dizi patolojik süreçle bağlantılı olduğunu göstermektedir (Marutani ve Ichinose 2020).

"Sülfidler", kükürt dioksit, sodyum sülfid, sodyum bisülfid, potasyum bisülfid, sodyum metabisülfid ve potasyum metabisülfid gibi bir grup bileşiği kapsayan genel bir terimdir (Tutuncu vd 2012). Sülfid memeli dokusunda sülfür içeren amino asitlerin katabolizması sırasında iki basamakta üretilen ara üründür. İlk basamakta sitozolik enzim sistein dioksigenaz sistein sülfidik asit (CSA) oluşumunu katalizler. İkinci basamakta CSA mitokondride bir transaminasyona uğrar, bu sülfid oluşumuna yol açar ya da sitozolde dekarboksile edilir bu da hipotaurinin oluşumuna yol açar (**Şekil 2.5.1.1**) (Schwarz vd 2009).

SO enzim eksikliği ve Moco eksiliğinde sülfid birikimi, toksisiteye yol açmaktadır (Stipanuk 2020). Sülfid birikimi ilk önce karaciğerde olmaktadır. Daha sonra sülfid plazmada saptanabilir ve son olarak sülfid kan-beyin bariyerini geçerek yıkıcı ve ilerleyici bir nöronal hasarı tetikler (Schwarz vd 2009). Sülfid konsantrasyonu, 0.1-1 mM olduğu zaman, glutamat dehidrogenaz ve malat dehidrogenazın inhibisyonu, Nikotinamid Adenin Dinükleotit (NADH) konsantrasyonunda, mitokondriyal membran potansiyelinde ve sonunda ATP üretiminde azalma gibi önemli hücresel fonksiyonlarda bozulma olduğu gösterilmiştir (Vincent vd 2004). Sülfid ağırlıklı olarak mitokondri üzerine etki etmektedir. Çünkü Sülfidin elektron taşıma zincirine zarar vererek mitokondriyal solunum, membran potansiyeli ve Ca²⁺ tutma kapasitesini azalttığı bilinmektedir. Buna paralel olarak, dışarıdan sülfid verilmesi, farklı nöronal ve böbrek hücre hatlarında artan ROS seviyelerine yol açmaktadır. Ayrıca merkezi bir metabolik enzim olan glutamat dehidrogenaz (GDH) doza bağlı bir şekilde sülfid tarafından inhibe edilir. GDH inhibisyonu

trikarboksilik asit döngüsünün akışında azalmaya yol açtığı ve bununda ATP üretiminin azalmasına neden olabileceği iddia edilmektedir (Zhang vd 2004).

2.5.2. Molibden kofaktör ve sülfid oksidaz enzim eksikliği

Mitokondriyal intermembran boşlukta bulunan SO hidrojen sülfid metabolizması ve kükürt içeren aminoasitlerin son basamağında inorganik sülfidin sülfata oksidasyonunu katalizleyen moco bağımlı mitokondriyal molibdohemoproteindir. (Salih vd 2013, Misko vd 2020). Tepkime sırasında iki sitokrom c molekülü yükseltgenir. (Kohl vd 2019, Johnson vd 1980).

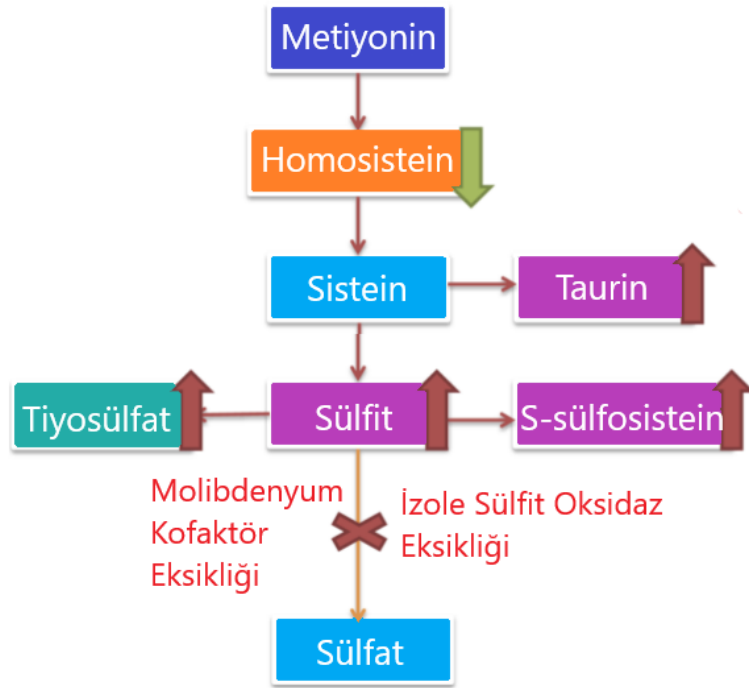
SO yapısal olarak her bir monomerin N-terminalinde sitokrom b₅-tipi hem bölgesi, katalitik molibdenyum kofaktör içeren bölge ve C-terminalinde dimerizasyon bölgesini içeren homodimerlerden oluşur (Kisker 1997). SO'nun enzimatik fonksiyonları kazanabilmesi için spesifik translokasyon ve maturasyon gereklidir. Bu süreç son derece organize edilmiştir ve SO-apo proteinin hedeflenmesini ve mitokondriyal işlenmesini, Moco ve hem kofaktörlerinin aşamalı entegrasyonunu ve homodimerizasyonunu içerir. SO'nun katalitik mekanizması sülfitten iki elektronun Moco'ya transferinin ardından hem domain yoluyla sitokrom c'ye elektron transfer adımlarını kapsar. SO içindeki verimli elektron transferi hem domainin dinamik hareketlerine bağlıdır (Klein ve Schwarz 2012).

SO karaciğer ve böbrekte yüksek oranda eksprese edilirken, beyinde çok düşük seviyede olduğu tespit edilmiştir. SO yalnızca oksidatif sistein katabolizmasında terminal enzim olarak işlev görmez. Ayrıca H₂S yolağı ile SO gerektiren önemli miktarda sülfid oluşur. Kemirgenlerde H₂S yolağı üzerinden sülfid üretimi engellendiğinde atılan sülfat miktarının altı kat azaldığı gösterilmiştir (Tiranti vd 2009).

Sülfid oksidaz eksikliği sülfid birikimine ve hücre toksisitesine yol açan sülfid oksidaz (SUOX) genindeki mutasyonların neden olduğu resesif kalıtsal metabolik bir bozukluktur (Reiss 2016). Biyokimyasal olarak, sülfid, tiyosülfat ve SSC'nin dokuda birikimi ve yüksek oranda idrarda bulunması ile karakterizedir. Etkilenen hastalarda neonatal nöbetler, ensefalopati ve psikomotor retardasyon gibi ciddi nörolojik semptomlar sıklıkla gözlenir, ancak nörolojik disfonksiyonun patogenezi hala tam olarak anlaşılamamıştır (Wyse vd 2019, Spiegel vd 2022).

Molibden kofaktörü, ksantin dehidrojenaz, sülfid oksidaz, aldehit oksidaz ve mitokondriyal Amidoksim İndirgeyici Bileşen (mARC) olmak üzere dört enzimin katalitik aktivitesi için gereklidir. Molibden kofaktör içeren enzimler karbon, sülfür ve nitrojen metabolizmasında önemli rol oynar (Paul vd 2018). Molibden kofaktör eksikliğinde doğumdan sonra hızlı ilerleyen şiddetli nörolojik hasar ile karakterize öldürücü nadir izole sülfid oksidaz eksikliğine benzer otozomal resesif hastalık tablosu oluşur. Çoğunlukla

sülfit ve S-sülfosistein olmak üzere toksik metabolitlerin birikmesinden kaynaklanan hipoksik-iskemik ensefalopatiji taklit eder. (Alonzo Martínez vd 2020). Klinik olarak, MoCo eksikliği (MoCD) olan hastalarda yenidoğan döneminde beslenme güçlüğü, inatçı yenidoğan nöbetleri, ilerleyici ensefalopati, yüz dismorfik özellikleri, tiz ağlama ve şiddetli nörolojik anormallik içeren semptomlar sergiler (Bayram vd 2013).



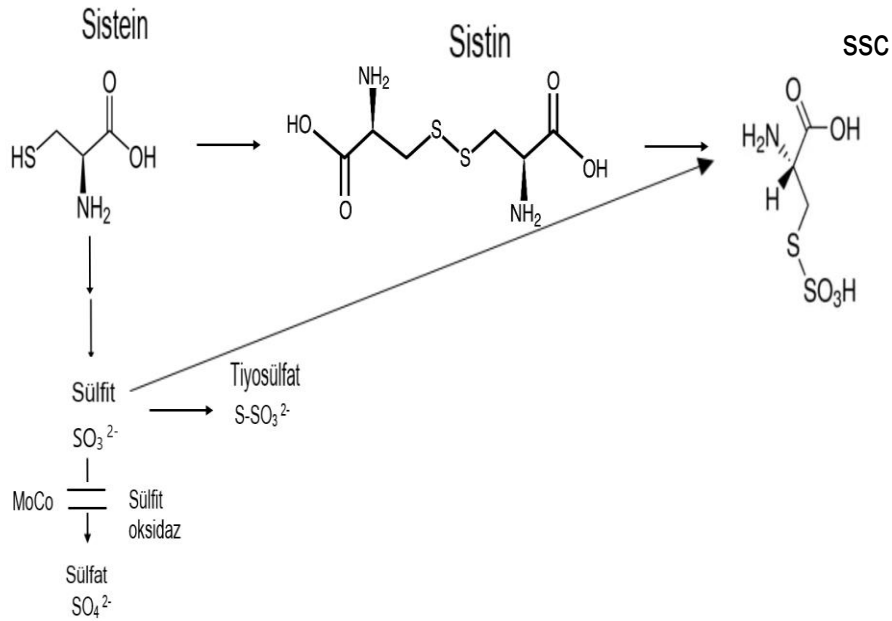
Şekil 2.5.2.1 Molibden Kofaktör ve/veya Sülfit Oksidaz enzim eksikliğinde artış gösteren metabolitler. Sisteinin oksidatif katabolizmasında Moco eksikliği ve/veya SO eksikliğinde tiyosülfat, sülfit, SSC miktarı artarken; homosistein miktarı azalmaktadır (Salih vd 2013, Alonzo Martínez vd 2020'den uyarlanmıştır.).

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

SSC, ilk olarak SO enzim eksikliği olan hastaların idrarında ve plazmasında keşfedilen bir metabolittir. SO enzim eksikliğinde sülfür içeren amino asit metabolizması bozularak beyin hasarı ve mental retardasyon olduğu bildirilmiştir (Olney vd 1975).

SSC'nin moleküler yapısı, hem nöroeksitator hem de nörotoksik özelliklere (eksitotoksik amino asitler) sahip olan glutamat ve benzeri asidik amino asitlerin yapısına çok benzer (Olney vd 1975). Elektrofizyolojik çalışmalar SSC'nin glutamata benzer depolarize edici özelliklere sahip olduğu ve NMDA reseptörlerini aktive ettiğini göstermektedir (Abbas vd 2008, Mewett vd 1983). SSC yeni doğan ratlara deri altından

veya yetişkin ratlara inteserebral olarak uygulandığında merkezi sinir sisteminde glutamat benzeri nöropatalojiyi indüklediği gösterilmiştir (Olney vd 1990). NMDA reseptörlerini aktive etmenin yanı sıra, yükselmiş SSC, glutatyon sentezinde hız sınırlayıcı enzimin inhibisyonu ile nörotoksik olabilir, böylece serbest radikal süpürücülerin hücre içi seviyelerini azaltır (Moore vd 1987).



Şekil 2.5.3.1 Sistein katabolizmasında SSC oluşumu. Molibden kofaktör ve sülfite oksit enzim eksikliğinde biriken sülfite, sistin ile birlikte SSC oluşumunu sağlar.

SSC'nin, SO eksikliğinde beyin hasarından sorumlu nörotoksik ajan olabileceği varsayılmaktadır. Molibden kofaktör ve sülfite oksit enzim eksikliğinde sülfite sülfata dönüşemez ve birikmeye başlar. Bu durumda toksik etki oluşur. Proteinlerin di-sülfite köprülerini bozabilir. Sisteinin metabolitlerinden olan sistin ile birleşerek SSC oluşumunu artırır. (**Şekil 2.5.3.1**) Molibden kofaktör ve sülfite oksidaz enzim eksikliği olan hastaların idrarında, sülfite, SSC, taurin ve tiyosülfat artarken, plazmada SSC ve taurinin arttığı, sistin ve homosisteinin ise azaldığı rapor edilmiştir (Claerhout vd 2018).

Yapılan in-vivo çalışmalarda SSC'nin sistein metabolizmasında oluşan metabolitler arasında yer aldığı gösterilmiştir. Sistein sülfonik asidin oksidatif deaminasyonu veya α -ketoglutarat ile sistein sülfonik asidin transaminasyonu tarafından oluşturulan sülfite sistin ve sisteamin gibi disülfite bileşikler ile reaksiyona girebilir ve sırasıyla S-Sülfosistein ve S-Sülfosisteamin oluşur (Marco ve Coletta 1961).

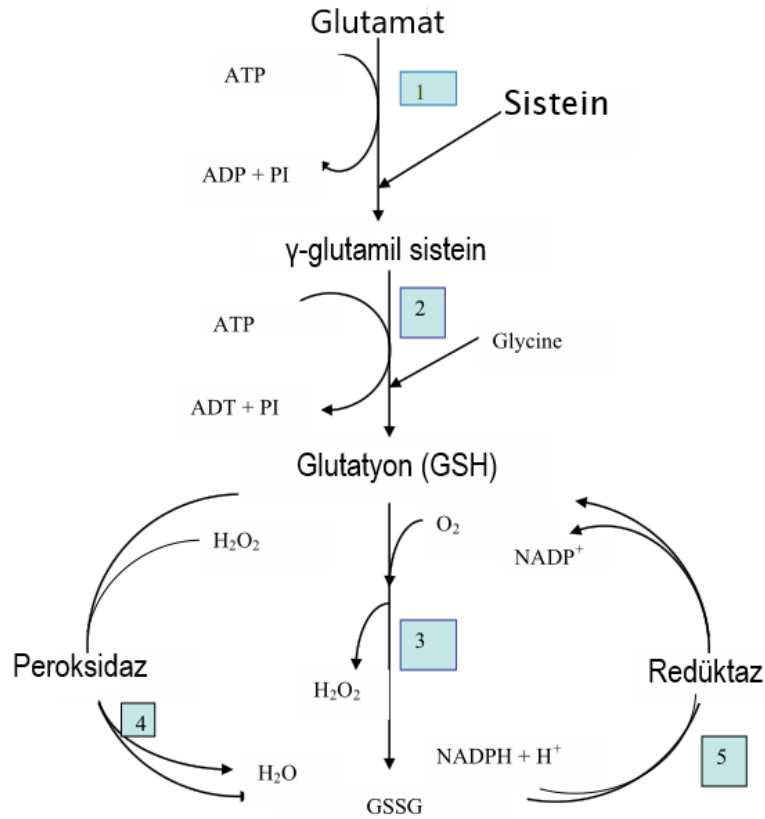
2.5.4. Glutasyon

Mitokondride metabolik süreçler sırasında sadece protonların değil aynı zamanda elektronlarında tamponlanması gerekmektedir. Oksidatif süreçler elektron transferini içermekte ve mevcut elektronları dengede tutmak için redoks tamponlarına ihtiyaç duymaktadır. Böylece kararlı bir redoks ortamı sağlanmaktadır. Biyokimyasal bir ortamda redoks tamponlama elde etmek için, disülfid oluşumu ve redoks dengesi yoluyla tiyol gruplarının dahil edilmesi gerekmektedir (Schafer ve Buettner 2001). Genel olarak, dengelenmiş redoks için mevcut tiyol gruplarının ya tioredoksin proteinlerinde ya da GSH'de bulunduğu kabul edilmektedir. GSH'deki tiyol grubu, GSH'nin redoks tamponu olarak etki ettiğini açıklamaktadır (Requejo vd 2010).

Tripeptit glutasyon (gama-glutamil-sisteinil-glisin: GSH) tüm hücrelerde glisin, sistein ve glutamattan sentezlenmektedir (Reid ve Jahoor 2000). Tüm hücrelerde sentezlenmesine rağmen, temel olarak karaciğerden sentezlenir. Hücresel GSH' nin çoğu (%85-90) sitozolde bulunmaktadır (Beutler 1989).

GSH'nin sentezlenmesi iki basamakta gerçekleşmektedir. İlk olarak sisteinin amino grupları ve glutamik asitin γ -karboksi grupları arasında peptit oluşumunu γ -glutamil sistein sentaz katalize eder. Bu basamak, GSH sentezinde hız sınırlayıcı basamaktır (Meister ve Anderson, 1983). Bir sonraki basamakta glisin, GSH oluşturmak için γ -glutamil sistein ile birleşir. Bu reaksiyon glutasyon sentetaz tarafından katalize edilir. GSH, GSH sentezinin geri besleme mekanizmasının kontrolü işlevini gören ilk enzim γ -glutamil sistein sentetaz üzerinde inhibitör etkiye sahiptir. Nadir kalıtsal glutasyon sentetaz eksikliği vakalarında, GSH sentezinde ikinci reaksiyon durdurulur. Biriken γ -glutamil sisteinin büyük miktarı 5-oksiproline katabolize edilir ve idrarla atılır (Beutler 1989).

GSH işlevlerinin çoğu, indirgenmiş formunu gerektirmektedir. Bu durumda serbest bir sülfürhidril grubuna sahiptir ve GSH olarak adlandırılmaktadır. Bununla birlikte, sistein kalıntısı enzimatik olmayan bir şekilde glutasyon disülfide (GSSG) kolayca oksitlenir. GSH'ın fonksiyonlarının çoğu indirgenmiş formunu gerektirdiğinden, GSSG'nin GSH'ye indirgenmesi için glutasyon redüktaz formunda aktif bir enzim mekanizması mevcuttur. Bu enzim hidrojen donörü olarak NADPH ve NADH kullanır. **(Şekil 2.5.4.1)** Bu nedenle, GSH'nin aktivitesi, riboflavin alımına çok bağlıdır. Ek olarak, metabolizmasında yer alan enzimlerin yanı sıra GSH konsantrasyonu belirgin şekilde diyetten etkilenir (Beutler 1989).



Şekil 2.5.4.1 Glutatyon metabolizması. Reaksiyon 1. γ -Glutamilsistein sentetaz. sisteinin amino grupları ve glutamik asitin γ -karboksik grupları arasında peptit oluşumunu γ -glutamil sistein sentaz katalize eder. Reaksiyon ATP harcanarak gerçekleştirilir. Reaksiyon 2. Glutatyon sentetaz. glisin, GSH oluşturmak için γ -glutamil sistein ile birleşir. Reaksiyon ATP harcanarak gerçekleştirilir. Reaksiyon 3. GSH'nin O₂ tarafından oksidasyonu; GSH'nin GSSG'ye dönüşümü de serbest radikaller tarafından değiştirilir; Reaksiyon 4. GSH peroksidaz; Reaksiyon 5. GSSG redüktaz. (Şekil Courtney martin 2016'dan uyarlanmıştır.)

Memeli hücresinde GSH'nin intrasellüler konsantrasyonu 0,5-10mM arasındadır ve bunun yaklaşık %85-90'ı sitozolde bulunur. Bu nedenle GSH en yaygın hücre içi tiyol ve en önemli endojen antioksidan ve temizleyici olarak kabul edilir. [GSH]:[GSSG] oranı genellikle hücrel redoks durumunun bir göstergesidir ve normal fizyolojik şartlar altında bu değer 10'dur (Wernerman ve Hammarqvist 1999). GSH'nin fizyolojik olarak temel fonksiyonları:

- ✓ GSH, elektrofilik metabolitlerin ve ksenobiyotilerin detoksifikasyonunda kullanılır. Hücreleri reaktif oksijen bileşiklerinin toksik etkilerinden koruyan etkin serbest radikal süpürücü etkiye sahiptir (Reid ve Jahoor 2000).
- ✓ GSH, glutatyon peroksidaz enzimi aracılığı ile sülfürhidrilleri oksitleyecek peroksitleri uzaklaştırır ve -SH gruplarının oksitlenmesini önler (Beutler 1989).
- ✓ Lökotrienlerin sentezi için GSH gereklidir, bu da GSH'yi önemli bir inflamasyon mediatörü yapar (Beutler 1989).

- ✓ GSH amino asit taşınmasında önemli bir rol oynar. Gıda yoksunluğu sırasında bir sistein rezervi kaynağıdır (Fukagawa vd 1996).

Beyin, yüksek seviyelerde reaktif oksijen ve nitrojen türleri üreten ve verimli redoks homeostatik kontrolleri gerektiren, vücutta metabolik olarak en aktif organlardan biridir (Paul vd 2018). GSH veya redoks duyarlı sisteinler redoks dengesini, reaktif türlerin detoksifikasyonunu ve enzimatik fonksiyonları regüle eder (Franco ve Vargas 2018). Hücre GSH'den uzun süre mahrum kaldığında, geri dönüşümsüz hücre hasarı meydana gelir. Belirli hastalık durumlarında prognoz azalan GSH konsantrasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Reid ve Jahoor 2000). Sonuç olarak GSH metabolizmasının ve kinetiğinin anlaşılması hastalık durumlarında olduğu kadar sağlıkta da önemlidir (Courtney-Martin ve Penchar 2016).

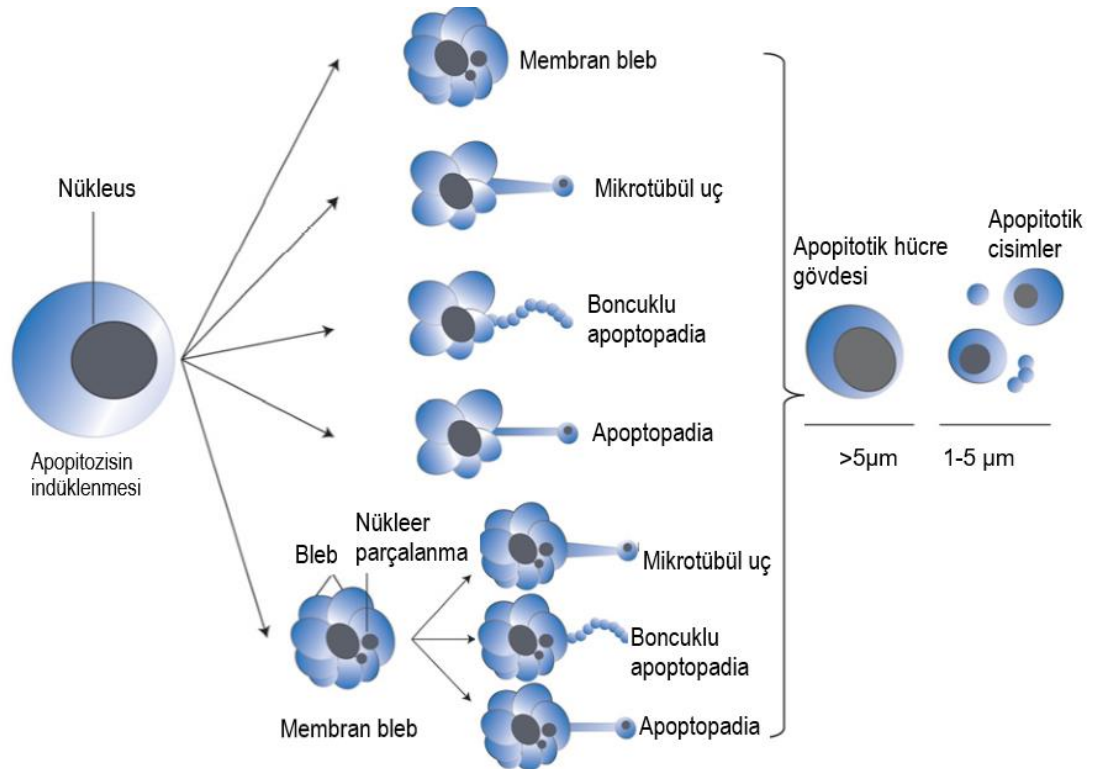
2.6. Apoptozis

Programlı hücre ölümü olarak da bilinen apoptozis, hücre homeostazının sürdürülmesi, hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılması ve gelişim ile ilgili enerji bağımlı biyokimyasal mekanizmaları içermektedir (Jiang ve Wang 2004). Bozulmuş bir apoptotik yolak, nörodejeneratif hastalıklar, iskemik hasar, otoimmün hastalıklar dahil olmak üzere birçok kanser tipinde önemli bir faktördür (Elmore 2007). Apoptozis ekstrinsik ve intrinsik olmak üzere iki şekli vardır. Ekstrinsik apoptotik yol, kaspaz bağımlı olarak tanımlanırken, intrinsik apoptotik yol hem kaspaz bağımsız hem de kaspaz bağımlı yol olarak ortaya çıkmaktadır (Ghatage vd 2012).

2.6.1. Apoptozisde oluşan morfolojik değişiklikler

Apoptotik hücreler tarafından sergilenen bazı morfolojik değişiklikler iyi tanımlanmış ve kanıtlanmıştır. Bu değişiklikler DNA parçalanması, kromatin yoğunlaşması ve sitoplazmanın sıkıştırılması, apoptotik cisimler gibi küçük veziküllerin oluşması ile karakterize olan piknozu, büzüşmüş hücrelerle kendini göstermektedir. Hücreler apoptozun erken evresinde karakteristik bir büzülmeye uğrar (Obeng 2021). Hücrenin boyutu küçülürken, içeriği daha yoğunlaşır. Piknosis (kromatinin geri dönüşümsüz kondensasyonu) olarak bilinen bir fenomen apoptozisin erken evresinde eşzamanlı olarak ortaya çıkar. Hücresel değişiklikler ışık mikroskobu ile gözlemlenebilirken, piknosis gibi hücre altı değişiklikler elektron mikroskobu ile daha iyi görselleştirilebilir. Apoptozisin erken evresini takiben, çekirdeğin parçalanmasını ifade eden karyoreksis olarak bilinen başka bir fenomen ortaya çıkmaktadır. Karyoreksis

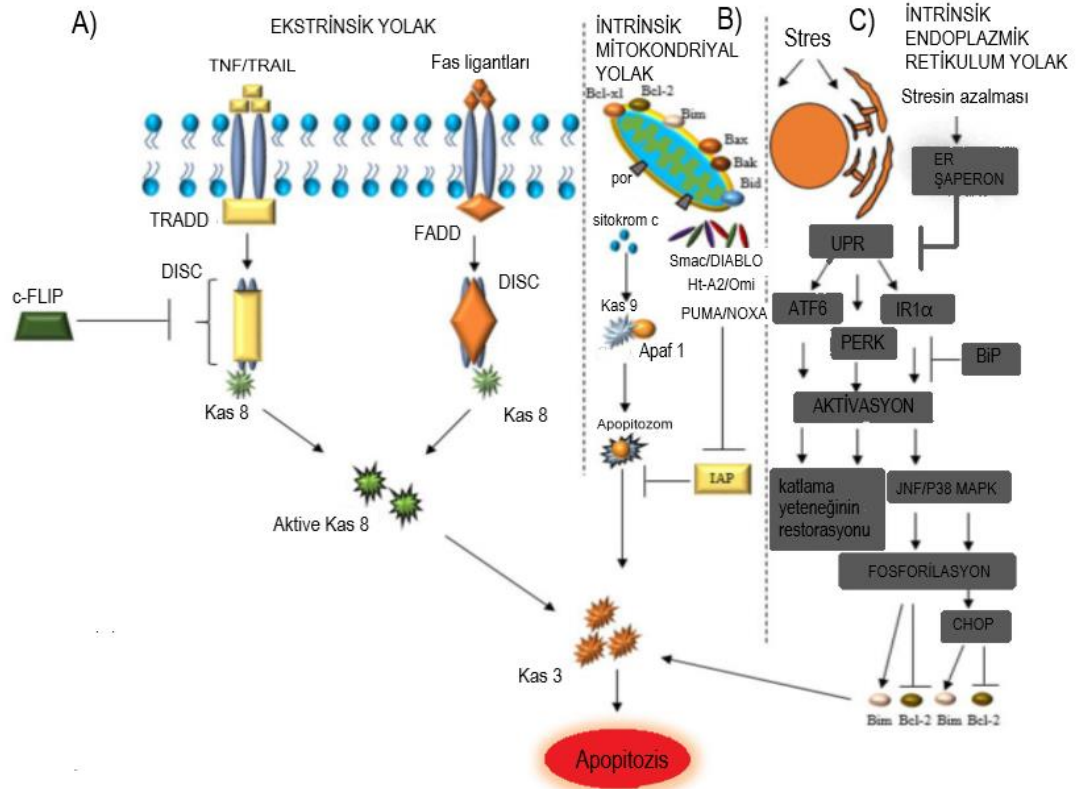
apoptotik hücreleri daha küçük apoptotik cisimlere ayıran plazma zarının parçalar halinde kopması eşlik eder. Apoptotik hücrelerin kalıntıları (sitoplazma, organeller, çekirdek), apoptotik cisimlere dağılmış durumdadır. Farklı hücre tipleri, mikrotübül uç, apoptopodia ve boncuklu apoptopodia olmak üzere membran çıkıntıları gibi farklı membran deformasyon biçimleri sergileyerek apoptotik cisimlere dönüşür (Xu vd 2019). (**Şekil 2.6.1.1**) Bu apoptotik cisimler daha sonra fagositler, nötrofiller, makrofajlar ve dentritik hücreler tarafından tamamen ortadan kaldırılır.



Şekil 2.6.1.1 Apoptotik cisimlerin oluşumunda apoptotik hücrenin uğradığı farklı deformasyon biçimleri şematik olarak gösterilmiştir. Apoptozun indüklenmesi ya direkt membran büzülerek membran bleb, mikrotübül uç, boncuklu apoptopodia ve apoptopodia ya da membran bleb oluşumundan sonra mikrotübül uç, boncuklu apoptopodia ve apoptopodia şeklini alır. Membran yapısına bağlı tüm bu değişimler 5µm boyutlarında apoptotik hücre gövdesini ve nihayetinde 1-5µm boyutlarında apoptotik cisimleri oluşturur. (Xu vd 2019'dan uyarlanmıştır.)

2.6.2. Apoptozisin biyokimyasal süreçleri

Apoptozisin biyokimyasal mekanizması son derece karmaşıktır. Apoptozis sinyal yollarının kaskadı kadar, sinyal dönüştürücülerin ve çeşitli proteinlerin etkileşimini içerir. Ekstrinsik ve intrinsik olmak üzere iki önemli apoptotik yolak vardır (**Şekil 2.6.2.1**). Ekstrinsik yolak reseptör aracılı apoptozisi başlatır (Igney vd 2002).



Şekil 2.6.2.1 Apoptoziste çeşitli yollar. A) Ekstrinsik yolak; Hücre membranına lokalize olan ölüm reseptörleri (Fas, TNF) ekstraselüler alanda ligantları (FasL, TNF- α , TRAIL) bağlandığı zaman intrasellüler alanda adaptör proteinler (FADD ve TRADD) bağlanır. Oluşan DISC kompleksine pro-kaspaz 8 bağlanır. Bu basamak c-FLIP ile inhibe edilmektedir. Aktif olan kaspaz 8 kaspaz 3 yolunu uyararak apoptozisi indükler. B) İntrinsik mitokondriyal yolak; mitokondriyal porların açılmasıyla birlikte apoptotik faktörler sitozole salınır. Sitokrom-c Apaf-1 ve kaspaz-9 ile apoptozom kompleksini oluştururlar. Apoptozom oluşması ile birlikte kaspaz kaskadı başlatılmış olur. DIABLO Ht-A2/Omi IAP aktivasyonunu baskılayarak kaspaz 3 salınımını artırır. C) İntrinsik endoplazmik retikulum yolak; Strese bağlı olarak ER' den salınan UPR artar. Stresin artmasını ER şaperonlar baskılar. UPR'nin restorasyonu ATF-6, IR1 α , PERK tarafından düzenlenir. BiP ATF-6 ve PERK'i inaktif hale getirir. IR1 α 'nın aktivasyonu JNK ve P38MAPK'ı aktive ederek CHOP'un fosforile olmasını sağlar. CHOP bim'i aktive ederken, Bcl-2'yi inhibe ederek apoptotik kaskadı başlatır (Obeng 2021'den uyarlanmıştır.).

Ekstrinsik yolağı başlatan tüm ölüm reseptörleri hücrenin membran yüzeyinde bulunur. Ekstraselüler bölgeden reseptöre bağlanan ligantlar, ölüm sinyallerini intrasellüler alana iletirler (Ashkenazi ve Dixit, 1998) .

İntrinsik yolak, reseptör aracılı olmayan ve mitokondriyal regülasyon ile apoptozisi başlatır. İntrinsik yolakda, uyarılar doğrudan hücre içinde sinyal üretmek biyokimyasal değişikliklere yol açar. Mitokondri aracılığı ile salınan pro-apoptotik proteinlerin bir kısmı kaspaz bağımlı bir kısmı da kaspaz bağımsız sinyal oluşturarak apoptozisi başlatır (Galluzzi vd 2011). Bu proteinlerden AIF'leri kaspaz bağımsız sinyal

oluşturur. Kalsiyuma bağımlı bir proteaz olan kalpainin bölünmesi üzerine, nükleer lokalizasyon sinyali ile DNA parçalanmasını ve kromatin yoğunlaşmasını indüklemek için AIF'lar çekirdeğe translokasyon yapar (Cande vd 2004).

ER homeostazının bozulması sonucu oluşan ER stresi apoptozisi tetikleyen biyolojik süreci kaspaz bağımlı yolak üzerinden başlatır (Broker vd 2005).

Hücreler katapsinler ve kalpainler gibi ölüm sinyali oluşturan proteazlara ve sitotoksik ajanlara kaspaz bağımlı yollar ile yanıt oluşturmadağı durumlarda, tehlikeli ve istenmeyen hücreleri organizmadan uzaklaştırmak için kaspaz bağımsız yollar aktive olur. Bu tip hücre ölümü, morfolojik ve biyokimyasal olarak, uyarının şiddetine ve hücre tipine özgü morfolojik ve biyokimyasal olarak farklılıklar gösterir (Lopatniuk ve Witkowski 2011).

2.6.1.1. Ekstrinsik yolak

Ekstrinsik yolda apoptozis ölüm reseptörleri ile ölüm ligantlarının etkileşmesi sonucunda indüklenir. En yaygın olarak bilinen ölüm reseptörleri; tümör nekrozis faktör (TNF) reseptörü ve Fas adı verilen proteindir. TNF reseptörünün ligantları; TNF ligandı TNF-ile ilişkili apoptozis indükleyici ligant (TRAIL), Fas reseptörünün ligandı; Fas ligandı (FasL)'dir (Goldar vd 2015). Ölüm ligantlarının (TNF, TRAIL ve FasL) ölüm reseptörlerine (TNF, FAS) bağlanmasının ardından reseptörlerin sitoplazmik bölgede kalan uç kısmına adaptör proteinler (TNF reseptörü ile ilişkili ölüm alanı (TRADD)) ve Fas ile ilişkili ölüm alanı (FADD)) bağlanır (Shlyakhtina vd 2017). Oluşan ligant, reseptör ve adaptör protein kompleksi (ölüm indükleyici sinyalleşme kompleksi (DISC)) kaspaz 8 ve kaspaz 10'a bağlanır. Bu sürecin sonlandırılması hücreSEL FLICE inhibitör protein (c-FLIP)'in ölüm alanı/adaptör protein kompleksine bağlanması ile kaspaz aktivasyonunu inhibe ederek gerçekleşir. Böylece DISC'in çalışması, FLIP tarafından regüle edilmektedir. İntaselüler alanda aktive olan kaspaz 8 kaspaz 3 yolağı ile apoptotik süreci başlatır (Wajant 2002, Krueger vd 2001) (**Şekil 2.6.2.1 (A)**).

2.6.1.2. İntersik mitokondriyal yolak

İntersik mitokondriyal yolak, hücre yüzeyindeki reseptörlerden bağımsız mitokondri içinde gerçekleşen bir dizi intrasellüler sinyalleri oluşturan uyarıları içermektedir. Hormonlar, büyüme faktörleri, hipoksi, viral enfeksiyonlar, hipertermi, radyasyon, toksinler gibi etkenler mitokondrinin intermembran geçirgenliğini tetikleyebilir. Bu süreç mitokondriyal transmembran potansiyelinin kaybı ve mitokondri

geçirgen porlarının açılması sonucunda intermembran aracılığı ile pro-apoptotik proteinlerin sitozole daha fazla salınmasını sağlar. Mitokondriyal İntermembran boşluktan sitoplazmaya salınan pro-apoptotik proteinler, kaspaz bağımlı ve kaspaz bağımsız yolları uyarır (Saelens vd 2004). Bunlardan sitokrom-c'nin sitoplazmaya salınımı; sitokrom-c, Apaf 1 ve kaspaz 9'dan oluşan ve apoptozom olarak adlandırılan kompleksin kaspaz-3'ü aktive etmesi sonucunda kaspaz bağımlı mitokondriyal yol ile apoptozisi gerçekleştirir (Kroemer vd 2007). Diğer taraftan kaspazın ikincil mitokondri kaynaklı aktivatörü (Smac)/Düşük pl ile doğrudan IAP (Apoptoz Protein İnhibitör) Bağlayıcı protein (DIABLO) veya Omi/ yüksek sıcaklık gereksinimi proteini A (HtrA2) IAP' lere bağlanırlar. Smac/DIABLO veya Omi/HtrA2, IAP aktivasyonunu baskılayarak, kaspaz 3 veya kaspaz 9'un salınımını dolaylı olarak arttırlar. Böylece bir diğer kaspaz bağımlı apoptotik yolak tetiklenmiş olur (Lomonosova ve Chinnadurai 2008, Schuler ve Green 2001). Tüm bu faktörler Bcl-2 ailesine ait proteinler tarafından kontrol edilir ve düzenlenir. (**Şekil 2.6.2.1 (B)**) Bu proteinler pro-apoptotik ve anti apoptotik olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Pro-apoptotik proteinler; Bak, Bcl-10, Bax, Bid, Bim, Bik, Hrk, sitokrom c'nin mitokondriyal membrandan sitozole geçişine katkıda bulunur (Elkholi vd 2011). Anti-apoptotik proteinler; (Bcl-2, Bcl-x, Bcl-w, Bf-1, Bcl-XL, B-XS, Bcl-w, BAG, sitokrom-c'nin salınımını engeller. Her iki durumun dengede olması, hücrelerin büyümesi ve gelişimini sağlar (Kvansakul vd 2008).

2.6.1.3. İntrensik endoplazmik retikulum yolak

Endoplazmik retikulum, protein sentezi, modifikasyonu, katlanması, translokasyonu gibi süreçlerde yer alan hücre içi organellerdir. Protein katlama yeteneğinde yaşanan bir sorun ER'nin işlevini kesintiye uğratabilir. Bu durumda oluşan ER stresi, ER'nin protein katlama kapasitesi ile salgılanan ve işlem gören protein arasındaki homeostazın katlanma hatalı (yanlış katlanmış veya katlanmamış) protein (UPR)' lerin artması ile meydana gelir. UPR artması sonucu hem ekstrinsik hem intrinsik yolak ile apoptozis meydana gelir. Bununla birlikte, UPR'nin kontrolü, inositol gerektiren protein-1 α (IRE1 α), protein kinaz R (PKR)-benzeri endoplazmik retikulum kinaz (PERK) ve aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) olmak üzere üç farklı sinyal proteini tarafından gerçekleştirilir (Ma ve Hendershot 2004). Bağlayıcı immünoglobulin proteini (BiP), ATF6 ve PERK'i inaktif hale getirirken, ER şaperonlar ER stresinden sonra UPR'nin aktivasyonunu inaktif hale getirir (Ron ve Hubbard 2008). IRE1 α 'nın aktivasyonu, c-Jun-N- terminal kinaz (JNK) ve P38 Mitojenle Aktive Protein Kinaz (P38 MAPK)'ı aktive eden apoptoz sinyal düzenleyen kinaz-1 (ASK1)'i aktive eder. Bim ve

Bcl-2'nin JNK tarafından fosforilasyonu, Bim'in aktivasyonu ve Bcl-2'nin inhibisyonu ile apoptotik süreci başlatır. Ayrıca, P38MAPK tarafından fosforile edilen C/EBP homolog protein (CHOP) Bim'i aktive ederken, Bcl-2'yi inhibe ederek apoptotik sürece katılır (Hollien vd 2009, Puthalakath vd 2007). **(Şekil 2.6.2.1 (C))**

2.6.2. AIF-aracılı apoptotik yolak

AIF, kaspazdan bağımsız bir yolla apoptozu indüklemeye yeteneğine sahip filogenetik olarak korunmuş mitokondriyal intermembran flavoproteindir. AIF, nükleer kromatin yoğunlaşmasının yanı sıra büyük ölçekli DNA parçalanmasının (yaklaşık 50 kb) indüklenmesinde önemli bir rol oynar ve embrioid cisimlerin kavıtasyonu sırasında programlanmış hücre ölümü için gereklidir. AIF ayrıca memeli apoptoz süreçleri sırasında sitokrom c ve kaspazlarla etkileşime girerek, apoptotik bir programı aktive etmek için farklı apoptotik yolların karşılıklı olarak çapraz düzenlenebileceğini gösterir (Lü vd 2003).

AIF-aracılı programlı hücre ölümünde en çok çalışılan iki model; intrasellüler kalsiyum miktarının artması (iskemi/reperfüzyon, toksisite gibi durumlar) ve kapsamlı DNA hasarının (örneğin alkili ajanlar ile muamele) olduğu durumlarda mitokondriyal AIF'in salınımı ile ilişkilidir (Boujrad vd 2007). Birinci modelde, artmış intrasellüler kalsiyum miktarı mitokondriyal membran depolarizasyonunu tetikler ve ardından sırasıyla, membran potansiyel kaybı, ROS oluşumu ve mitokondriyal AIF salınımı gerçekleşir (Sjoerd vd 2005). İkinci modelde, alkilleyici ajanların yüksek dozu ile provoke edilen kapsamlı DNA hasarı poli (ADP-riboz) polimeraz-1'i (PARP-1) 'in aşırı aktivasyonunu tetikler ve mitokondriyal AIF salınımı gerçekleşir (Cregan vd 2002, Li vd 2020).

AIF oksidoredüktaz enzimlerin ve DNA'nın bağlandığı iki önemli bağlanma bölgesine sahiptir. Apoptozis indüklendiği zaman, AIF mitokondriden sitozolün yanı sıra nükleusada transloke olur (Susin vd 2000). Nükleusa transloke olan AIF, elektrostatik etkileşimler yolu ile C-terminal bölgesinden DNA'ya bağlanır. AIF'in DNA'ya bağlandığı bölgede, kromatin yoğunlaşması ve büyük ölçekli DNA parçalanması meydana gelir (Arnoult vd 2003). AIF intrinsik endonükleaz özellikler göstermediği için, DNA parçalanmasında belli nükleazlar işlev görür. Bunlardan mitokondriyal kökenli DNA parçalayıcı bir protein olan endonükleaz G (Endo G), kaspaz bağımsız apoptotik yolda mitokondriden AIF ile birlikte sitozole salınır. Endo G'ye alternatif olarak kromatinolizde siklofinin AIF ile etkileşime girdiği gösterilmiştir (Jayakiran 2015).

2.7. Nörodejenerasyonda Selektif Hasarlanma

Nörodejeneratif hastalıklar, heterojen hastalık grubudur. İlgili nöronal sistemlerde, anatomik veya fizyolojik olarak seçici hücre kaybının progresif ilerlemesi ile karakterizedir. Prototip örnekler arasında; Alzheimer Hastalığı (AH), Parkinson, Amyotrofik lateral skleroz (ALS) ve Huntington gibi hastalıklar yer alır (Phan vd 2014). Hastalık sürecinin özgün nöron tiplerine karşı büyük bir hassasiyet içerisinde gelişmesi, nöronal hasar sürecinin genetik ve çevresel faktörler ile etkilenen nöron topluluklarının, eksitotoksik hasara karşı yatkınlık, oksidatif metabolizma kapasitesinin bölgesel farklılıkları ve toksik serbest radikallerin hücresele metabolizma sonucu üretimini kapsamaktadır (Dong vd 2009). Tüm bu heterojeniteye rağmen, bu hastalıkların ortak noktası mitokondriyal tutulumdur (Ariga ve Takahashi-Niki 2013).

Dejenerasyona duyarlı nöronların yapısal ve işlevsel bütünlüklerini korumak için daha yüksek enerjiye ihtiyaçları vardır. Artan ATP üretimi daha yüksek ROS üretimi ile sonuçlanır (Muddapu vd 2020). Bu nedenle, enerji metabolizmasındaki herhangi bir bozulma, metabolik strese ve sonunda hücresele strese neden olur. Mitokondri oksidatif enerji metabolizmasında metabolik stres açısından hayati bir öneme sahiptir (Su vd 2010). Parkinson'da substantia nigra kompakta (SNc) bölgesindeki dopaminerjik nöronlar ventral tegmental alandaki (VTA) nöronlara kıyasla üç kat artmış ATP ve ROS üretimine sahiptir. VTA'ya kıyasla SNc aksonal dallanmada mitokondrinin yüksek yoğunluğu SNc nöronlarının işleyişi için daha yüksek enerji gerektirdiğini göstermektedir (Pacelli vd 2015, Giguère vd 2019). Alzheimer'da yapılan in-vitro çalışmalarda CA3 bölgesine kıyasla CA1 bölgesinde süperoksit ve ROS seviyelerinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Wang vd 2005, Kanak vd 2013). Özetle, karakteristik nörodejeneratif hastalıklarda, hassas nöronal popülasyonlarda artmış mitokondri sayısı, artmış ROS üretimi, anormal solunum zincir enzimleri ve daha yüksek ATP üretimi gerçekleşmektedir (Muddapu vd 2020).

Beynin farklı bölgelerinde spesifik nöronların ve sinapsların kaybını yansıtan çeşitli klinik bulgulara rağmen nörodejeneratif hastalıklar, ortak mekanizmalara sahiptir. Bu ortak mekanizmalardan biri; sitozolik veya nükleer proteinlerin bölgesel agregasyonudur (Gan vd 2018). Bunlar, Alzheimer'da amiloid beta plakları, mikrotübül bağlayıcı tau'nun hiperfosforilasyonunu, Parkinson ve diğer sinükleinopatilerde α -sinüklein agregatları, ALS'de TAR DNA-bağlayıcı protein (TDP)-43'ün inklüzyonu, Huntington'da poliglutamin agregatlarını içerir (Goedert vd 2017).

Sinaptik bozukluk birçok nörodejeneratif hastalıkta önemli bir fonksiyonel sonuçtur. Nitekim, AH'deki bilişsel bozukluklar, AH'deki sinaps kaybıyla yüksek oranda ilişkilidir (Masliah vd 1991). Pozitron emisyon tomografisi (PET) ile yapılan

görüntüleme, sinaptik disfonksiyonda amiloid beta plaklardan ziyade tau agregatlarının AD'nin klinik belirtileri ve nörodejenerasyon patern ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir (Ossenkoppele vd 2016). Tau ilişkili sinaps disfonksiyonu, asetilasyon, fosforilasyon ve proteolitik bölünmeyi içeren anormal post-translasyonel modifikasyonları kapsar (Spires-Jones ve Hyman 2014).

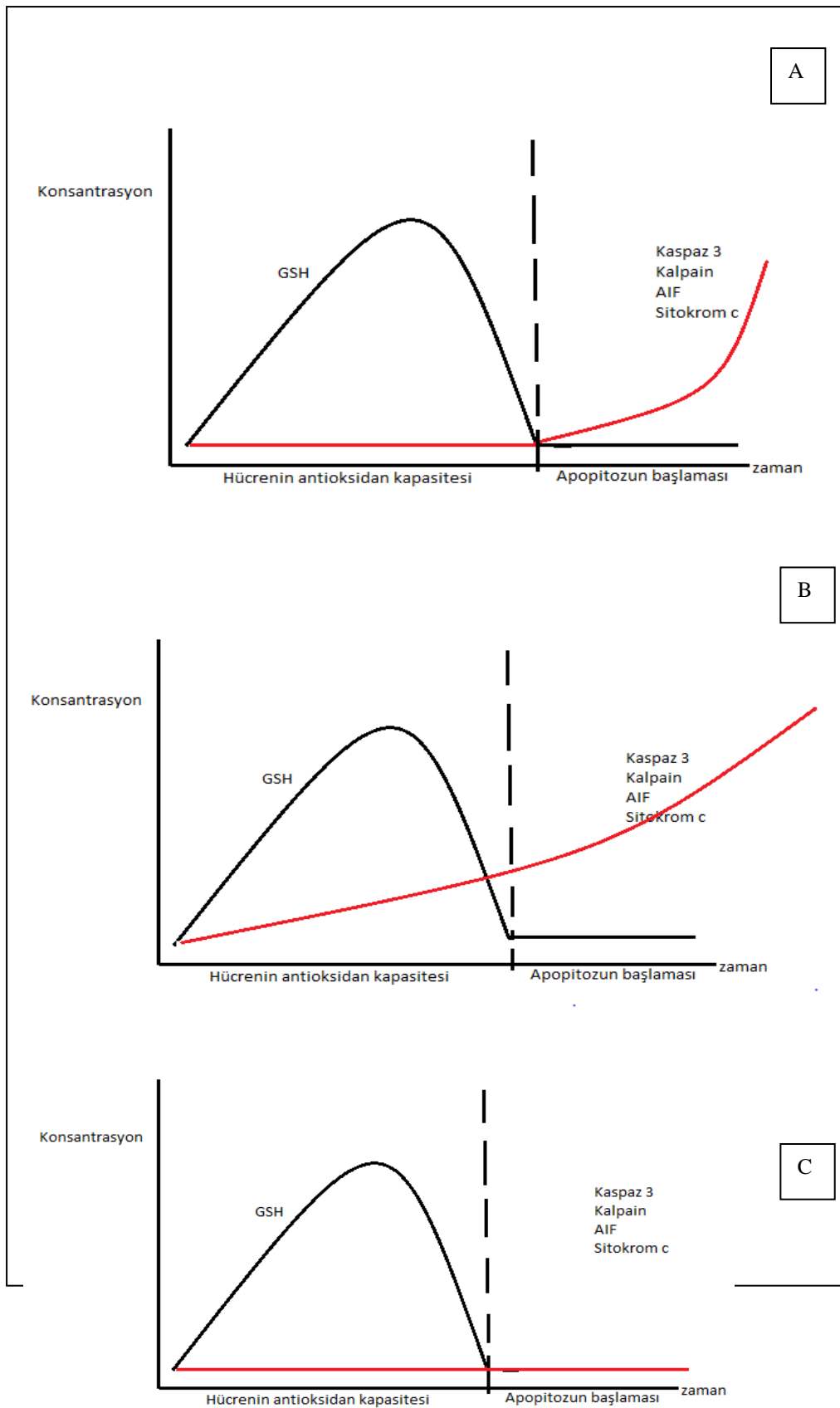
2.8. HT-22 Hipokampal Hücre Hattı ve Primer Kortikal Nöronlar

HT-22, sıcaklık duyarlı small virüs-T antijeni kullanılarak primer fare hipokampal nöron kültüründen orijinal olarak türetilmiş HT-4 hücrelerinin subklonu olarak, nöronal özelliklere sahip, ölümsüzleştirilmiş fare hipokampal hücre hattıdır (Morimoto ve Koshland 1990). Nörobiyolojik çalışmalarda kullanılmak üzere sıçan ve fare dokularında üretilerek ölümsüzleştirilmiş birçok hücre hattından biridir. Glutamata olan aşırı duyarlılığından dolayı HT-22 hücreleri çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda oluşan glutamat sitotoksitesini modellemek için kullanılmaktadır (Davis ve Maher 1994). Hücre kültür ortamına çeşitli supplementler eklenerek HT-22 hücrelerinin diferansiye edilmesi sağlanmaktadır. Ayrıca HT-22 hücreleri fonksiyonel olarak kolinerjik özelliklere sahiptir. Demans ve Alzheimer hastalığının bilişsel dejenerasyondaki mekanizmalarını tanımlamak için in vitro model olarak kullanılmaktadır (Liu vd 2009). Primer kortikal nöronlar 17 günlük C57BL/6 fare embriyolarından izole edilir ve DMSO içeren kültür ortamında, sıvı azot tankında muhafaza edilir (Kumar vd 2017). C57BL/6 farelerin üretilmesi ve bakımı oldukça kolaydır. Bu yüzden C57BL/6 suşu (strain) fare genom sekansının referans suşu olarak immünolojik ve nörolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Ciechanowska vd 2020). Her iki nöron hattı da NMDA reseptör yoğunluğuna sahiptir (Li vd 1998).

2.9. Hipotez

Hipotez 1: SSC HT-22 hipokampal nöronlarda AIF ve kalpain aracılı, primer kortikal nöronlarda ise, kaspaz 3, kalpain ve AIF aracılı hücre ölümünü indükler.

Hipotez 2: SSC'ye maruz bırakılan nöronlarda GSH 'nin zamana bağlı olarak azaldığı konsantrasyonlarda, kalpain, AIF, sitokrom c ve kaspaz 3 gibi proteinler apoptotik süreci zamana bağlı olarak başlatırlar ve zamanla bu proteinlerin konsantrasyonlarında artış görülür. Olası durumlar **Şekil 2.9.1**'de anlatılmıştır.



Şekil 2.9.1 Hücrenin antioksidan kapasitesine bağlı olarak apoptotik sürecin olası başlama anları. Birinci olasılık (şekil 2.9.1 (A)); GSH konsantrasyonunun minimum değerde iken apoptotik belirteçlerin ortaya çıkması, ikinci olasılık (şekil 2.9.1 (B)); GSH konsantrasyonunun azalmaya başladığı bir değerde apoptotik belirteçlerin ortaya çıkması, üçüncü olasılık (Şekil 2.9.1 (C)) GSH konsantrasyonu minimum düzeyde iken, apoptotik belirteçlerin oluşmaması

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Hücre kültürü laboratuvarında gerçekleştirildi. Tüm inkübasyon işlemlerinde CO₂ inkübatörü (nüve, EC 160) %95 nemlendirilmiş hava, %5 CO₂ ve 37°C sıcaklık şartlarında kullanıldı. Hücre kültürü ve doz uygulama çalışmalarının tamamı laminar flow (akış) kabininde (NUAIRE, Biological Safety Cabinets, 440-400E) gerçekleştirildi. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan kimyasallar ve solüsyonlar kullanımdan önce 37°C sıcaklığa sabitlenmiş su banyosunda (nüve, ST 30) ısıtıldı. Hücrelerin görüntülenmesi ve sayılması işlemlerinde mikroskop (Olympus, CKX41) kullanıldı. OD (optik dansite) okumalar mikro plaka okuyucu (Thermo Fisher, 1510) ile yapıldı.

3.1. Nöron Kültürü

Nöron Hatları: Deneyle primer kortikal nöron ve HT-22 hipokampal nöron olmak üzere iki farklı nöron hattında gerçekleştirildi. Primer kortikal nöronlar Thermo'dan (gibco A15585), HT-22 hücre hattı ise Pamukkale üniversitesi Tıp Fizyoloji Anabilim Dalı Hücre kültürü laboratuvarından pasaj sayısı 16 olan hücrelerden temin edildi.

Nöron Kültüründe Kullanılan Solüsyonlar:

Medyumlar: Neurobasal Medium (Thermo, 2110349) ve Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (gibco, 2375262) steril ambalajında kullanıma hazır olarak temin edildi. Kullanım süresince +4 °C'de muhafaza edildiler.

Serum ve Büyüme Faktörleri: Fetal Bovin Serum (FBS) (Hyclone/SV30160.0), N2 supplement (100X) (Capricorn, N/N2-K) ve B27 supplement (Thermo 17504044) steril ambalajında kullanıma hazır olarak temin edildi. Kullanım süresince -20°C'de muhafaza edildiler.

Diğer Solüsyonlar: L-Glutamin (Capricorn, GLN-B), Glutamax (100X) (Gibco, 35050-061) Tripsin-EDTA (%0.25) (Biological Industries 03-052-1B), 1x fosfat tamponlu tuz

(PBS) (Cegrogen, H0500-540) ve penisilin/streptomisin solüsyon (100x) (Diagnovum, D910), Dimetil sülfoksit (DMSO) (Chem Cruz, 67-68-5) ve Tripan blue (Sigma, T6146) steril ambalajında kullanıma hazır olarak temin edildi.

3.1.1. Primer kortikal nöronlar

17 günlük C57BL/6 fare embriyolarından izole edilmiş olan ve DMSO içeren kültür ortamında bulunan primer kortikal nöronlar deney gününe kadar sıvı azot tankında muhafaza edildi.

3.1.1.1. Primer kortikal nöronların çözdürülmesi ve kültüre edilmesi

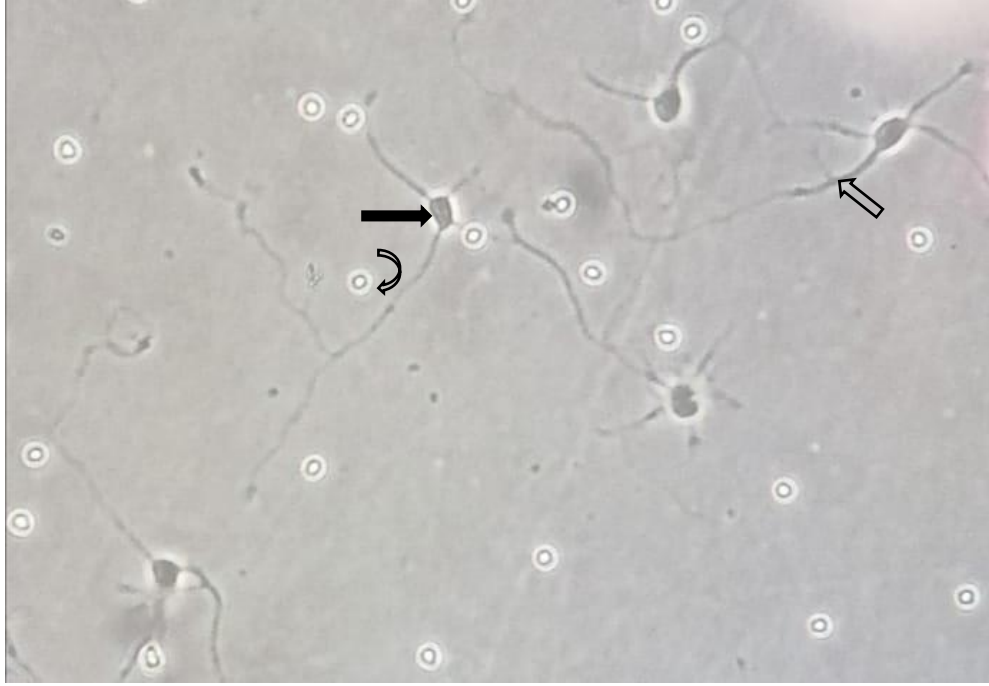
Primer kortikal nöronlar, çözdürülmeye başlamadan önce ekim yapılması planlanan tüm kuyular poli-D-lizin (sigma, P432) ile kaplandı. Kaplama işlemi için 100 mg/mL poli-D-lizin %50 oranında seyreltilerek 50mg/mL derişiminde poli-D-lizin hazırlandı. Hazırlanan stoktan 6'lık well plate için her kuyuya 1.5 mL, 96'lık well plate için her kuyuya 50µL eklendi. 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında poli-D-lizin solüsyonu kuyulardan çekildi. Kuyular otoklavlanmış distile su ile 3 kez yıkandı. 2 saat boyunca kuruma işlemi için bekletildi.

Primer kortikal nöronlar için kültür ortamı taze olarak hazırlandı. Kültür ortamında; 0.5mM Glutamax Supplement (2.5mL/L) %2 B27 Supplement ve Neurobasal Medium kullanıldı.

Kültür ortamında kullanılacak tüm pipet uçları, santrifüj tüpleri vs. neurobasal medium ile bir kez yıkandı.

Sıvı azot içerisinde dondurulmuş primer kortikal nöronlar, 37° C su banyosunda içerisinde küçük bir kristal kalıncaya kadar birkaç dakika bekletildi. Hücreler laminar akış kaputuna alınarak, 50 ml'lik santrifüj tüpüne yavaşça damla damla ilave edildi. 1 ml ortam ile kriyotüpte kalan miktar çekilip yavaşça hücrelere eklendi. Osmatik şok oluşmaması için kalan 2 mL ortam yine yavaşça damla damla hücrelere ilave edildi.

Primer kortikal hücrelerde pasajlama ve çoğalma işlemleri gerçekleşemediği için, hücreler sayılarak, doğrudan deneyler için planlanan miktarda belirlenen kuyulara ekildi. Ekimi tamamlanan hücreler 37° C de %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş inkübatöre alındı. Hergün kültür ortamı %50 uzaklaştırılıp aynı miktarda taze kültür ortamı ilave edildi. **Şekil 3.1.1.1.1**'de primer kortikal nöronların mikroskop görüntüsü yer almaktadır.



Şekil 3.1.1.1.1 Primer kortikal nöronların mikroskop görüntüsü. Kıvrık ok immatür nöronları, açık ok aksonal uzantıları, kapalı ok nöron gövdesini göstermektedir. (büyütme 10X)

3.1.2. HT-22 hipokampal hücre hattı

“Small temperature sensitive virus-T” antijeni kullanılarak primer fare hipokampal nöron kültüründen orijinal olarak türetilmiş HT-4 hücrelerinin subklonu olarak, nöronal özelliklere sahip, ölümsüzleştirilmiş olan fare HT-22 hipokampal nöron hattı deney gününe kadar -80°C 'de muhafaza edildi.

3.1.2.1. HT-22 hipokampal nöronların çözündürülmesi ve kültüre edilmesi

Dondurulmuş hücreler devitrifikasyon ve rekristalizasyon harabiyetlerini minimuma indirmek için hızla çözündürüldü.

HT-22 hücre hattında kültür ortamı taze olarak hazırlandı. Kültür ortamında; %10 FBS %1 penisilin/streptomisin L -glutamin ve glukoz içeren DMEM high kullanıldı. Hücreler ilk açıldıklarında FBS miktarı %20 olarak kullanıldı, pasajlanma sırasında %10 olarak devam edildi.

Öncelikle ekimi planlanan 25'lik flaska 3ml ortam ilave edilerek, inkübatöre alındı. Dondurulmuş HT-22 hücreleri 37°C su banyosunda çözündürüldü. Laminar akış kabininde, 15 ml'lik santrifüj tüpüne yavaşça transfer edildi. Üzerine damla damla 5 ml ortam ilave edildi. 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Pelet

1 ml ortam ile resüspanse edilerek, inkübatörde bekletilen 25'lik flaska ekildi. Nazıkçe homojenize edilmesi sağlandı. Hücreler, %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş inkübatörde 37° C de inkübe edildi. Gün aşırı kültür ortamı uzaklaştırılarak 4 ml taze kültür ortamı eklendi.

3.1.2.2. HT-22 hipokampal nöronların çoğaltılması ve pasajlanması

Hücreler gün aşırı taze kültür ortamı değişimi ile morfolojisini alması ve çoğalması sağlandı.

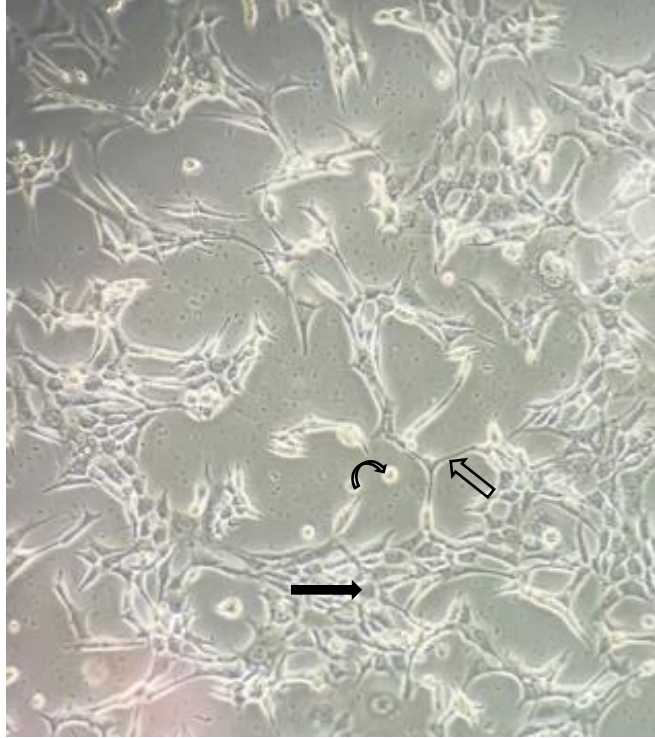
Hücreler %70-80 oranında konfluent hale geldiklerinde pasajlama işlemi gerçekleştirildi.

Hücrelerin pasajlanma işlemi sırasında yapışık halde bulunan hücrelerin kaldırılarak istenilen hücre miktarına göre yeni flasklara homojen olarak ekimi yapıldı. Hücrelerin kaldırılması işleminde %0,25 tripsin/EDTA kullanıldı.

25'lik flask için işlem basamakları:

- %70-80 oranında konfluent haldeki hücrelerin kültür ortamı çekildi. Flask 5 ml PBS ile yıkandı ve PBS ortamdan uzaklaştırıldı.
- 2 ml tripsin eklendi. 2 dk inkübatörde bekletildi.
- Mikroskop altında hücrelerin kalktıklarından emin olduktan sonra, tripsini nötralize etmek için iki katı oranında 4 ml ortam ilave edildi.
- Süspanse halde bulunan hücreler 15ml'lik santrüfuj tüpüne alınarak 1500 rpm de 5 dakika santrüfuj edildi.
- Süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre peleti 2 ml ortam ile resüspanse edildi.
- Önceden kültür ortamı eklenerek inkübatörde bekletilen, ekim planı yapılmış flasklara, homojenize edilen hücreler eşit miktarda dağıtıldı.
- Ekimi tamamlanan flasklar %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş inkübatörde 37° C' de inkübe edildi.

3.1.2.2.1'de HT-22 hipokampal nöronların %70-80 oranında konfluent haldeki mikroskop görüntüsü yer almaktadır.



Şekil 3.1.2.1 HT 22 hipokampal nöronların mikroskop görüntüsü. Kıvrık ok immatür nöronları, açık ok aksonal uzantıları, kapalı ok nöron gövdesini göstermektedir (büyütme 10X)

3.1.2.5. HT-22 hipokampal nöronların dondurulması

%70-80 oranında konfluent hale gelen hücreler, ekim alanından tripsin ile kaldırılıp, pasajlama basamağındaki işlemler yapılarak, süspansiyon haline getirildi. Süspansiyon halindeki hücrelere toplam hacmin %10'u oranında DMSO damla damla eklendi. Eşit miktarda kriyotüplere alındı. Kademeli olarak soğutuldu. Daha sonra -80 °C'ye kaldırıldı.

3.1.3. Primer kortikal ve HT-22 hipokampal nöronların diferansiyasyonu

Her iki nöron hattı için nörobasal medyum içerisine N2 supplement ilavesi ile diferansiyasyonu sağlandı. Nöronlarda, olgunlaşma ve farklılaşma gibi hücresel basamaklar nörogenez basamağında gerçekleşir. Bu basamakta, hormon, büyüme faktörü gibi supplementlerin verilmesi diferansiyasyonuna katkıda bulunur. Bu çalışmada, NMDA reseptör sayısını arttırmak amacıyla nöron hatları diferansiyasyonu edildi. Diferansiyasyonu edici kültür ortamı için; %1 N2 supplement (100x) %1 L-Glutamin %1 penisilin/streptomisin ve nörobasal medyum kullanıldı.

Deneylere başlamadan önce nöron hatları diferansiyasyonu edici kültür ortamı içerisinde 24 saat inkübe edildi.

3.1.4. Primer kortikal ve HT-22 hipokampal nöronların sayılması

Tripan mavisi canlı hücrelerin sayımında kullanıldı. Tripan mavisi canlı hücrelerin çeperinden geçemez, ancak ölü hücrelerin hücre bütünlüğü bozulduğu için çeperden geçerek hücreyi boyar. Boyama işleminin gerçekleşmesi için hücreler süspansiyonuna edildi. Tripan mavisi 1:1 oranında hücre süspansiyonu ile karıştırıldı. Hazırlanan karışım uygun miktarda hemositometreye alınarak mikroskop yardımı ile sayım yapıldı. Boyayı içine alan hücreler ölü, boyanmayan hücreler canlı kabul edildi. 1 ml hücre süspansiyonu için hücre sayısı aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$\text{Toplam Canlı Hücre Sayısı} = N \cdot 10^4 \cdot DF$$

N: Ortalama Hücre Sayısı

10^4 : Sabit katsayı

DF: Dilüsyon Faktörü

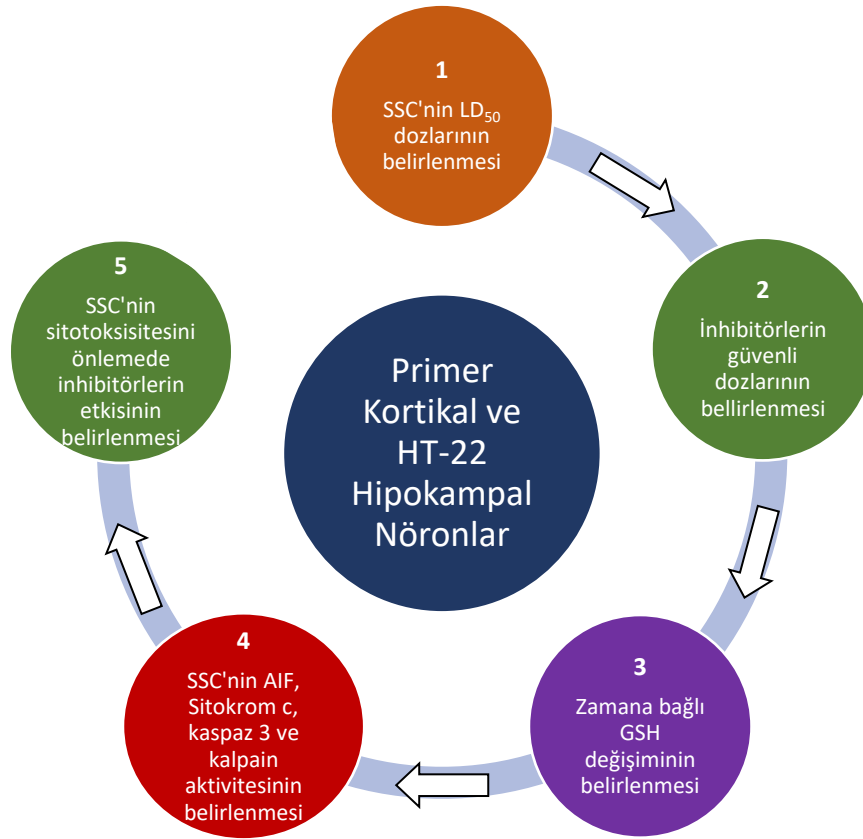
Dilüsyon faktörü, hücre süspansiyonu tripan mavisi ile 1:1 oranında seyreltildiği için çalışma kapsamında 2 olarak işleme alındı.

HT-22 hipokampal nöronlar ve primer kortikal nöronların sayımı için; hücre süspansiyonunda 10 μ L alınarak, 10 μ L tripan mavisi ile karıştırıldı. Pipetaj sonrası 10 μ L hücre süspansiyonu hemositometrenin thoma lamı üzeri lamel ile kapatılarak ara bölgeye verildi. Sayım işlemi yukarıda anlatılan protokole uygun olarak yapıldı.

3.2. Deneyler

Primer kortikal ve HT-22 hipokampal nöronlar için öncelikle SSC'nin LD₅₀ değerlerini belirlemek, inhibitörlerin güvenli dozlarının tespiti, inhibitörlerin SSC toksisitesini önlemedeki etkisini belirlemek amacıyla deney grupları oluşturuldu. Deney grupları her bir deney başlığı altında verilmiştir. Zamana bağlı GSH ölçümleri yapıldı. Hem SSC'nin hem de SSC ile birlikte inhibitörlerin eklenmesi ile AIF, kalpain, sitokrom c ve kaspaz3 aktivasyonlarının değişimine bakıldı.

Deney basamakları; deney gruplarının oluşturulması, hücrelerin hazırlanması, yapılacak deney protokolüne uygun inkübasyon şartlarının ve süresinin belirlenmesi, analizlerin yapılması şeklinde tamamlandı. Çalışmada yapılacak deneylerin taslağı **Şekil 3.2.1'** de şematize edildi. Her grupta üç kez olacak şekilde analizler iki kez tekrarlandı.



Şekil 3.2.1 Deneylerin iş akış planı şematik olarak gösterilmiştir. 1) Her iki nöron hattında da SSC'nin LD₅₀ dozlarının belirlenmesi 2) inhibitörlerin güvenli dozlarının belirlenmesi (sitotoksitesite ölçümü), 3) Zamana bağlı GSH değişiminin belirlenmesi, 4) SSC'nin AIF, sitokrom c, kalpain ve kaspaz 3 aktivitesinin belirlenmesi 5) SSC'nin sitotoksik etkisini önlemede inhibitörlerin etkisinin belirlenmesi.

3.2.1. Sitotoksitesite ölçümleri

Primer kortikal ve HT-22 hipokampal nöronlar için öncelikle SSC'nin LD₅₀ değerleri, inhibitörlerin güvenli dozlarının tespiti, inhibitörlerin SSC toksisitesini önlemedeki etkisi WST-8 [2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-monosodyum tuzu)] testi ile belirlendi. Ölçüm tetrazolyum tuzunun mitokondriyal dehidrogenazlarca parçalanmasına ve oluşan suda çözülebilir formazanın yoğunluğuna dayanmaktadır. Ölçülen absorbans değerleri doğrudan canlı hücrelerin sayısı ile ilişkili olduğuna dayanılarak, canlı hücre sayısı hesaplandı.

Nöron kültürlerinin hazırlanması: Primer kortikal nöronlar polilizin kaplı 96'lık well'de, her kuyucuğa 100µL'de 5000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Hücreler morfolojisini alıncaya kadar %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren inkübatörde 37 °C'de inkübe edildi. %80-90 oranında konfluent hale gelen HT-22 hipokampal nöronlar kaldırılıp hücre yoğunluğuna göre 2-10 ml kendi kültür ortamında süspansiyon edildiikten sonra 96'lık well'de, her kuyucuğa 100µL'de 5000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Hücreler

morfolojisini alıncaya kadar %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren inkübatörde 37 °C'de inkübe edildi. Ardından 90µL N2 Supplement içeren medyumda 24 saat boyunca hücrelerin diferansiye edilmesi için inkübasyona devam edildi.

Deney Protokolü: Belirlenen gruplardaki doz uygulamalarından sonra 24 saat boyunca %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren inkübatörde 37 °C'de inkübe edildi. 96'lık kuyulara ekilen hücreler doz uygulama süresinin bitiminden sonra tüm kuyular 10µL WST-8 reaktifi ile 3 saat inkübe edildi. Sonrasında bu inkübasyon periyodunda canlı hücrelerde oluşan formazanın absorbans değerleri, microplate okuyuculu kolorimetrede 450 nm'de hücrelerin spesifik medyumları olarak kullanılan köre karşı nicelendirildi. Kontrol grubunun absorbans değerlerinin uygulanan dozlarla inkübe edilen hücrelerin absorbans değerleri ile oranlanıp yaşayan hücre yüzdesi hesaplanarak sonuçlar % canlılık olarak verildi.

3.2.1.1. Primer kortikal nöronlarda SSC LD₅₀ değerinin belirlenmesi

Deney Grupları:

Grup1: Kontrol Grubu, sadece primer kortikal nöron kültürü

Grup2: 50µM SSC ile inkübe edilmiş nöron kültürü

Grup3: 75µM SSC ile inkübe edilmiş nöron kültürü

Grup4: 100µM SSC ile inkübe edilmiş nöron kültürü

Grup5: 150µM SSC ile inkübe edilmiş nöron kültürü

SSC uygulanacak kuyular için 50µM, 75µM, 100µM ve 150µM olmak üzere dört doz seçildi. Kültür ortamının hacmi 90µM olacak şekilde; 500µM, 750µM, 1000µM ve 1500µM SSC çözeltileri ilgili kuyulara 10µM eklendi. 24 saat inkübasyondan sonra yukarıda anlatılan protokole uygun olarak test tamamlandı.

3.2.1.2. HT-22 hipokampal nöronlarda SSC LD₅₀ değerinin belirlenmesi

Deney Grupları:

Grup1: Kontrol Grubu, sadece HT-22 hipokampal nöron kültürü

Grup2: 20µM SSC ile inkübe edilmiş nöron kültürü

Grup3: 50µM SSC ile inkübe edilmiş nöron kültürü

Grup4: 100µM SSC ile inkübe edilmiş nöron kültürü

Grup5: 150µM SSC ile inkübe edilmiş nöron kültürü

Grup6: 200µM SSC ile inkübe edilmiş nöron kültürü

Grup7: 250µM SSC ile inkübe edilmiş nöron kültürü

Grup8: 300µM SSC ile inkübe edilmiş nöron kültürü

SSC uygulanacak kuyular için 25µM, 50µM, 100µM, 150µM, 200µM, 250µM ve 300µM olmak üzere yedi doz seçildi. Kültür ortamının hacmi 90µM olacak şekilde; 250µM, 500µM, 1000µM, 1500µM, 2000µM, 2500µM ve 300µM SSC çözeltileri ilgili kuyucuklara 10µM eklendi. 24 saat inkübasyondan sonra yukarıda anlatılan protokole uygun olarak test tamamlandı.

3.2.1.3. Kalpain, Sitokrom c ve AIF inhibitörlerinin primer kortikal ve HT-22 hipokampal nöronlarda güvenli dozlarının araştırılması

Deney Grupları: HT-22 hipokampal ve primer kortikal nöronlar için oluşturulan deney grupları Tablo 3.2.1.3.1'de görülmektedir.

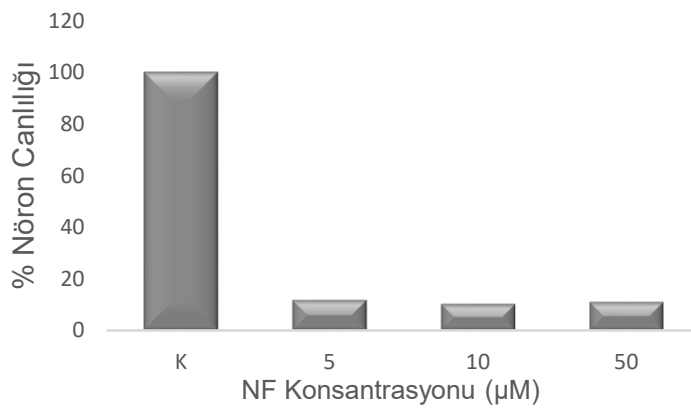
Tablo 3.2.1.3.1 Tabloda inhibitörlerin güvenli dozlarının belirlenmesi için oluşturulan deney grupları görülmektedir.

HT-22 hipokampal nöronlar	Primer kortikal nöronlar	
Grup1	Grup14	Kontrol Grubu
Grup2	Grup15	0,1µM Kalpain 1 inhibitörü ile inkübe edilmiş nöron kültürü
Grup3	Grup16	5µM Kalpain 1 inhibitörü ile inkübe edilmiş nöron kültürü
Grup4	Grup17	10µM Kalpain 1 inhibitörü ile inkübe edilmiş nöron kültürü
Grup5	Grup18	20µM Kalpain 1 inhibitörü ile inkübe edilmiş nöron kültürü
Grup6	Grup19	0,1µM Sitokrom c inhibitörü ile inkübe edilmiş nöron kültürü
Grup7	Grup20	5µM Sitokrom c inhibitörü ile inkübe edilmiş nöron kültürü
Grup8	Grup21	10µM Sitokrom c inhibitörü ile inkübe edilmiş nöron kültürü
Grup9	Grup22	20µM Sitokrom c inhibitörü ile inkübe edilmiş nöron kültürü
Grup10	Grup23	1nM AIF inhibitörü ile inkübe edilmiş nöron kültürü
Grup11	Grup24	5nM AIF inhibitörü ile inkübe edilmiş nöron kültürü
Grup12	Grup25	10nM AIF inhibitörü ile inkübe edilmiş nöron kültürü
Grup13	Grup26	50nM AIF inhibitörü ile inkübe edilmiş nöron kültürü

Kontrol gruplarında HT-22 hipokampal ve primer kortikal nöronlara müdahale edilmemiştir.

Kullanılan inhibitörler: Kalpain 1 inhibitörü (Cayman, 14921), AIF inhibitörü; N-fenilmaleimid (NF) (Santacruz, sc-250486), Stoktom c inhibitörü; Methazolamid (MZ) (Sigma, SML0720),

Kalpain ve Sitokrom c inhibitörü için 0,1 μ M, 5 μ M, 10 μ M ve 20 μ M, AIF inhibitörü için 1nM, 5nM, 10nM ve 50nM olmak üzere dört doz seçildi. Kültür ortamının hacmi 90 μ M olacak şekilde; tüm dozların 10 katı derişik ara stok çözeltileri ilgili kuyulara 10 μ L eklendi. 24 saat inkübasyondan sonra yukarıda anlatılan protokole uygun olarak test tamamlandı. Not: HT-22 hipokampal nöronlarda literatürde belirlenen 5, 10 ve 50 μ M'lık NF dozları hücre canlılığını yaklaşık %90 oranında azalttı (**Şekil 3.2.1.3.1**). Bu yüzden 1, 5, 10 ve 50nM'lık yeni dozlar seçilerek deneylere devam edildi.



3.2.1.3.1 AIF inhibitörünün farklı dozlarının HT-22 hipokampal nöronlarda nöron canlılığına olan etkileri. K; kontrol, NF (N-fenilmaleimid); AIF inhibitörü NF'nin 5, 10 ve 50 μ M'lık dozlarının nöron canlılığını yaklaşık %90 oranında azalttığı görüldü.

3.2.2. Hücre içi glutatyon ve türevlerinin ölçümü

Bu deney nöron hatlarına LD50 dozunda SSC eklenmesi ile zamana bağlı olarak GSH miktarındaki değişimin izlenmesi amacıyla yapıldı. Primer kortikal nöron kültürüne 155 μ M SSC eklenerek 2, 8 ve 16. saat, HT-22 hipokampal nöron kültürüne ise 150 μ M SSC eklenerek 2, 8, 16 ve 24 saatlik sürelerde inkübe edildi. HT-22 hipokampal nöron kültüründe tüm zaman dilimleri için SSC eklenmeyen birer grup kontrol olarak kullanıldı. Primer kortikal nöron kültüründe yeterli hücre bulunmadığı için kontrol grupları oluşturulamadı. Sonuçlar HT-22 hipokampal nöron kültürü için aynı zaman diliminde kontrol grupları ile SSC eklenen gruplar, farklı zaman diliminde ise kontrol grupları ve SSC eklenen gruplar kendi aralarında GSH konsantrasyonundaki değişimler kıyaslanarak değerlendirildi. Primer kortikal nöron kültüründe 2, 8 ve 16 saat süreyle SSC ile inkübe edilen gruplar arasında GSH miktarındaki değişimler kıyaslanarak değerlendirildi.

İşlem basamakları; deney gruplarının oluşturulması, hücrelerin hazırlanması, yapılacak deney protokolüne uygun inkübasyon şartlarının ve süresinin belirlenmesi, test ölçümlerinin yapılması şeklinde ilerletildi. Deney grupları **Tablo 3.2.2.1**'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2.2.1 Tabloda hücre içi glutasyon ve türevlerinin ölçümü için oluşturulan deney grupları görülmektedir.

HT-22 hipokampal nöronlar	Primer kortikal nöronlar	
Grup1		Kontrol grubu1; 2 saat inkübe edilmiş nöron kültürü.
Grup2		Kontrol grubu2; 8 saat inkübe edilmiş nöron kültürü.
Grup3		Kontrol grubu3; 16 saat inkübe edilmiş nöron kültürü.
Grup4		Kontrol grubu4; 24 saat inkübe edilmiş nöron kültürü.
Grup5	Grup9	SSC ile 2 saat inkübe edilmiş nöron kültürü.
Grup6	Grup10	SSC ile 8 saat inkübe edilmiş nöron kültürü.
Grup7	Grup11	SSC ile 16 saat inkübe edilmiş nöron kültürü.
Grup8		SSC ile 24 saat inkübe edilmiş nöron kültürü.

Kontrol gruplarında HT-22 hipokampal nöronlara müdahale edilmemiştir. SSC miktarı primer kortikal nöronlarda 155 μ M ve HT-22 hipokampal nöronlarda 150 μ M'dir.

Kullanılan kit: Total Glutathione (T-GSH)/Oxidized Glutathione (GSSG) kolorimetric assay kit (Elabscience, E-BC-K097-M)

Kullanılan Reaktifler: Tampon solüsyon, standart, protein presipitatör, enzim stok solüsyon, kromojenik ajan, diluent, GSH scavenger auxiliary solution, GSH scavenger, substrat.

GSH ve GSSG ölçümleri için supernatantların hazırlanması: **Tablo 3.2.2.1'**de belirlenen tüm gruplar için petri kaplarına her iki nöron hattı da 3 ml kendi spesifik ortamında olmak üzere 10⁶ hücre ekimi yapıldı. 24 saat sonra ortam uzaklaştırılarak hücreler diferansiye edildi. 24 saat diferansiye işleminden sonra tüm gruplardan 300 μ L ortam çekildi. Kontrol gruplarına yalnızca 300 μ L serumsuz ortam, Primer kortikal nöronlara 1550 μ M ve HT-22 Hipokampal nöronlara 1500 μ M SSC içeren 300 μ L serumsuz ortam verildi. İnkübasyon süreleri tamamlanan grupların ortamları çekilerek 15ml'lik falkona alındı. Kalan hücre peleti hücre kazıyıcı ile kaldırılarak PBS ile yıkandı ve tamamı 15ml'lik falkona alındı. 1000g 'de 10 dk santrüfjü edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Pelet halindeki 10⁶ hücre reaktif 3 çalışma solüsyonu [protein presipitatör (3g): tampon solüsyon (19ml), oranında karıştırılarak testten önce taze olarak hazırlandı.] ile 1:400 oranında resuspansiyon edildi. Hücre süspansiyonu 20 dakika sonike edildi. Ardından 10.000g'de 10 dk santrüfjü edildi. Supernatant test başlayıncaya kadar buzlu ortamda bekletildi.

T-GSH ölçümü için; standart ve supernatant ilgili kuyulara 10 μ l ilave edildi. Ardından her kuyuya reaktif çalışma solüsyonu (R4:R5:R1; 1:1:25 oranında karıştırılarak

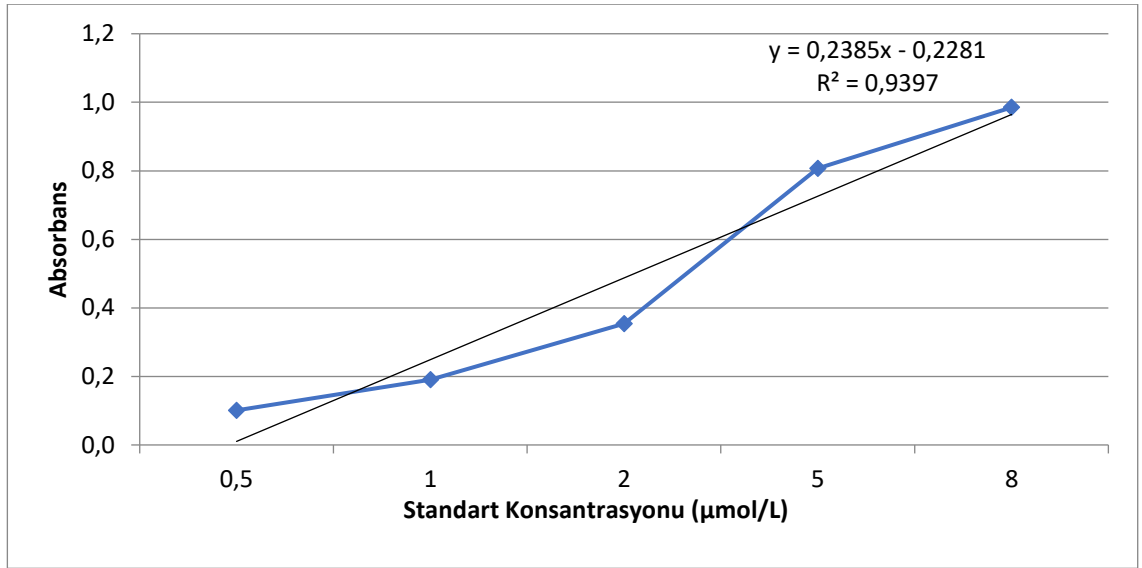
testten önce taze olarak hazırlandı. R4; enzim stok solüsyon:tampon solüsyon; 1:19, R5; kromojenik ajanın tamamı 1.5ml diluent ile çözüldü, R1; tampon solüsyon) 150µl eklenerek 5 dakika 25°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her kuyuya 50µl reaktif 9 çalışma solüsyonu (substratın tamamının 100µL çift distile suda çözünmesi ile testten önce taze olarak hazırlandı) eklenerek 25 dakika 25°C'de inkübe edildi ve 412 nm'de okuma yapıldı.

GSSG ölçümü için; standart ve supernatant planlanan her kuyu için öncelikle bir epondorfa 100' er µl ve 20µl reaktif 7 çalışma solüsyonu (GSH scavenger auxiliary solution çift distile su ile birebir oranında karıştırılarak testten önce taze olarak hazırlandı) eklenerek vorteksledi. Bu karışımın 100 µl'si başka bir epondorfa alınıp 4µl reaktif 7 çalışma solüsyonu (GSH scavenger:etanol; 1:9 oranında karıştırılarak testten önce taze olarak hazırlandı) eklendi hızlıca vortekslenip 25 dakika 25°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her kuyuya 50µl reaktif 9 çalışma solüsyonu eklenerek 25 dakika 25°C'de inkübe edildi ve 412 nm'de okuma yapıldı.

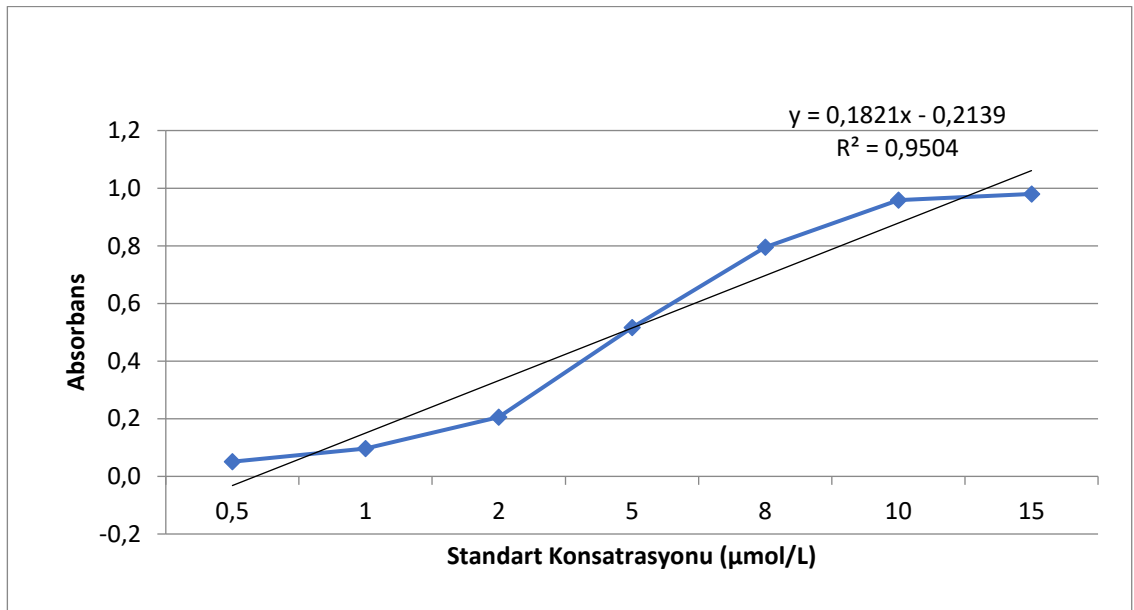
Glutasyon miktarını hesaplamak için total glutasyon (T-GSH) miktarı ve GSSG miktarı ölçüldü. Öncelikle T-GSH ve GSSG için standart eğrileri oluşturuldu.

3.2.2.1. T-GSH ve GSSG standartlarına ait regresyon eğrileri:

20µmol/L standart solüsyonu reaktif çalışma solüsyonu ile dilüe edilerek; 0, 0.5, 1, 2, 5, 8, 10 ve 15µmol/L standart solüsyonları hazırlandı. Ölçüm sonucunda artan standart konsantrasyonuna karşın elde edilen absorbans değerleri T-GSH ve GSSG eğrilerinin oluşturulmasında kullanıldı (**Şekil 3.2.2.1.1-2**).



Şekil 3.2.2.1.1 T-GSH standartlarına ait regresyon eğrisi. Standart konsantrasyonlarına karşı ölçülen absorbans değerleri ile “ $y = 0,2385x - 0,2281$ ” regresyon denklemi elde edilmiştir. Determinasyon katsayısı (R^2), eğrinin 0.9397 oranında güvenilirlik olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.2.2.1.2 GSSG standartlarına ait regresyon eğrisi. Standart konsantrasyonlarına karşı ölçülen absorbans değerleri ile “ $y = 0,1821x - 0,2139$ ” regresyon denklemi elde edilmiştir. Determinasyon katsayısı (R^2), eğrinin 0.9504 oranında güvenilir olduğunu göstermektedir.

Tüm numuneler için ayrı ayrı T-GSH ve GSSG ölçümleri yapıldı. Aşağıdaki hesaplama kullanılarak indirgenmiş GSH konsantrasyonları belirlendi.

Hesaplama:

$$\text{T-GSH miktarı } (\mu\text{mol}/10^6 \text{ hücre}) = (\Delta A_1 - b_1) / a_1 \times 2^* / (1^{***} / V_2) \times f$$

$$\text{GSSG miktarı } (\mu\text{mol}/10^6 \text{ hücre}) = (\Delta A_2 - b_2) / a_2 / (1^{***} / V_2) \times f$$

$$\text{GSH miktarı } (\mu\text{mol}/10^6 \text{ hücre}) = \text{T-GSH miktarı} - 2 \times \text{GSSG miktarı}$$

ΔA_1 : Numune absorbans değeri-blank absorbans değeri (T-GSH için)

b_1 : T-GSH'in standart eğrisinin eğimi

a_1 : T-GSH'in standart eğrisinin kesişimi

ΔA_2 : Numune absorbans değeri-blank absorbans değeri (GSSG için)

b_2 : GSSG'nin standart eğrisinin eğimi

a_2 : GSSG'nin standart eğrisinin kesişimi

2*: Standart olarak GSSG ile GSH dönüşümünün gerekli olduğu durumlarda kullanılır.

f: Testten önce örneğin dilüsyon faktörü

V_2 : Hücre peletinin resüspanse edildiği R3 working solüsyon hacmi

3.2.3. AIF, Kalpain, Sitokrom c ve Kaspaz 3 Aktivite Tayini

Bu deneyde SSC' nin ve SSC ile birlikte ilgili inhibitörün kültür ortamına eklenmesi ile, belirlenen nöron dizilerinde, AIF, kalpain, sitokrom c ve kaspaz 3 değerlerinin nasıl etkilendiği araştırıldı. Mevcut deney şartlarında 16. saatte yalnızca HT-22 nöron hattında SSC eklenmesi ile apoptotik faktörler analiz edilebildi. Yirmidördüncü saatte ise her iki nöron hattında apoptotik faktörlerin analizi gerçekleştirildi. Bunun için, her iki hücre hattında belirlenen SSC' nin LD₅₀ ve inhibitörlerin güvenli dozları kullanılarak Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) yöntemi ile AIF, kalpain, kaspaz 3 ve sitokrom c düzeyleri kolorimetrik olarak ölçüldü.

Deney Grupları 1: İnkübasyon süresi 16 saat süren HT-22 hipokampal nöronlar;

Grup1: Kontrol grubu1; kalpain aktivite ölçümü için sadece nöron kültürü

Grup2: Kalpain aktivite ölçümü için SSC ile inkübe edilmiş nöron kültürü

Grup3: Kontrol grubu2; sitokrom c aktivite ölçümü için sadece nöron kültürü

Grup4: Sitokrom c aktivite ölçümü için SSC ile inkübe edilmiş nöron kültürü

Grup5: Kontrol grubu3; AIF aktivite ölçümü için sadece nöron kültürü

Grup6: AIF aktivite ölçümü için SSC ile inkübe edilmiş nöron kültürü

Grup7: Kontrol grubu4; Kaspaz 3 aktivite ölçümü için sadece nöron kültürü

Grup8: Kaspaz-3 aktivite ölçümü için SSC ile inkübe edilmiş nöron kültürü

Deney Grupları2: İnkübasyon süresi 24 saat süren HT-22 hipokampal ve primer kortikal nöron kültürlerine ait deney grupları **Tablo 3.2.3.1**'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2.3.1 Tabloda inkübasyon süresi 24 saat süren HT-22 hipokampal ve primer kortikal nöron kültürlerine ait deney grupları görülmektedir.

HT-22 hipokampal nöronlar	Primer kortikal nöronlar		
Grup1	Grup12	Kontrol Grubu1	Kalpain aktivite tayini
Grup2	Grup13	SSC ile inkübe edilmiş nöron kültürü	
Grup3	Grup14	SSC+kalp 1 inh. ile inkübe edilmiş nöron kültürü	
Grup4	Grup15	Kontrol Grubu2	Sitokrom c aktivite tayini
Grup5	Grup16	SSC ile inkübe edilmiş nöron kültürü	
Grup6	Grup17	SSC+MA ile inkübe edilmiş nöron kültürü	
Grup7	Grup18	Kontrol Grubu3	AIF aktivite tayini
Grup8	Grup19	SSC ile inkübe edilmiş nöron kültürü	
Grup9	Grup20	SSC+NF ile inkübe edilmiş nöron kültürü	
Grup10	Grup21	Kontrol Grubu4	Kaspaz 3 aktivite tayini
Grup11	Grup22	SSC ile inkübe edilmiş nöron kültürü	

Kontrol gruplarında HT-22 hipokampal nöronlara müdahale edilmemiştir. SSC miktarı primer kortikal nöronlarda 155µM ve HT-22 hipokampal nöronlarda 150µM'dir. primer kortikal nöronlar için, kalpain 1 inhibitörü; 10µM, AIF inhibitörü NF; 10nM, sitokrom c inhibitörü MA; 20µM, HT-22 hipokampal nöronlar için, kalpain 1 inhibitörü; 10µM, AIF inhibitörü; 10nM, sitokrom c inhibitörü; 20µM olarak uygulandı.

Kullanılan Kitler: Mouse calpain 1 ELISA kit (BT LAB, E2668Mo), Mouse Cytochrome-C ELISA Kit (BT LAB, E0499Mo), Mouse apoptosis inducing factor ELISA Kit (BT LAB, E0137Mo), Mouse Caspase 3 ELISA Kit (BT LAB, E1513Mo)

Kullanılan Reaktifler: Standart solüsyon, Pre-coated ELISA plate, standart dilüent, streptavidin-HRP, stop solüsyon, substrat solüsyon A, substrat solüsyon B, yıkama solüsyonu, biotinlenmiş fare kaspaz 3, AIF, sitokrom c ve kalpain antikoru

AIF, Sitokrom c, Kalpain ve Kaspaz 3 Standartları:

AIF standart solüsyonları 2400ng/L olan orijinal standart solüsyonunun standart dilüent ile seyreltilmesi sonucunda sırası ile; 1200, 600, 300, 150 ve 75ng/L olarak standartlar hazırlandı.

Sitokrom c standart solüsyonları 4800ng/L olan orijinal standart solüsyonunun standart dilüent ile seyreltilmesi sonucunda sırası ile; 2400, 1200, 600, 300 ve 150ng/L olarak standartlar hazırlandı.

Kalpain standart solüsyonları 128ng/mL olan orijinal standart solüsyonunun standart dilüent ile seyreltilmesi sonucunda sırası ile; 64, 32, 16, 8 ve 4ng/mL olarak standartlar hazırlandı.

Kaspaz 3 standart solüsyonları 128ng/mL olan orijinal standart solüsyonunun standart dilüent ile seyreltilmesi sonucunda sırası ile; 64, 32, 16, 8 ve 4ng/mL olarak standartlar hazırlandı.

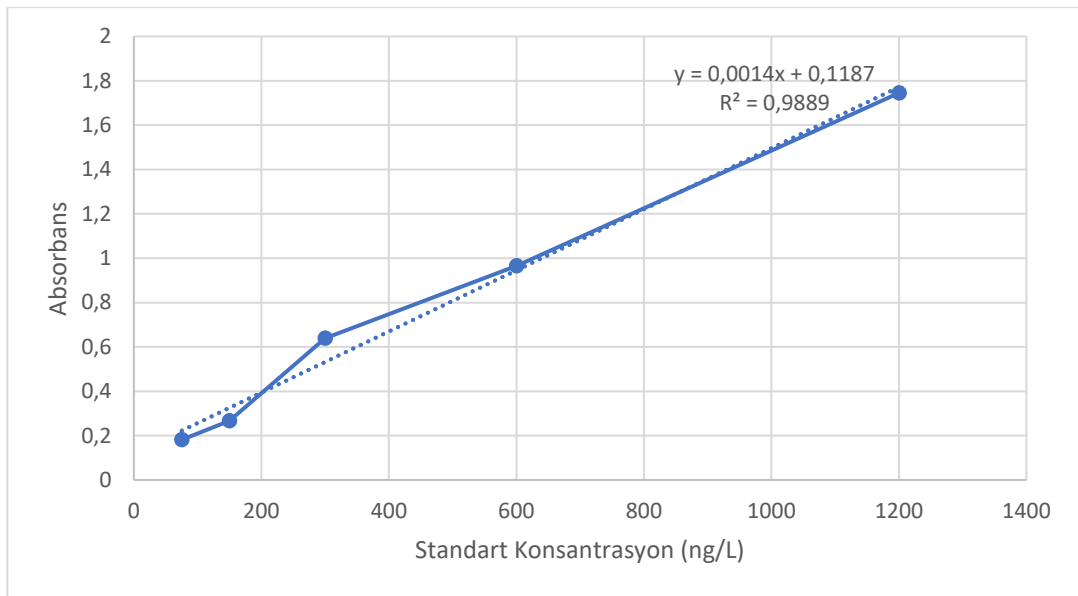
Supernatantların Hazırlanması ve ELISA ile Ölçümlerin Yapılması: Belirlenen tüm gruplar için petri kaplarına her iki nöron hattı da 3 ml kendi spesifik ortamında olmak üzere 10^6 hücre ekimi yapıldı. 24 saat sonra ortam uzaklaştırılarak hücreler diferansiye edildi. 24 saat diferansiye işleminden sonra tüm gruplardan 300 μ L ortam çekildi. Kontrol gruplarına yalnızca 300 μ L serumsuz ortam, Primer kortikal nöronlara 1550 μ M ve HT-22 Hipokampal nöronlara 1500 μ M SSC içeren 300 μ L serumsuz ortam verildi. Her iki nöron hattında; 100nM AIF ve 100 μ M kalpain inhibitörü, primer kotrikal nöronlarda 200 μ M ve HT-22 hipokampal nöronlarda 100 μ M sitokrom c inhibitörü SSC ile birlikte verildi. Tüm dozların 10 kat derişik konsantrasyonları verilerek kuyularda istenilen değerlerine ulaşıldı. İnkübasyon süreleri tamamlanan grupların ortamları çekilerek 15ml'lik falkona alındı. Kalan hücre peleti hücre kazıyıcı ile kaldırılarak PBS ile yıkandı ve tamamı ortamın bulunduğu 15ml'lik falkona alındı. 3000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Süpernetan ortamdan uzaklaştırılıp, hücre peleti 1 ml soğuk PBS ile resüspanse edildi. Solüsyon 20 dakika sonike edildi. Sonikasyon sonunda 3000 rpm'de 20 dk. santrifüj edildi. Süpernetanlar dikkatlice ependorflara alındı. Numuneler test başlayıncaya kadar buzlu ortamda bekletildi.

Teste başlamadan önce tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Test için gerekli ilgili kuyular mikropate yerleştirildi. Standart kuyularına 50 μ L standart eklendi. Numune kuyularına 40 μ L numune ve 10 μ L ölçümü yapılan proteinin antikoru eklendi. Numune ve standart kuyularına 50 μ L streptavidin-HRP eklendi. Kör kuyuya eklenmedi. Kuyuların üzeri kapatılarak 37° C'de 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüm kuyular yıkama tamponu ile 5 kez bir dakika bekleme süresi ile yıkandı. Kuyular aspire edildi ve ters çevrildi. Her kuyuya 50 μ L substrat A solüsyonu ve ardından her kuyuya substrat B

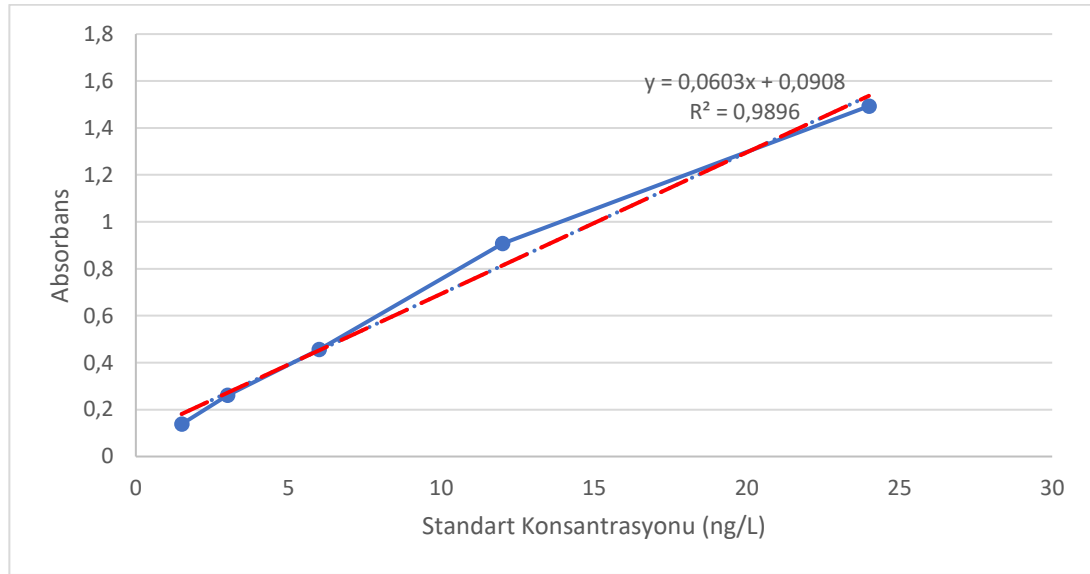
solüsyonu eklendi. Üzeri kapatılarak 37°C'de 10 dakika boyunca inkübe edildi. 50µL stop solüsyon eklendi 10 dakika içerisinde 450 nm'de okuma yapıldı.

3.2.3.1. AIF, Sitokrom c, Kalpain ve Kaspaz 3 standartlarına ait regresyon eğrileri:

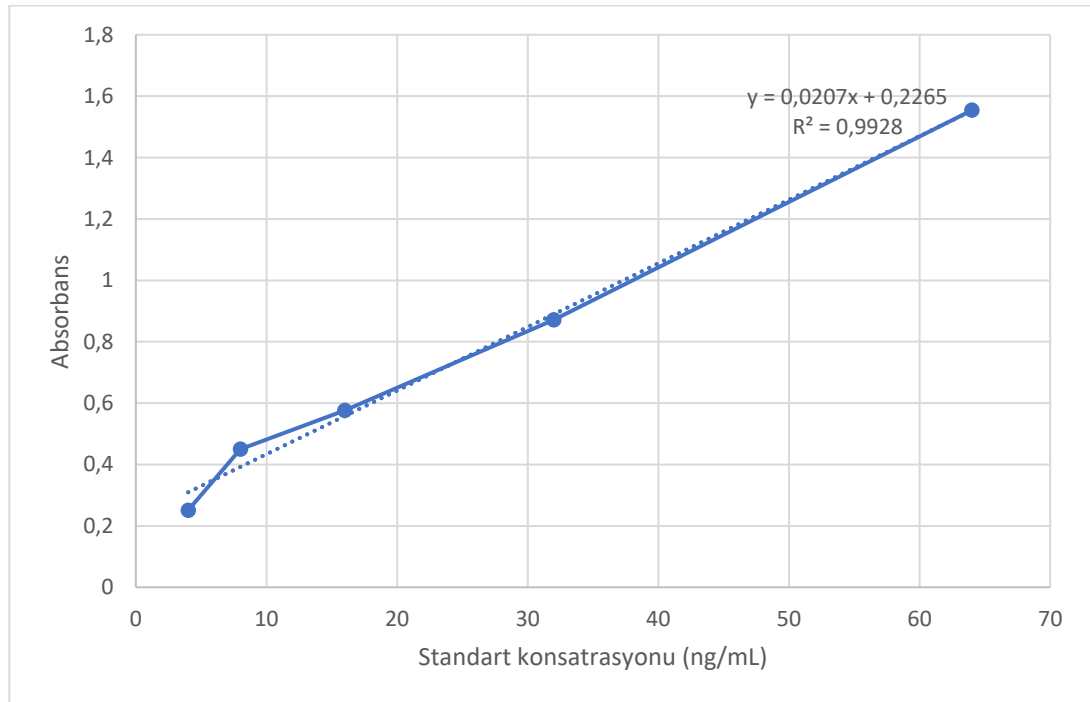
Her kit için ayrı ayrı hazırlanan standart konsantrasyonları yukarıda anlatılan protokole uygun olarak absorbans değerleri 450 nm'de okuma ile belirlendi. Absorbans değerlerinin ortalamasından kör kuyu ortalaması çıkarılarak elde edilen değerler, standart konsantrasyonlarına karşı grafiğe alındı (**Şekil 3.2.3.1.1-4**).



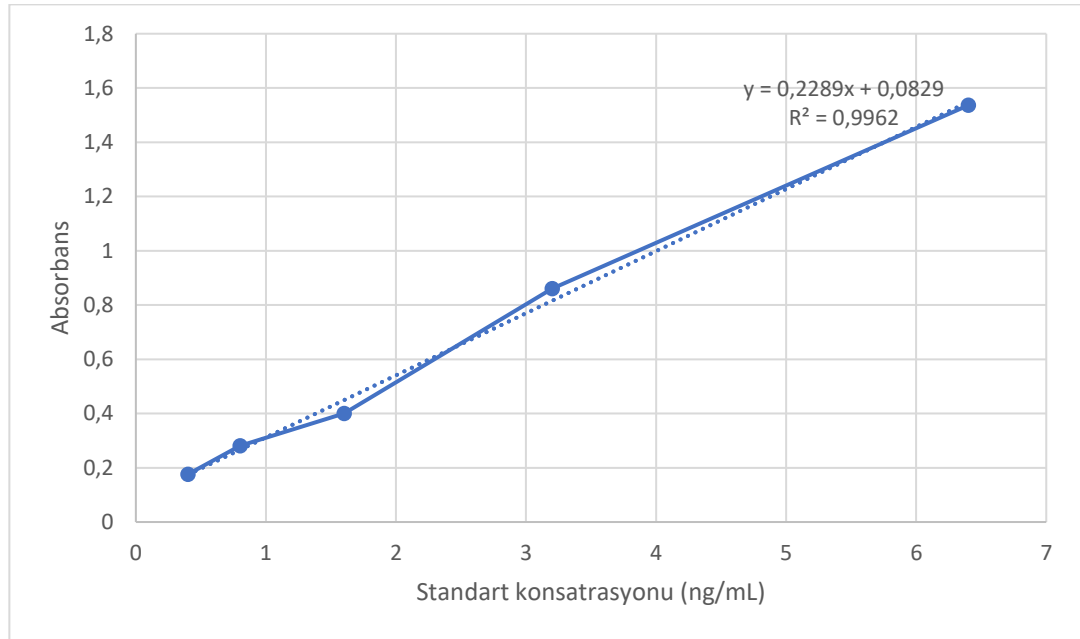
Şekil 3.2.3.1.1 AIF standartlarına ait regresyon eğrisi. Standart konsantrasyonlarına karşı ölçülen absorbans değerleri ile “ $y = 0,0014x + 0,1187$ ” regresyon denklemi elde edilmiştir. Determinasyon katsayısı (R^2), eğrinin 0,9889 oranında güvenilir olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.2.3.1.2 Sitokrom c standartlarına ait regresyon eğrisi. Standart konsantrasyonlarına karşı ölçülen absorbans değerleri ile “ $y = 0,0603x + 0,0908$ ” regresyon denklemi elde edilmiştir. Determinasyon katsayısı (R^2), eğrinin 0,9896 oranında güvenilir olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.2.3.1.3 Kalpain standartlarına ait regresyon eğrisi. Standart konsantrasyonlarına karşı ölçülen absorbans değerleri ile “ $y = 0,0207x + 0,2265$ ” regresyon denklemi elde edilmiştir. Determinasyon katsayısı (R^2), eğrinin 0,9928 oranında güvenilir olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.2.3.1.4 Kaspaz 3 standartlarına ait regresyon eğrisi. Konsantrasyonlarına karşı ölçülen absorbans değerleri ile “ $y = 0,2289x + 0,0829$ ” regresyon denklemi elde edilmiştir. Determinasyon katsayısı (R^2), eğrinin 0,9962 oranında güvenilir olduğunu göstermektedir.

Hesaplama: Her kit için oluşturulan standart eğrilerinden elde edilen doğru denklemine göre numunelerin konsantrasyon değeri belirlendi.

$$y = ax + b,$$

a: standart eğrisinin eğimi

b: standart eğrisinin kesişimi

y: okunan absorbans değerleri

x: numune konsantrasyonu

3.3. İstatistiksel Analiz

Veriler SPSS 25.0 (IBM SPSS Statistics 25 software (Armonk, NY: IBM Corp.)) paket programıyla analiz edilmiştir. Sürekli değişkenler ortalama \pm standart sapma ve kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak ifade edilmiştir. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk testi ile incelenmiştir. Bağımsız grup incelemelerinde; Parametrik test varsayımları sağlandığında Tek Yönlü Varyans Analizi (post hoc: Tukey testi) kullanılmıştır. Parametrik test varsayımları sağlanmadığında ise Kruskal Wallis

Varyans Analizi (post hoc: Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi) kullanılmıştır. Tüm analizlerde $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Öncelikle HT-22 ve primer kortikal nöron dizilerinde SSC'nin LD₅₀ dozu belirlendi. Bu değerler; HT-22 hipokampal nöronlar için 150 µM, primer kortikal nöronlar için 155 µM olarak bulundu. İnhibitörlerin güvenli dozları primer kortikal nöronlar için, kalpain inhibitörü; 10µM, AIF inhibitörü; 10nM, sitokrom c inhibitörü; 20µM, HT-22 hipokampal nöronlar için, kalpain inhibitörü; 10µM, AIF inhibitörü; 10nM, sitokrom c inhibitörü; 10µM olarak saptandı. SSC ile inkübe edilen HT-22 hipokampal ve primer kortikal nöron kültürlerinde GSH'nin zamana bağlı değişimi ölçülerek apoptozun tetiklenme anı saptandı. Primer kortikal nöronlar ve HT-22 Hipokampal nöronlarda GSH miktarının 2. Saatten 8. saate kadar arttığı, 8. saatten 16. saate kadar azaldığı görüldü. Primer kortikal nöronlarda, AIF, sitokrom c ve kaspaz 3 miktarının HT-22 hipokampal nöronlarda ise AIF ve kalpain miktarının kontrol grubuna göre anlamlı arttığı bulundu. SSC ve inhibitörlerin birlikte verilmesi ile yapılan canlılık testinde, kullanılan tüm inhibitörlerin SSC'nin tek başına yapmış olduğu toksik etkisine kıyasla anlamlı düzeyde azaldığı saptandı (p<0,05).

4.1. Primer Kortikal ve HT-22 Hipokampal Nöronlarda SSC'nin LD₅₀ Değerleri

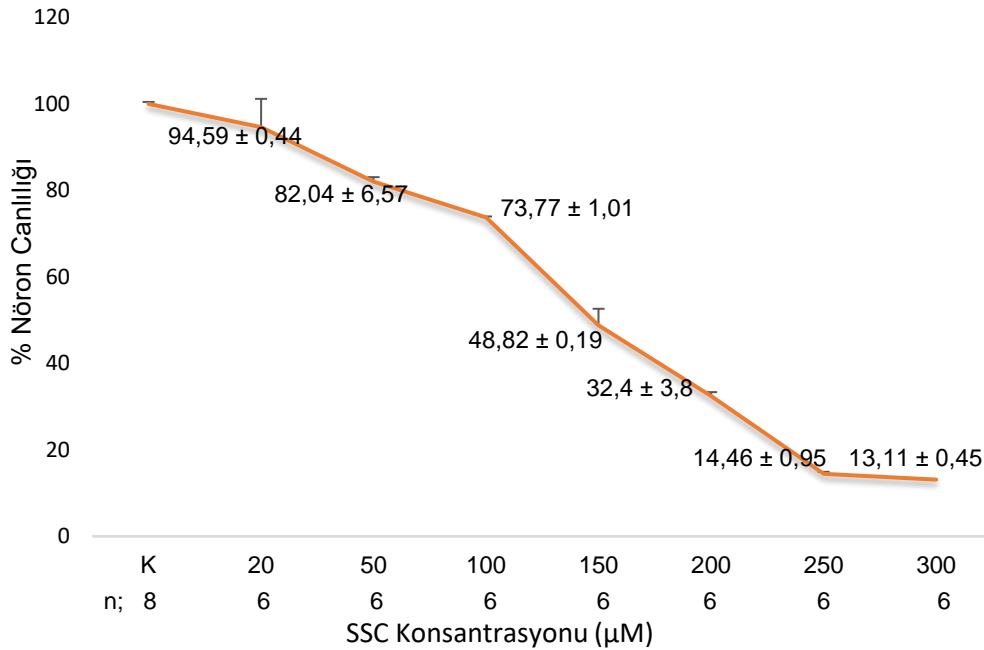
Primer kortikal ve HT-22 hipokampal nöronlarda SSC'nin LD₅₀ dozunun belirlenmesinde sonuçlar, kontrol grubundan elde edilen verilere oranlanarak % nöron canlılığı olarak hesaplandı (**Şekil 4.1.1-2**). Buna göre Probit analizi (<https://www.aatbio.com/tools/ld50-calculator>) yapılarak primer kortikal nöronlar için SSC'nin LD₅₀ değeri 155µM ve HT-22 hipokampal nöronlar için SSC'nin LD₅₀ değeri 150µM olarak bulundu.

HT-22 hipokampal ve primer kortikal nöron kültüründe SSC'nin LD₅₀ değerinin belirlenmesine ait tanımlayıcı veriler sırası ile **Tablo 4.1.1** ve **Tablo 4.1.2**'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1.1 Tabloda HT-22 hipokampal nöron kültüründe SSC'nin LD₅₀ değerinin belirlenmesine ait tanımlayıcı veriler görülmektedir.

Gruplar	A.O. ±S.S.	Med (min-maks)
Kontrol	100	100
SSC (20 µM)	94,59 ± 0,44	94,59 (94,1 - 95,08)
SSC (50 µM)	82,04 ± 6,57	82,05 (74,69 - 89,38)
SSC (100 µM)	73,77 ± 1,01	73,97 (72,12 - 74,59)
SSC (150 µM)	48,82 ± 0,19	48,83 (48,6 - 49,02)
SSC (200 µM)	32,4 ± 3,8	32,41 (28,14 - 36,64)
SSC (250 µM)	14,46 ± 0,95	14,07 (13,65 - 15,67)
SSC (300 µM)	13,11 ± 0,45	13,29 (12,54 - 13,49)

Tabloda, A.O.: aritmetik ortalama, S.S.:standart sapma, Med.: medyan değerlerini göstermektedir. Aritmetik ortalama ve medyan değerleri %nöron canlılığına ait verileri belirtmektedir. Kontrol grubu için n=8 (4 kuyu*2 bağımsız deney), diğer gruplar için n=6 (Üç kuyu*2 bağımsız deney).

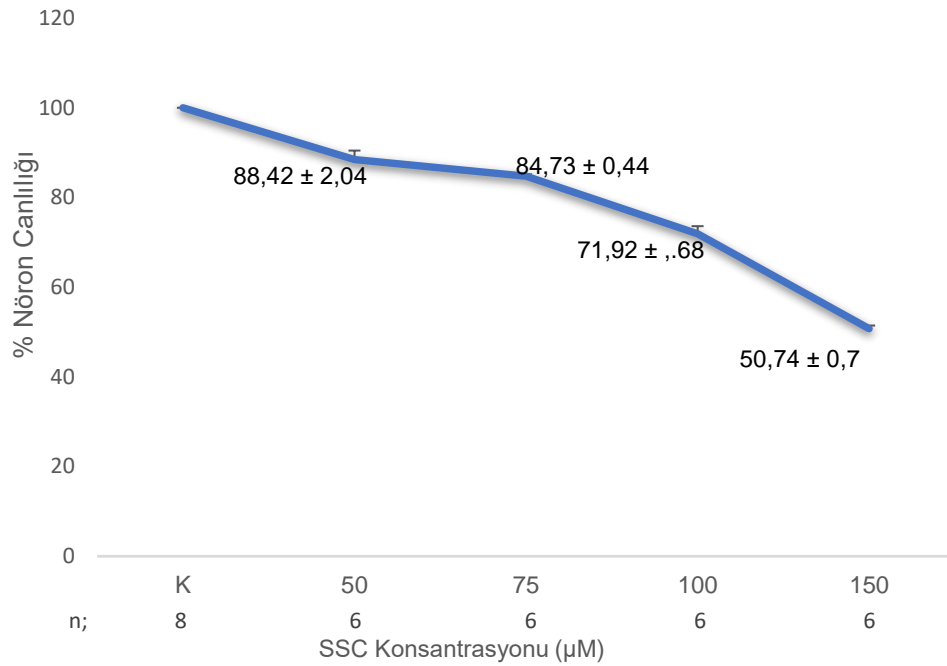


Şekil 4.1.1 HT-22 hipokampal nöronlarda SSC'nin LD₅₀ değerinin belirlenmesine dair veriler gösterilmiştir. % nöron canlılığı olarak verilen sonuçlar ortalama ± standart sapma değerine karşılık gelmektedir. Probit analizi (<https://www.aatbio.com/tools/ld50-calculator>) yapılarak LD₅₀ değeri 150µM olarak belirlenmiştir. K; Kontrol (SSC içermeyen grup). n; kuyu sayısı*2 bağımsız deney

Tablo 4.1.2 Tabloda Primer kortikal nöron kültüründe SSC'nin LD₅₀ değerinin belirlenmesine ait tanımlayıcı veriler görülmektedir.

Gruplar	A.O ±S.S	Med (min-maks)
Kontrol	100	100
SSC (50 µM)	88,42 ± 2,04	88,42 (85,71 - 91,13)
SSC (75 µM)	84,73 ± 0,44	84,73 (84,24 - 85,22)
SSC (100 µM)	71,92 ± 1,68	71,92 (69,95 - 73,89)
SSC (150 µM)	50,74 ± 0,7	50,74 (49,75 - 51,72)

Tabloda, A.O.: aritmetik ortalama, S.S.:standart sapma, Med.: medyan değerlerini göstermektedir. Aritmetik ortalama ve medyan değerleri %nöron canlılığına ait verileri belirtmektedir. Kontrol grubu için n=8 (4 kuyu*2 bağımsız deney), diğer gruplar için n=6 (Üç kuyu*2 bağımsız deney).



Şekil 4.1.2 Primer kortikal nöronlarda SSC'nin LD₅₀ değerinin belirlenmesine dair veriler gösterilmiştir. % nöron canlılığı olarak verilen sonuçlar ortalama ± standart sapma değerine karşılık gelmektedir. Probit analizi (<https://www.aatbio.com/tools/ld50-calculator>) yapılarak LD₅₀ değeri 155µM olarak belirlenmiştir. n; kuyu sayısı*2 bağımsız deney

4.2. Primer kortikal ve HT-22 Hipokampal Nöronlarda İnhibitörlerin Güvenli Dozlarının Değerleri

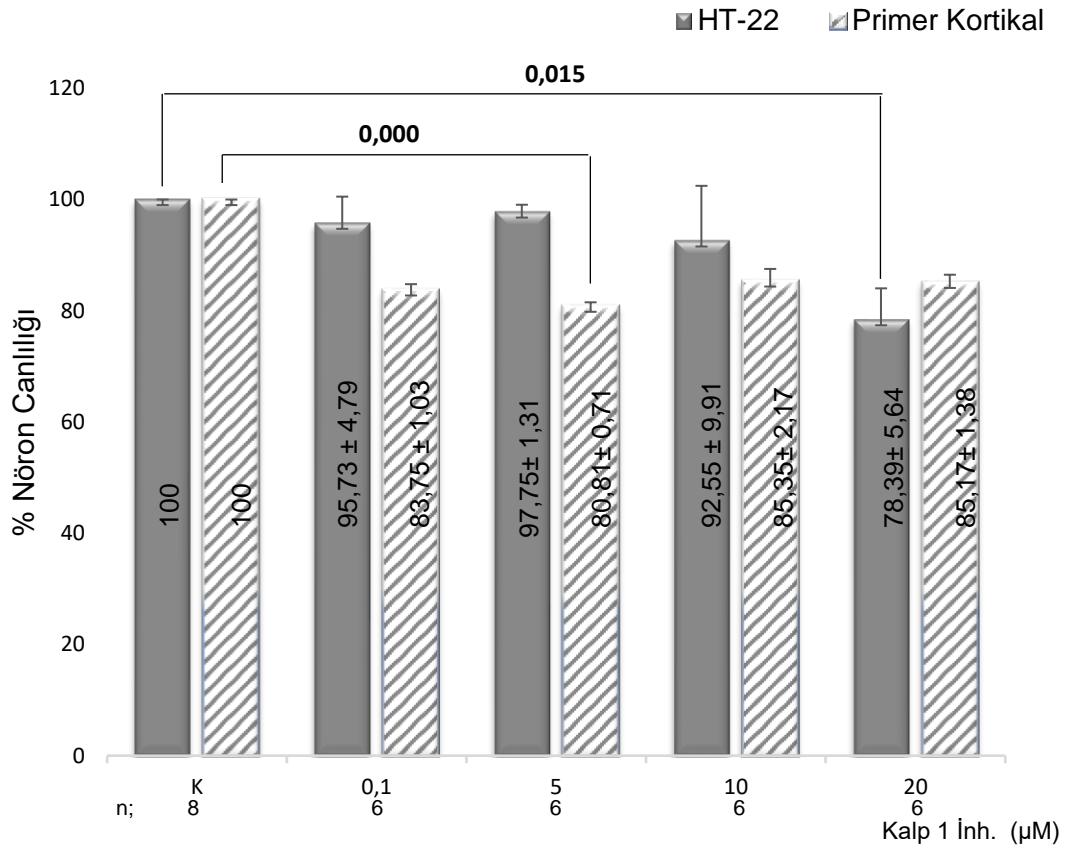
Kalpain 1, sitokrom c ve AIF inhibitörlerinin primer kortikal ve HT-22 hipokampal nöronlarda toksik etki oluşturmayan güvenli dozlarının belirlenmesine ait bulgular **Şekil 4.2.1-3'**te görülmektedir.

Kalpain 1 inhibitörü, sitokrom c inhibitörü MA ve AIF inhibitörü NF'nin HT-22 hipokampal ve primer kortikal nöron kültürlerinde güvenli doz çalışmasına ait tanımlayıcı veriler **Tablo 4.2.1-3'**de gösterilmiştir.

Tablo 4.2.1 Tabloda kalpain 1 inhibitörünün HT-22 ve primer kortikal nöronlarda güvenli doz çalışmasına ait tanımlayıcı veriler görülmektedir.

Gruplar	Primer Kortikal Nöronlar		HT-22	
	A.O ±S.S	Med (min-maks)	A.O ±S.S	Med (min-maks)
Kontrol	100		100	
0.1 µM Kalp 1 İn.	83,75 ± 1,03	83,84(82,32- 84,85)	95,73 ± 4,79	93,99 (91,46 - 101,74)
5 µM Kalp 1 İn.	80,81 ± 0,71	80,81 (79,8 - 81,82)	97,75 ± 1,31	97,97 (96,18 - 99,09)
10 µM Kalp 1 İn.	85,35 ± 2,17	85,35(82,32- 88,38)	92,55 ± 9,91	93,74 (80,92 - 102,99)
20 µM Kalp 1 İn.	85,1 ± 1,38	85,1 (83,33 - 86,87)	78,39 ± 5,64	76,73 (73,08 - 85,36)

Tabloda, A.O.: aritmetik ortalama, S.S.:standart sapma, Med.: medyan değerlerini göstermektedir. Aritmetik ortalama ve medyan değerleri %nöron canlılığına ait verileri belirtmektedir. Kontrol grubu için n=8 (4 kuyu*2 bağımsız deney), diğer gruplar için n=6 (Üç kuyu*2 bağımsız deney).



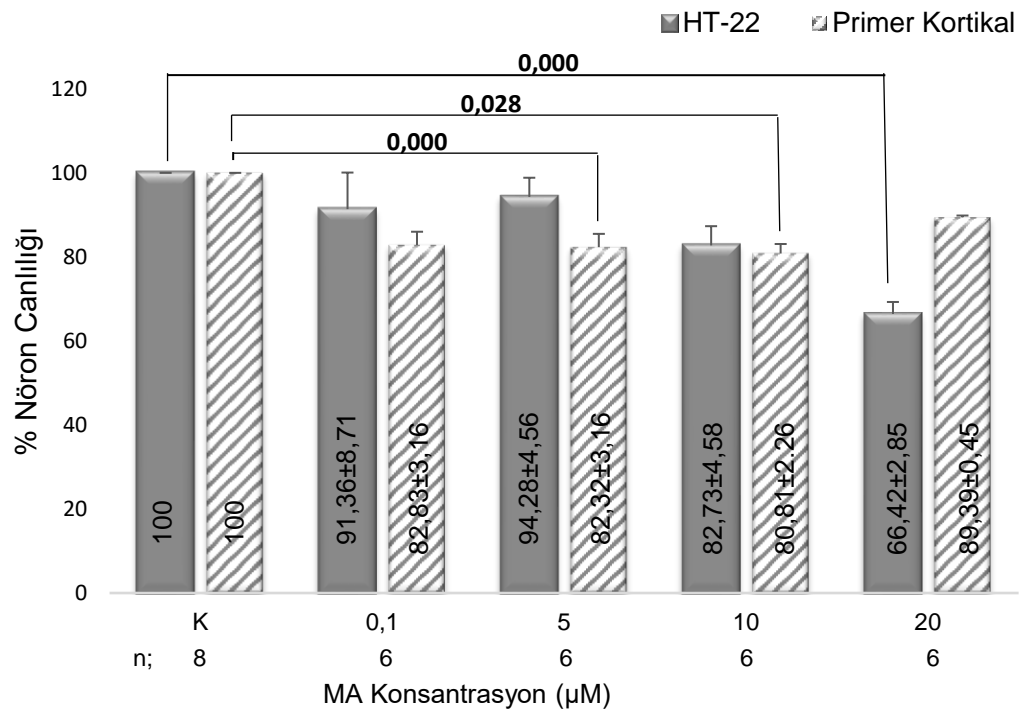
Şekil 4.2.1 Kalpain 1 inhibitörünün HT-22 ve primer kortikal nöronlarda güvenli doz çalışmasına ait veriler gösterilmiştir. % nöron canlılığı olarak verilen sonuçlar ortalama ± standart sapma değerine karşılık gelmektedir. HT-22 ve primer kortikal nöronlar için kalpain 1 inhibitörünün güvenli dozu 10 µM olarak belirlendi. n; kuyu sayısı*2 bağımsız deney

Kalpain 1 inhibitörünün HT-22 hipokampal nöron kültüründe 20 µM'lık dozunda primer kortikal nöron kültüründe ise 5 µM'lık dozunda kontrol grubuna kıyasla nöron canlılığı azalmıştır (sırası ile p=0,0015, p=0,000). HT-22 hipokampal nöronlarda %93 ve primer kortikal nöronlarda %85 oranında hücre canlılığının korunduğu kalpain 1 inhibitörünün 10µM'lık dozu güvenilir doz olarak kabul edildi.

Tablo 4.2.2 Tabloda sitokrom c inhibitörü MA'nın HT-22 ve primer kortikal nöronlarda güvenli doz çalışmasına ait tanımlayıcı veriler görülmektedir.

Gruplar	Primer Kortikal Nöronlar		HT-22	
	A.O \pm S.S	Med (min-maks)	A.O \pm S.S	Med (min-maks)
Kontrol	100		100	
0.1 μ M MA	82,83 \pm 3,16	82,83 (79,29 - 86,36)	91,36 \pm 8,71	95,98 (80,17 - 97,93)
5 μ M MA	82,32 \pm 3,16	82,32 (78,79 - 85,86)	94,28 \pm 4,56	93,41 (89,67 - 99,75)
10 μ M MA	80,81 \pm 2,26	80,81 (78,28 - 83,33)	82,73 \pm 4,58	80,13 (79,43 - 88,64)
20 μ M MA	89,39 \pm 0,45	89,39 (88,89 - 89,9)	66,42 \pm 2,85	68,02 (62,75 - 68,48)

Tabloda, A.O.: aritmetik ortalama, S.S.:standart sapma, Med.: medyan değerlerini göstermektedir. Aritmetik ortalama ve medyan değerleri %nöron canlılığına ait verileri belirtmektedir. Kontrol grubu için n=8 (4 kuyu*2 bağımsız deney), diğer gruplar için n=6 (Üç kuyu*2 bağımsız deney).



Şekil 4.2. 2 Sitokrom c inhibitörü MA'nın HT-22 ve primer kortikal nöronlarda güvenli doz çalışmasına ait veriler gösterilmiştir. % nöron canlılığı olarak verilen sonuçlar ortalama \pm standart sapma değerine karşılık gelmektedir. Sitokrom c inhibitörünün güvenli dozları; primer kortikal nöronlar için 20 μ M, HT-22 hipokampal nöronlar için 10 μ M olarak belirlendi. MA; Methazolamit. n; kuyu sayısı*2 bağımsız deney

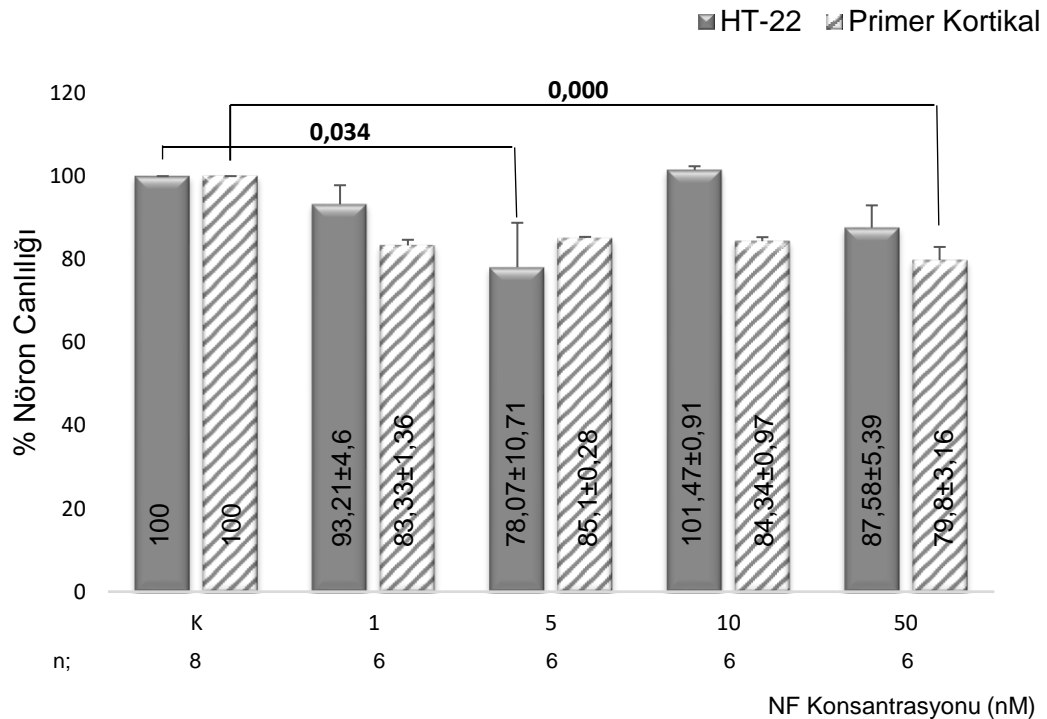
Sitokrom c inhibitörü MA'nın HT-22 hipokampal nöron kültüründe 20 μ M'lık dozunda, primer kortikal nöronlarda ise 5 μ M'lık ve 10 μ M'lık dozlarında kontrol grubuna kıyasla nöron canlılığı azalmıştır (sırası ile p=0,000, p=0,000, p=0,028). MA'nın HT-22

hipkampal nöronlarda nöron canlılığının %83 oranında korunduğu 10 μ M'lık dozu ve primer kortikal nöronlar için nöron canlılığının %85 oranında korunduğu 20 μ M'lık dozu güvenilir doz olarak kabul edildi.

Tablo 4.2.3 Tabloda AIF inhibitörünün HT-22 ve primer kortikal nöronlarda güvenli doz çalışmasına ait tanımlayıcı veriler görülmektedir.

Gruplar	Primer Kortikal Nöronlar		HT-22	
	A.O \pm S.S	Med (min-maks)	A.O \pm S.S	Med (min-maks)
Kontrol	100		100	
1 Nm NF	83,33 \pm 1,36	83,33 (81,82 - 84,85)	93,21 \pm 4,6	91,25 (89,34 - 99,05)
5 Nm NF	85,1 \pm 0,28	85,1 (84,85 - 85,35)	78,07 \pm 10,71	82,21 (64,58 - 87,43)
10 nM NF	84,34 \pm 0,97	84,34 (82,83 - 85,35)	101,47 \pm 0,91	101,95 (100,29 - 102,16)
50 nM NF	79,8 \pm 3,16	79,8 (76,26 - 83,33)	87,58 \pm 5,39	87,97 (81,38 - 93,41)

Tabloda, A.O.: aritmetik ortalama, S.S.: standart sapma, Med.: medyan değerlerini göstermektedir. Aritmetik ortalama ve medyan değerleri %nöron canlılığına ait verileri belirtmektedir. Kontrol grubu için n=8 (4 kuyu*2 bağımsız deney), diğer gruplar için n=6 (Üç kuyu*2 bağımsız deney).



Şekil 4.2.3 AIF inhibitörü NF'nin HT-22 ve primer kortikal nöronlarda güvenli doz çalışmasına ait veriler gösterilmiştir. % nöron canlılığı olarak verilen sonuçlar ortalama \pm standart sapma değerine karşılık gelmektedir. HT-22 ve primer kortikal nöronlar için NF'nin güvenli dozu 10 nM olarak belirlendi. NF; N-fenilmaleimid n; kuyu sayısı*2 bağımsız deney

AIF inhibitörü NF'nin HT-22 hipokampal nöron kültüründe 5nM'lık dozunda primer kortikal nöron kültüründe ise 50nM'lık dozunda kontrol grubuna kıyasla nöron canlılığı azalmıştır (sırası ile $p=0,034$, $p=0,000$). HT-22 hipokampal nöronlarda %101 oranında ve primer kortikal nöronlarda ise %85 oranında nöron canlılığının korunduğu NF'nin 10nM'lık dozu güvenilir doz olarak kabul edildi.

İnhibitörlerin güvenli dozlarının belirlenmesine ait istatistiksel sonuçlar **Tablo 4.2.4** 'te gösterilmiştir.

Tablo 4.2. 4 Tabloda İnhibitörlerin (Kalp1 inh. MA, NF) HT-22 ve primer kortikal nöronlarda güvenli doz çalışmasına ait istatistiksel bulgular görülmektedir.

		İnhibitörlerin Güvenli Dozlarının Belirlenmesinde p Değerleri		
		Bağımsız Değişkenler	Primer Kortikal Nöronlar	HT-22 Hipokampal Nöronlar
Kalpain inhibitörü	Kontrol-Kalp 1 inh. (0,1 μ M)		0,210	1,000
	Kontrol-Kalp 1 inh. (5 μ M)		0,000*	1,000
	Kontrol-Kalp 1 inh. (10 μ M)		1,000	1,000
	Kontrol-Kalp 1 inh. (20 μ M)		1,000	0,015*
Sitokrom c inhibitörü	Kontrol-MA (0,1 μ M)		0,065	1,000
	Kontrol-MA (5 μ M)		0,028*	1,000
	Kontrol-MA (10 μ M)		0,000*	0,060
	Kontrol-MA (20 μ M)		1,000	0,000*
AIF inhibitörü	Kontrol-NF (1 nM)		0,078	1,000
	Kontrol-NF (5 nM)		1,000	0,034*
	Kontrol-NF (10 nM)		0,656	1,000
	Kontrol-NF (50 nM)		0,000*	0,907

*İstatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark olduğunu işaret etmektedir.

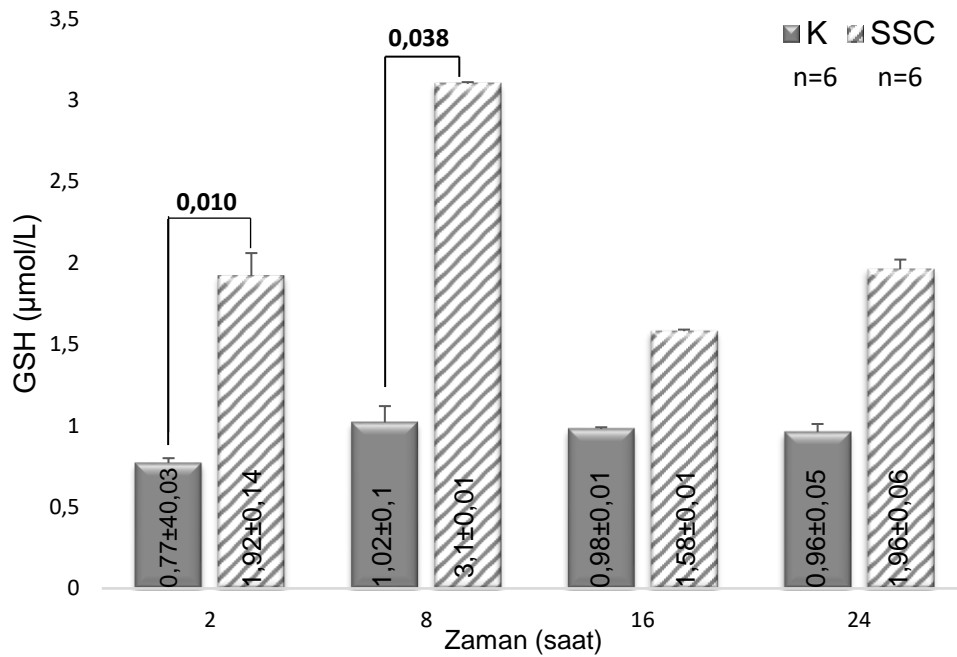
4.3. Glutasyon Analizi Bulguları

HT-22 hipokampal ve primer kortikal nöronlarda LD₅₀ dozunda SSC eklenmesiyle zamana bağlı GSH miktarındaki değişimlere ait bulgular **Şekil 4.3.1-2'** te tanımlayıcı veriler ise **Tablo 4.3.1**'de gösterilmiştir.

Tablo 4.3.1 Tabloda HT-22 ve primer kortikal nöronlarda SSC inkübasyonunun zamana bağlı GSH değişimine ait tanımlayıcı veriler görülmektedir.

Primer Kortikal Nöronlar			HT-22	
Gruplar	A.O ±S.S	Med (min-maks)	A.O ±S.S	Med (min-maks)
Kontrol 1 (2s)			0,77 ± 0,03	0,77 (0,48 - 0,55)
Kontrol 2 (8s)			1,02 ± 0,1	1,02 (0,91 - 1,14)
Kontrol 3 (16s)			0,98 ± 0,01	0,98 (0,96 - 0,99)
Kontrol 4 (24s)			0,96 ± 0,05	0,96 (0,89 - 1,02)
SSC (2s)	0,58 ± 0,08	0,61 (0,48 - 0,66)	1,92 ± 0,14	1,92 (1,76 - 2,07)
SSC (8s)	1,21 ± 0,07	1,19 (1,12 - 1,29)	3,1 ± 0,01	3,09 (3,09 - 3,11)
SSC (16)	0,79 ± 0,14	0,84 (0,62 - 0,92)	1,58 ± 0,01	1,58 (1,58 - 1,59)
SSC (24)			1,96 ± 0,06	1,97 (1,9 - 2,03)

Tabloda, A.O.: aritmetik ortalama, S.S.:standart sapma, Med.: medyan değerlerini göstermektedir. Aritmetik ortalama ve medyan değerleri GSH miktarına (μM) ait verileri belirtmektedir. Tüm gruplar için n=6 (iki pelet*üç ölçüm)



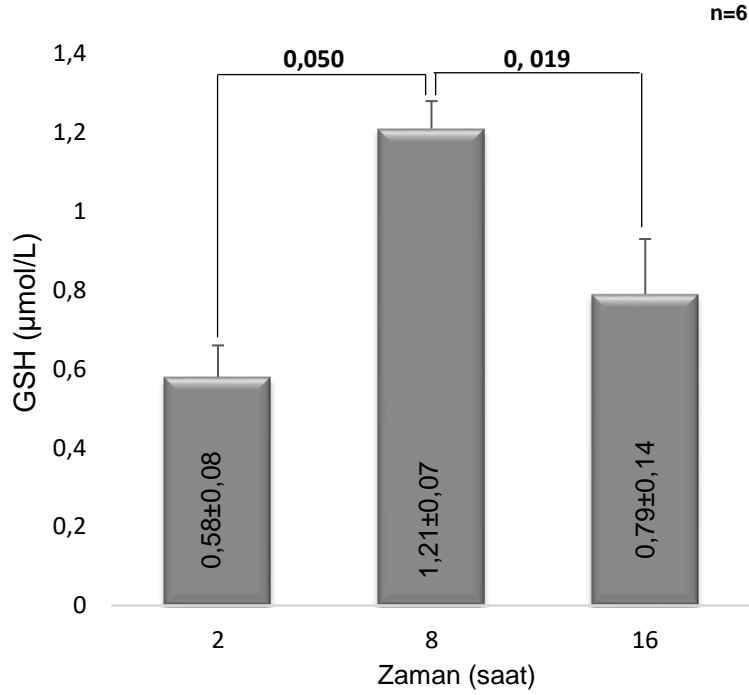
Şekil 4.3.1 HT-22 hipokampal nöronlarda GSH miktarının zamana bağlı değişimine ait veriler gösterilmiştir. GSH miktarı olarak verilen sonuçlar ortalama \pm standart sapma değerine karşılık gelmektedir. İkinci ve sekizinci saatte SSC gruplarının kontrol gruplarına kıyasla GSH miktarını istatistiksel düzeyde arttırdığı görülmektedir ($p < 0,05$). n; pelet sayısı*ölçüm sayısı

SSC (150 μM) ile inkübe edilen HT-22 hipokampal nöronlarda 2. saatte ($p=0,010$) ve 8. saatte ($p=0,038$) kontrol grubuna kıyasla GSH miktarında artış olduğu belirlendi.

On altıncı ve 24. saatte SSC gruplarında kontrol gruplarına kıyasla GSH miktarında istatistiksel düzeyde anlamlı olmayan artış olduğu görülmektedir (**Şekil 4.3.1**). HT-22 hipokampal nöronlarda zamana bağlı olarak; 2-8, 8-16, 16-24. saat zaman aralıklarında kontrol ve SSC gruplarında GSH miktarındaki artış ve azalış % oran olarak hesaplandı (**Tablo 4.3.2**). İkinci saatten 8. saate geçişte GSH miktarı kontrol gruplarında %32,46 SSC gruplarında ise %61,45 oranında artmıştır. Hem kontrol gruplarında hem de SSC gruplarında GSH miktarı 8. saatte en yüksek değerine ulaşmıştır. Sekizinci saatten 16. Saate geçişte GSH miktarı kontrol gruplarında %3,92 SSC gruplarında ise % 49.03 oranında azalmıştır. Onaltıncı saatten 24. saate geçişte GSH miktarı kontrol gruplarında %1,02 oranında azalırken SSC gruplarında ise %24.05 oranında artış göstermiştir. Kontrol gruplarında GSH miktarının 8, 16 ve 24. saatlerde GSH miktarının ortalama aynı değerde olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.3.2 Tabloda HT-22 hipokampal nöronlara SSC verilmesi ile ilerleyen zaman aralıklarında kontrol ve SSC gruplarında GSH miktarındaki değişimlerin % oran değerleri görülmektedir.

Zaman aralığı (saat)	GSH miktarındaki değişimler (%)	
	Kontrol	SSC
2-8	%32,46 artış	%61,45 artış
8-16	%3,92 azalış	%49,03 azalış
16-24	%1,02 azalış	%24,05 artış



Şekil 4.3.2 Primer kortikal nöronlarda GSH miktarının zamana bağlı değişimine ait veriler gösterilmiştir. GSH miktarı olarak verilen sonuçlar ortalama \pm standart sapma sapma değerine karşılık gelmektedir. GSH miktarının SSC grupları arasında 2. saatten 8. saate geçişte anlamlı düzeyde arttığı, 8. saatten 16. saate geçişte anlamlı düzeyde azaldığı görülmektedir ($p < 0,05$). n; pelet sayısı*ölçüm sayısı

SSC (155µM) ile inkübe edilen primer kortikal nöronlarda 2. saat SSC grubunun 8. saat SSC grubuna kıyasla ($p=0,05$) GSH miktarının arttığı, 8. Saat SSC grubunun 16. saat SSC grubuna kıyasla GSH miktarının azaldığı belirlendi.

HT-22 ve primer kortikal nöronlarda GSH miktarının zamana bağlı değişimi çalışmasına ait istatistiksel bulgular **Tablo 4.3.3'**de görülmektedir.

Tablo 4.3.3 Tabloda HT-22 ve primer kortikal nöronlarda GSH miktarının zamana bağlı değişimi çalışmasına ait istatistiksel bulgular görülmektedir.

GSH Miktarının Zamana Bağlı Değişiminde p Değerleri		
Bağımsız Değişkenler	Primer Kortikal Nöronlar	HT-22 Hipokampal Nöronlar
K (2s)-SSC (2s)	-	0,010*
K (8s)-SSC (8s)	-	0,038*
K (16s)-SSC (16s)	-	1,000
K (24s)-SSC (24s)	-	0,163
K (2s)-K (8s)	-	1,000
K (2s)-K (16s)	-	0,777
K (2s)- K (24s)	-	1,000
K (8s)- K (16)	-	1,000
K (8s)- K (24s)	-	1,000
K (16s)-K (24s)	-	1,000
SSC (2s)-SSC (8s)	0,050*	1,000
SSC (2s)-SSC (16s)	1.000	1,000
SSC (2s)- SSC (24s)	-	1,000
SSC (8s)- SSC (16)	0,019*	0,777
SSC (8s)- SSC (24s)	-	1,000
SSC (16s)-SSC (24s)	-	1,000

*İstatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark olduğunu işaret etmektedir.

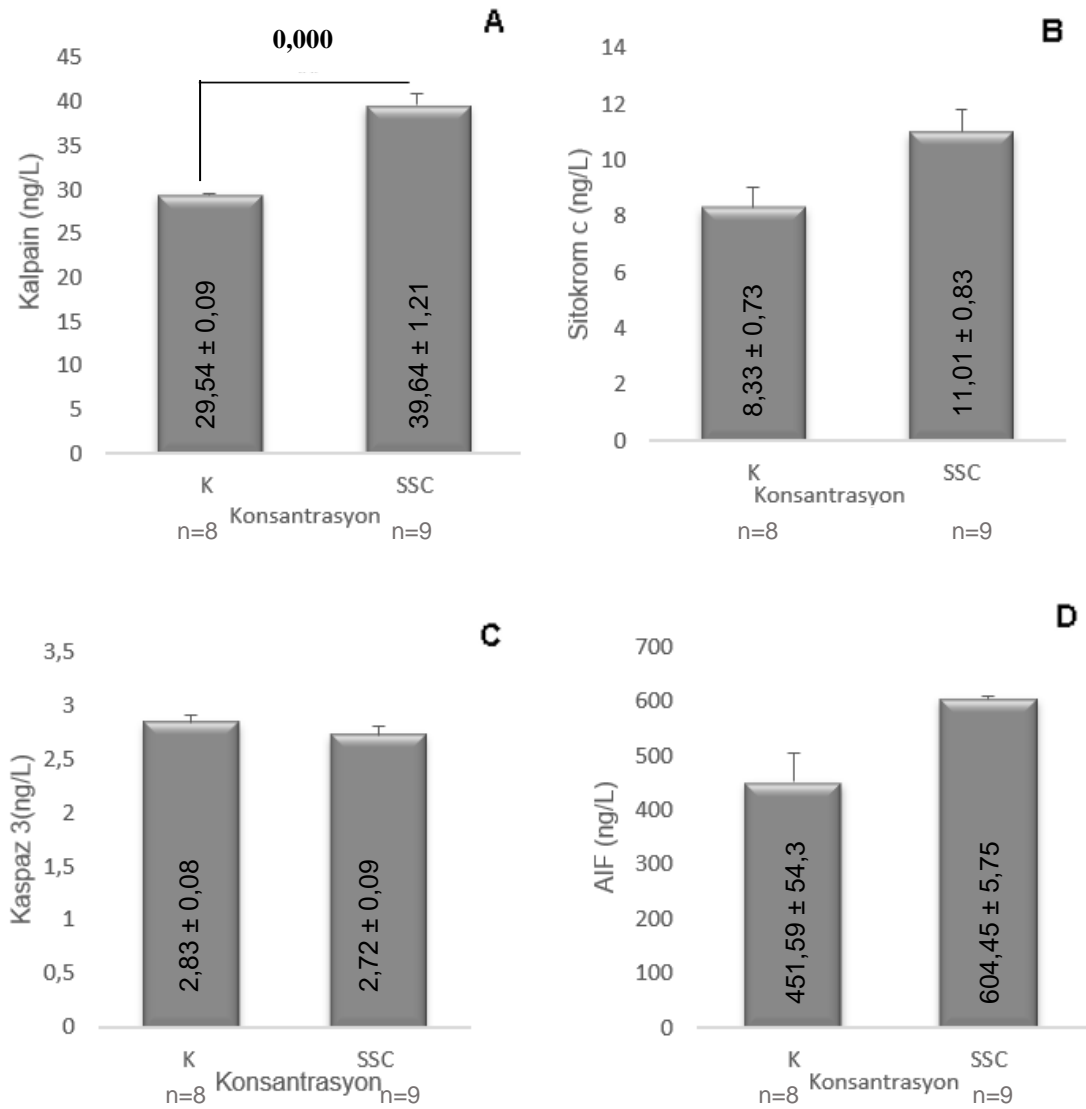
4.4. Apoptoz Sürecinin Belirlenmesine ait Bulgular

HT-22 hipokampal nöron kültürlerine SSC eklenmesinden 16 saat sonra kalpain, AIF, sitokrom c, kaspaz 3 salınım miktarları **Şekil 4.4.1**'de tanımlayıcı veriler ise **Tablo 4.4.1**'de gösterilmiştir. Primer kortikal ve HT-22 hipokampal nöron kültürlerine SSC, SSC+kalpain inhibitörü, SSC+NF, SSC+MA eklenmesinden 24 saat sonra; kalpain, AIF, sitokrom c, kaspaz 3 salınım miktarları **Şekil 4.4.2-9**'te tanımlayıcı veriler ise sırası ile **Tablo 4.4.3-6**'da gösterilmiştir. Primer kortikal ve HT-22 hipokampal nöron kültürlerinde apoptotik faktörlerin belirlenmesine ait tüm istatistiksel değerler ise **Tablo 4.4.2**'de belirtilmiştir.

Tablo 4.4.1 Tabloda HT-22 hipokampal nöron kültürünün 16 saat süreyle SSC inkübasyonunda; kalpain, sitokrom c, AIF ve kaspaz 3 salınım miktarına ait tanımlayıcı veriler görülmektedir.

Gruplar	A.O ±S.S	Med (min-maks)
Kontrol (Kalpain)	29,54 ± 0,09	29,54 (29,44 - 29,64)
SSC (Kalpain)	39,64 ± 1,21	39,64 (38,29 - 40,99)
Kontrol (Sitokrom c)	8,33 ± 0,73	8,33 (7,52 - 9,14)
SSC (Sitokrom c)	11,01 ± 0,83	11,01 (10,09 - 11,94)
Kontrol (AIF)	451,59 ± 54,3	451,59 (390,88 - 512,31)
SSC (AIF)	604,45 ± 5,75	604,45 (598,02 - 610,88)
Kontrol (Kaspaz 3)	2,83 ± 0,08	2,82 (2,74 - 2,93)
SSC (Kaspaz 3)	2,72 ± 0,09	2,72 (2,61 - 2,82)

Tabloda, A.O.: aritmetik ortalama, S.S.:standart sapma, Med.: medyan değerlerini göstermektedir. Aritmetik ortalama ve medyan değerleri kalpain (ng/L), sitokrom c (ng/L), AIF (ng/mL), kaspaz 3 (ng/mL) miktarlarına ait verileri belirtmektedir. Kontrol grupları için n=8 (dört pelet*2 ölçüm) diğer gruplar için n=9 (3 pelet*3 ölçüm)



Şekil 4.4.1 HT-22 Hipokampal nöron kültürüne 150 μ M SSC eklenmesinden 16 saat sonra apoptotik protein miktarındaki değişimlere ait veriler gösterilmiştir. A) Kalpain salınımı B) Sitokrom c salınımı, C) Kaspaz 3 salınımı, D) AIF salınımı. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma değerine karşılık gelmektedir. A) Kalpain salınımı analizinde konsantrasyon değerlerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenmiştir. ($p < 0,05$) B) Sitokrom c salınımı, C) Kaspaz 3 salınımı, D) AIF salınımı analizlerinde konsantrasyon değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır. ($p > 0,05$) n; pelet sayısı*ölçüm sayısı.

HT-22 hipokampal nöron kültürüne SSC eklenmesinden 16 saat sonra apoptotik protein miktarlarındaki değişimler. Kalpain miktarında kontrol grubuna göre SSC grubunda anlamlı düzeyde artış gözlenmiştir ($p = 0,000$). Sitokrom c ve AIF miktarında kontrol grubuna göre SSC gruplarında istatistiksel düzeyde anlamlı olmayan artış gözlenmiştir. Kaspaz 3 miktarında fark bulunmamıştır ($p > 0,005$) (**Şekil 4.4.1**).

Tablo 4.4.2 Tabloda primer kortikal ve HT-22 hipokampal nöron kültürlerinin SSC ile inkübasyonunda; kalpain, sitokrom c, AIF ve kaspaz 3 salınım miktarının belirlenmesine ait istatistiksel bulgular görülmektedir.

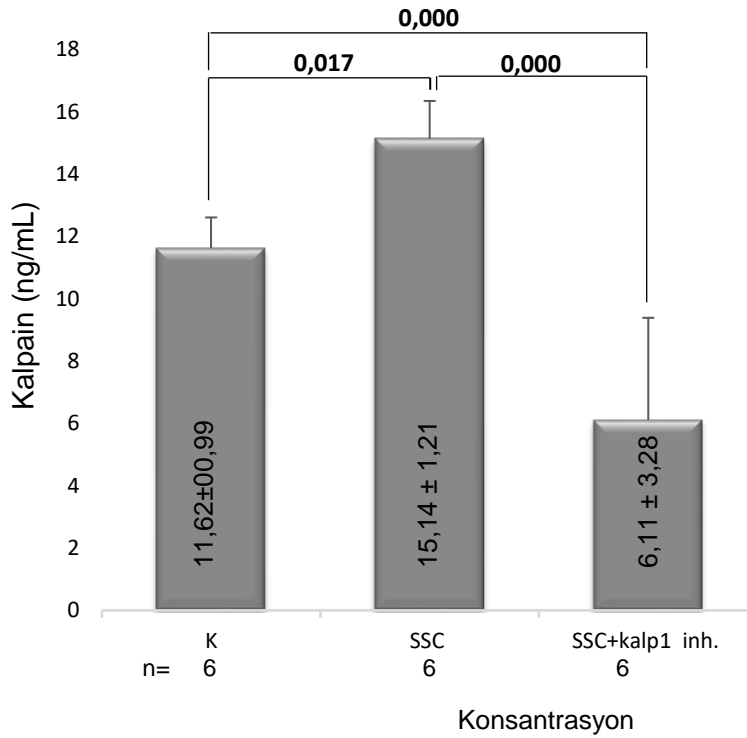
Apoptotik Faktörlerin Belirlenmesinde p Değerleri					
	Bağımsız Değişkenler	Primer Kortikal Nöronlar		HT-22 Hipokampal Nöronlar	
		16. saat	24. saat	16. saat	24. saat
		Kalpain Salınımı	K-SSC	-	,001*
K-SSC+Kalp 1 İnh.	-		,000*	-	,000*
SSC-SSC+Kalp 1 İnh.	-		,000*	-	,000*
Sitokrom c Salınımı	K-SSC	-	,000*	,499	1,000
	K-SSC+MA	-	,000*	-	,160
	SSC-SSC+MA	-	,000*	-	1,000
AIF Salınımı	K-SSC	-	,003*	,499	,003*
	K-SSC+NF	-	,027*	-	1,000
	SSC-SSC+NF	-	1,000	-	,005*
Kaspaz 3 Salınımı	K-SSC	-	,030*	,555	,998
	-				
	-				

*İstatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark olduğunu işaret etmektedir.

Tablo 4.4.3 Tabloda HT-22 hipokampal nöron kültürünün 24 saat süreyle SSC ve SSC+Kalp1 İnh. inkübasyon sonunda; kalpain salınım miktarına ait tanımlayıcı veriler görülmektedir.

Gruplar	A.O ±S.S	Med (min-maks)
Kontrol	11,62 ± 0,99	11,62 (10,51 - 12,73)
SSC	15,14 ± 1,21	15,14 (13,79 - 16,5)
SSC+Kalp 1 inh.	6,11 ± 3,28	6,11 (2,44 - 9,78)

Tabloda, A.O.: aritmetik ortalama, S.S.:standart sapma, Med.: medyan değerlerini göstermektedir. Aritmetik ortalama ve medyan değerleri kalpain (ng/L), miktarına ait verileri belirtmektedir. Tüm gruplar için n=6 (2 pelet*3 ölçüm)



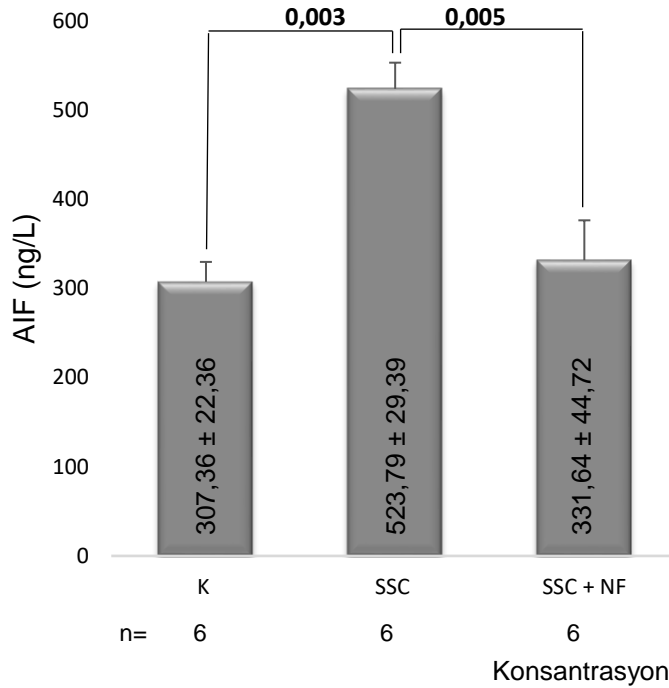
Şekil 4.4.2 HT-22 Hipokampal nöron kültürüne SSC ve SSC+Kalp1 İnh. eklenmesinden 24 saat sonra kalpain miktarındaki değişime ait veriler gösterilmiştir. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma değerine karşılık gelmektedir. Gruplar arası ikili karşılaştırmalarda K-SSC, K-SSC+kalp1 inh., SSC-SSC+kalp1 inh. grupları arasında istatistiksel düzeyde anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,05$). n; pelet sayısı*ölçüm sayısı

HT-22 hipokampal nöron kültüründe K-SSC, K-SSC+kalp1 inh., SSC-SSC+kalp1 inh. grupları arasında kalpain miktarındaki değişim: Kalpain miktarında kontrol grubuna göre SSC grubunda ($p=0,017$) anlamlı düzeyde fazla olduğu, SSC+kalp1 inh. grubunda ($p=0,000$) anlamlı düzeyde daha az olduğu gözlenmiştir. SSC grubu SSC+kalp1 inh. ile kıyaslandığında kalpain miktarında anlamlı düzeyde azalma olduğu gözlenmiştir ($p=0,000$) (Şekil 4.4.2).

Tablo 4.4.4 Tabloda HT-22 hipokampal nöron kültürünün 24 saat süreyle SSC ve SSC+NF inkübasyon sonunda; AIF salınım miktarına ait tanımlayıcı veriler görülmektedir.

Gruplar	A.O \pm S.S	Med (min-maks)
Kontrol	307,36 \pm 22,36	307,36 (282,36 - 332,36)
SSC	523,79 \pm 29,39	523,79 (490,93 - 556,64)
SSC+NF	331,64 \pm 44,72	331,64 (281,64 - 381,64)

Tabloda, A.O.: aritmetik ortalama, S.S.: standart sapma, Med.: medyan değerlerini göstermektedir. Aritmetik ortalama ve medyan değerleri AIF (ng/L), miktarına ait verileri belirtmektedir. Tüm gruplar için n=6 (2 pelet*3 ölçüm)



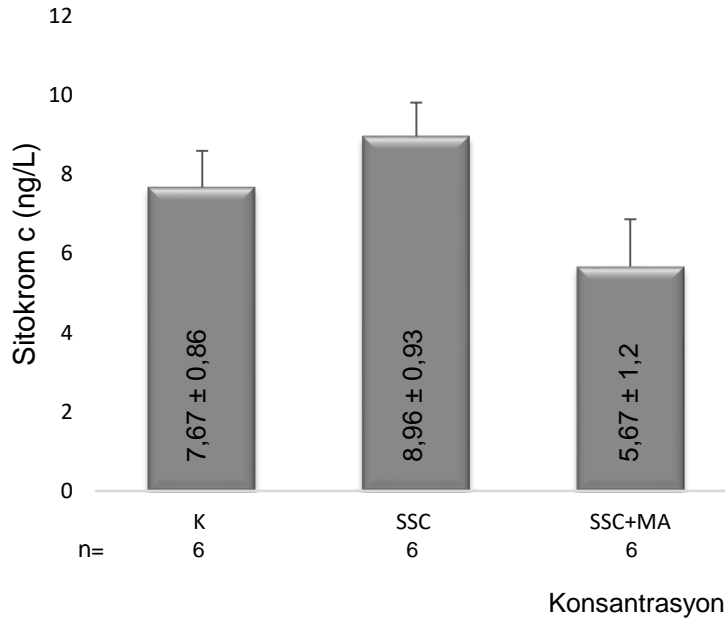
Şekil 4.4.3 HT-22 Hipokampal nöron kültürüne SSC ve SSC+NF eklenmesinden 24 saat sonra AIF miktarındaki değişime ait veriler gösterilmiştir. Sonuçlar ortalama ± standart sapma değerine karşılık gelmektedir. Gruplar arası ikili karşılaştırmalarda K-SSC ve SSC-SSC+NF grupları arasında istatistiksel düzeyde anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,05$). n; pelet sayısı*ölçüm sayısı

HT-22 hipokampal nöron kültüründe K-SSC, K-SSC+NF, SSC-SSC+NF grupları arasında AIF miktarındaki değişim: AIF miktarının kontrol grubuna göre SSC grubunda anlamlı düzeyde daha fazla ($p=0,003$), SSC grubuna göre SSC+NF grubunda anlamlı düzeyde daha az olduğu gözlenmiştir ($p=0,005$) (**Şekil 4.4.3**).

Tablo 4.4.5 Tabloda HT-22 hipokampal nöron kültürünün 24 saat süreyle SSC ve SSC+MA inkübasyon sonunda; sitokrom c salınım miktarına ait tanımlayıcı veriler görülmektedir.

Gruplar	A.O ± S.S	Med (min-maks)
Kontrol	7,67 ± 0,86	7,67 (6,7 - 8,63)
SSC	8,96 ± 0,93	8,96 (7,91 - 10)
SSC+MA	5,67 ± 1,2	5,23 (5,11 - 8,38)

Tabloda, A.O.: aritmetik ortalama, S.S.:standart sapma, Med.: medyan değerlerini göstermektedir. Aritmetik ortalama ve medyan değerleri sitokrom c (ng/L), miktarına ait verileri belirtmektedir. Tüm gruplar için n=6 (2 pelet*3 ölçüm)



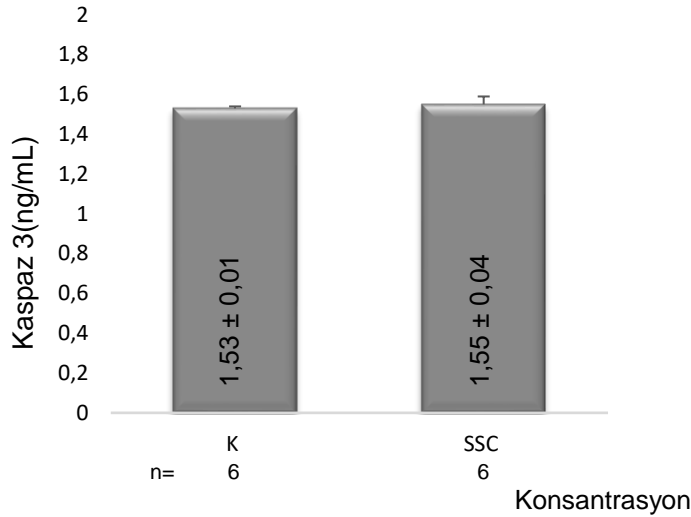
Şekil 4.4.4 HT-22 Hipokampal nöron kültürüne SSC ve SSC+MA eklenmesinden 24 saat sonra sitokrom c miktarındaki değişime ait veriler gösterilmiştir. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma değerine karşılık gelmektedir. Gruplar arası ikili karşılaştırmalarda istatistiksel düzeyde anlamlı fark gözlenmemiştir. n; pelet sayısı*ölçüm sayısı

HT-22 hipokampal nöronlarda, sitokrom c miktarındaki değişimler kontrol, SSC ve SSC+MA olan gruplar arasında değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı düzeyde fark bulunmadı ($p>0,05$) (**Şekil 4.4.4**).

Tablo 4.4.6 Tabloda HT-22 Hipokampal nöron kültürünün 24 saat süreyle SSC ile inkübasyonunda kaspaz 3 salınım miktarına ait tanımlayıcı veriler görülmektedir.

Gruplar	A.O \pm S.S	Med (min-maks)
Kontrol	1,53 \pm 0,01	1,53 (1,52 - 1,54)
SSC	1,55 \pm 0,04	1,55 (1,51 - 1,6)

Tabloda, A.O.: aritmetik ortalama, S.S.: standart sapma, Med.: medyan değerlerini göstermektedir. Aritmetik ortalama ve medyan değerleri kaspaz 3 (ng/mL), miktarına ait verileri belirtmektedir. Tüm gruplar için n=6 (2 pelet*3 ölçüm)



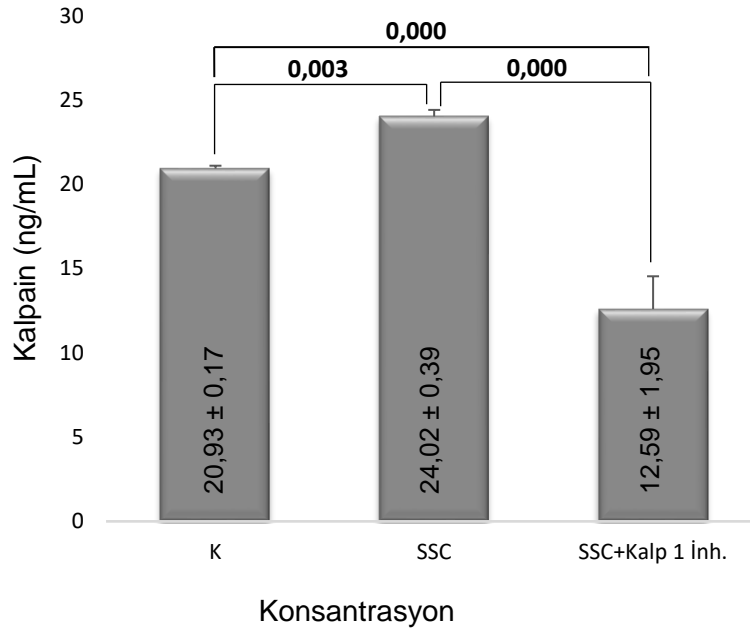
Şekil 4.4.5 HT-22 Hipokampal nöron kültürüne SSC eklenmesinden 24 saat sonra kaspaz 3 miktarındaki değişime ait veriler gösterilmiştir. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma değerine karşılık gelmektedir. Kontrol grubuna göre SSC grubunda anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$). n; pelet sayısı*ölçüm sayısı

Şekil 4.4.5'de görüldüğü gibi HT-22 hipokampal nöronlarda, kontrol ve SSC grupları arasında kaspaz 3 miktarı açısından anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0,05$).

Tablo 4.4.7 Tabloda primer kortikal nöron kültürünün 24 saat süreyle SSC ve SSC+Kalp1 İn. ile inkübasyonu sonunda; kalpain salınım miktarına ait tanımlayıcı veriler görülmektedir.

Gruplar	A.O \pm S.S	Med (min-maks)
Kontrol	20,93 \pm 0,17	20,94 (20,65 - 21,14)
SSC	24,02 \pm 0,39	24,03 (23,5 - 24,47)
SSC+Kalp 1 inh.	12,59 \pm 1,95	12,59 \pm 1,95

Tabloda, A.O.: aritmetik ortalama, S.S.:standart sapma, Med.: medyan değerlerini göstermektedir. Aritmetik ortalama ve medyan değerleri kalpain (ng/mL), miktarına ait verileri belirtmektedir. Tüm gruplar için n=6 (2 pelet*3 ölçüm)



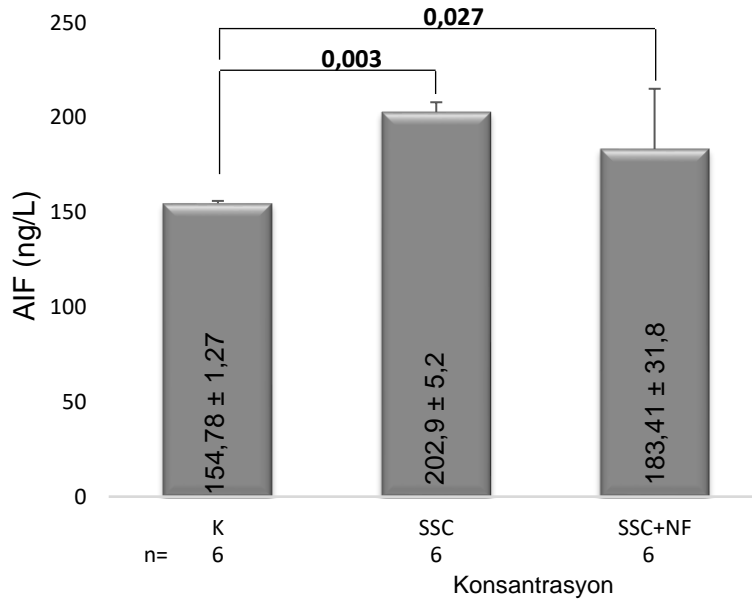
Şekil 4.4.6 Primer kortikal nöron kültürüne SSC ve SSC+Kalp 1 inh. eklendikten 24 saat sonra kalpain miktarındaki değişime ait veriler gösterilmiştir. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma değerine karşılık gelmektedir. Gruplar arası ikili karşılaştırmalarda K-SSC, K-SSC+kalp1 inh., SSC-SSC+kalp1 inh. grupları arasında istatistiksel düzeyde anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,05$). n; pelet sayısı*ölçüm sayısı

Primer kortikal nöron kültüründe K-SSC, K-SSC+kalp1 inh., SSC-SSC+kalp1 inh. grupları arasında kalpain miktarındaki değişim: Kontrol grubuna göre SSC grubunda kalpain miktarının anlamlı düzeyde daha fazla olduğu gözlenmiştir ($p=0,003$). SSC+kalp1 inh. grubunda hem kontrol ($p=0,000$) hem de SSC gruplarına göre kalpain miktarının anlamlı düzeyde daha az olduğu gözlenmiştir ($p=0,000$) (**Şekil 4.4.6**).

Tablo 4.4.8 Tabloda primer kortikal nöron kültürünün 24 saat süreyle SSC ve SSC+NF inkübasyonunda AIF salınım miktarına ait tanımlayıcı veriler görülmektedir.

Gruplar	A.O \pm S.S	Med (min-maks)
Kontrol	154,78 \pm 1,27	154,97 (153,28 - 156,1)
SSC	202,9 \pm 5,2	202,99 (196,78 - 209,21)
SSC+NF	183,41 \pm 31,8	162,88 (162,88 - 224,46)

Tabloda, A.O.: aritmetik ortalama, S.S.:standart sapma, Med.: medyan değerlerini göstermektedir. Aritmetik ortalama ve medyan değerleri AIF (ng/mL), miktarına ait verileri belirtmektedir. Tüm gruplar için n=6 (2 pelet*3 ölçüm)



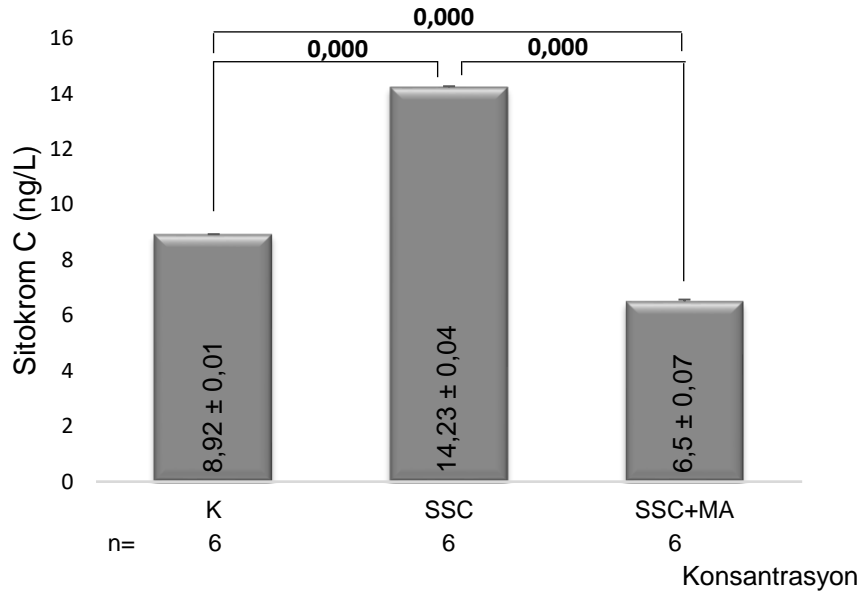
Şekil 4.4.7 Primer kortikal nöron kültürüne SSC ve SSC+NF eklendikten 24 saat sonra AIF miktarındaki değişime ait veriler görülmektedir. Sonuçlar ortalama ± standart sapma değerine karşılık gelmektedir. Gruplar arası ikili karşılaştırmalarda; K-SSC ve K-SSC+NF grupları arasında anlamlı düzeyde fark bulunmuştur ($p < 0,05$). n; pelet sayısı*ölçüm sayısı

Primer kortikal nöron kültüründe K-SSC, K-SSC+NF, SSC-SSC+NF grupları arasında AIF miktarındaki değişim: Kontrol grubuna göre SSC grubunda ($p=0,003$) ve SSC+NF grubunda AIF miktarının anlamlı düzeyde daha fazla olduğu gözlemlendi ($p=0,027$) (**Şekil 4.4.7**).

Tablo 4.4.9 Tabloda Primer kortikal nöron kültürünün 24 saat süreyle SSC ve SSC+MA ile inkübasyonu sonunda sitokrom c salınım miktarına ait tanımlayıcı veriler görülmektedir.

Gruplar	A.O ± S.S	Med (min-maks)
Kontrol	8,92 ± 0,01	8,93 (8,91 - 8,94)
SSC	14,23 ± 0,04	14,23 (14,18 - 14,27)
SSC+MA	6,5 ± 0,07	6,48 (6,4 - 6,62)

Tabloda, A.O.: aritmetik ortalama, S.S.: standart sapma, Med.: medyan değerlerini göstermektedir. Aritmetik ortalama ve medyan değerleri sitokrom c (ng/L), miktarına ait verileri belirtmektedir. Tüm gruplar için n=6 (2 pelet*3 ölçüm)



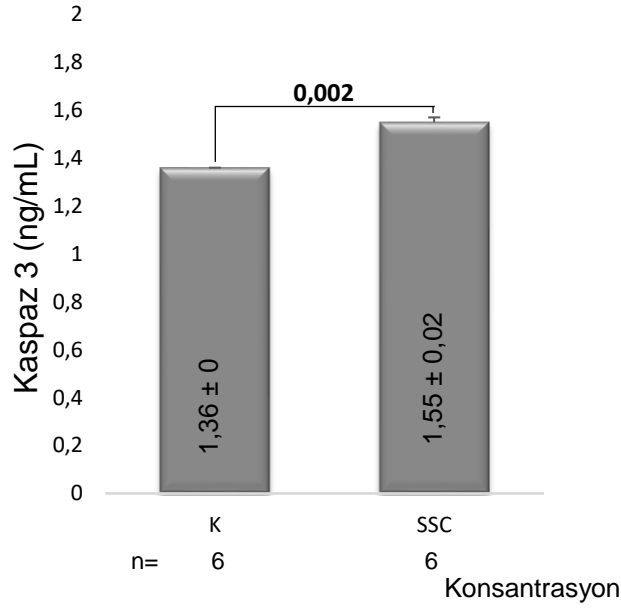
Şekil 4.4.8 Primer kortikal nöron kültürüne SSC ve SSC+MA eklendikten 24 saat sonra sitokrom c miktarındaki değişime ait veriler gösterilmiştir. Sonuçlar ortalama ± standart sapma değerine karşılık gelmektedir. Gruplar arası ikili karşılaştırmalarda; K-SSC, K-SSC+MA, SSC-SSC+MA grupları arasında anlamlı düzeyde fark bulunmuştur ($p < 0,05$). n; pelet sayısı*ölçüm sayısı

Primer kortikal nöron kültüründe K-SSC, K-SSC+MA, SSC-SSC+MA grupları arasında sitokrom c miktarındaki değişim: Sitokrom c miktarının SSC grubuna kıyasla kontrol grubunda ($p=0,000$) ve SSC+MA grubunda anlamlı düzeyde daha fazla olduğu gözlenmiştir ($p=0,000$). Kontrol grubuna kıyasla SSC+MA grubunda sitokrom c miktarının anlamlı düzeyde daha az olduğu saptanmıştır ($p=0,000$) (**Şekil 4.4.8**).

Tablo 4.4.10 Tabloda primer kortikal nöron kültürünün 24 saat süreyle SSC inkübasyonunda kaspaz 3 salınım miktarına ait tanımlayıcı veriler görülmektedir.

Gruplar	A.O ±S.S	Med (min-maks)
Kontrol	1,36 ± 0	1,36 (1,36 - 1,37)
SSC	1,55 ± 0,02	1,56 (1,53 - 1,57)

Tabloda, A.O.: aritmetik ortalama, S.S.: standart sapma, Med.: medyan değerlerini göstermektedir. Aritmetik ortalama ve medyan değerleri kaspaz 3 (ng/mL) miktarına ait verileri belirtmektedir. Tüm gruplar için n=6 (2 pelet*3 ölçüm)

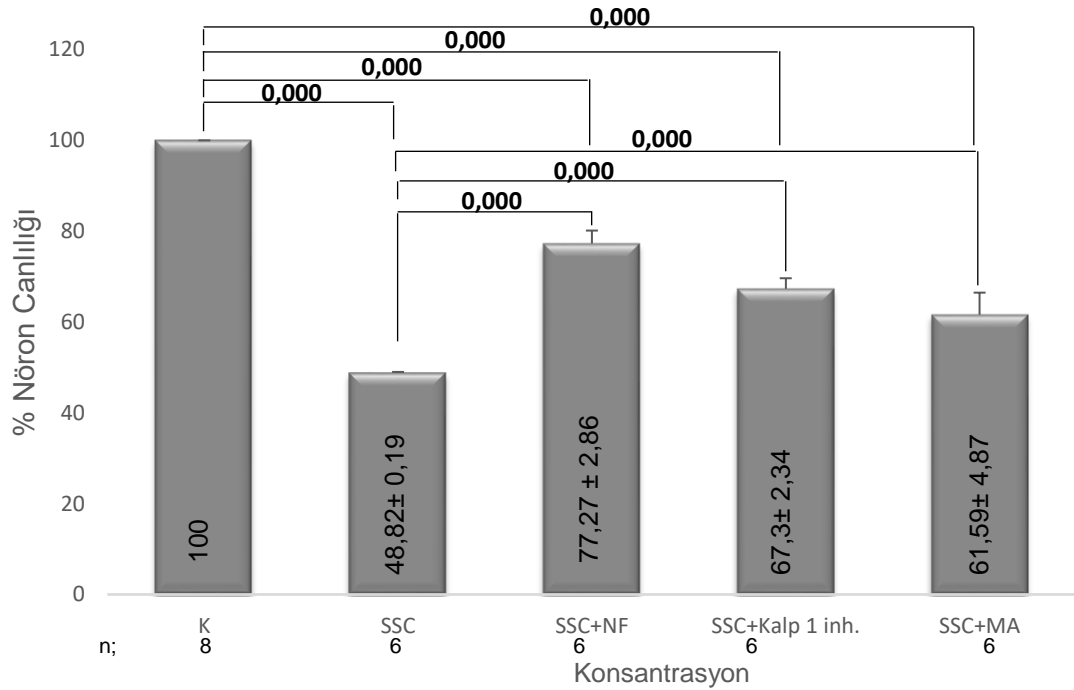


Şekil 4.4.9 Primer kortikal nöronlara 24 saat süreyle SSC verilmesine karşı kaspaz 3 miktarındaki değişime ait veriler gösterilmiştir. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma değerine karşılık gelmektedir. SSC grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı fark gözlenmiştir ($p < 0,05$). n; pelet sayısı*ölçüm sayısı

Primer kortikal nöron kültüründe, Kaspaz 3 miktarının kontrol grubuna kıyasla SSC grubunda anlamlı düzeyde daha fazla olduğu saptandı ($p = 0,030$) (**Şekil 4.4.9**).

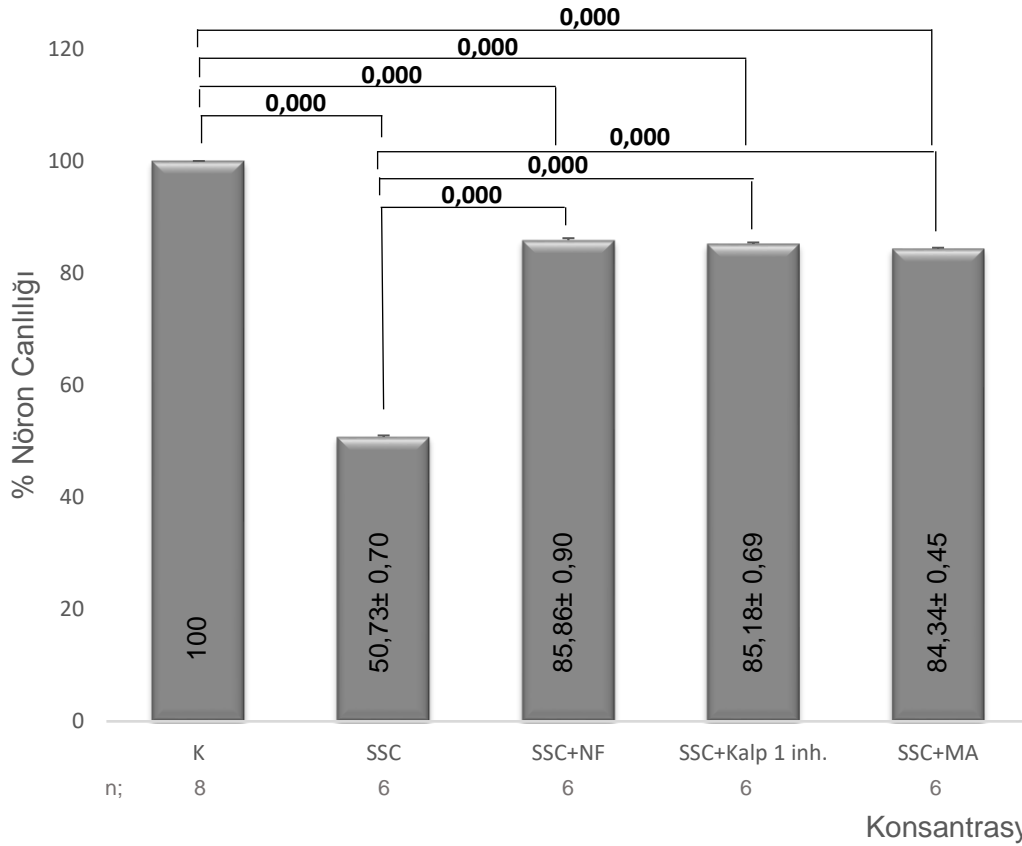
4.5. İnhibitörlerin SSC Toksisitesini Önlemedeki Bulguları

HT-22 hipokampal ve primer kortikal nöron hatlarında, SSC'nin toksik etkisini baskılamada, AIF, sitokrom C ve kalpain 1 inhibitörünün etkisi incelendiğinde; her iki nöron hattında tüm inhibitörlerin kontrol grubuna göre ve SSC grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değişimi gözlemlendi ($p < 0,05$) (**Şekil 4.5.1-2**).



Şekil 4.5.1 HT-22 hipokampal nöronlarda NF, Kalp 1 inh. ve MA'nın SSC toksisitesini önlemede % nöron canlılığına olan etkisine ait veriler gösterilmiştir. % nöron canlılığı olarak verilen sonuçlar ortalama \pm standart sapma değerine karşılık gelmektedir. Kontrol grubuna göre, SSC, SSC+ NF, SSC+Kalp 1 inh. ve SSC+MA grupları; SSC grubuna göre, SSC+ NF, SSC+Kalp 1 inh. ve SSC+MA grupları arasında anlamlı düzeyde fark olduğu gözlenmiştir ($p < 0,05$). Kontrol grubu için $n=8$ (4 kuyu*2 bağımsız deney), diğer gruplar için $n=6$ (Üç kuyu*2 bağımsız deney).

HT-22 hipokampal nöron kültüründe K, SSC, SSC+NF, SSC+kalp 1 inh. ve SSC+MA grupları arasında kontrol grubuna ve SSC grubuna kıyasla %nöron canlılığındaki değişimler: Kontrol grubuna kıyasla, SSC, SSC+NF, SSC+kalp 1 inh. ve SSC+MA gruplarında % nöron canlılığının anlamlı düzeyde daha az olduğu saptandı ($p=0,000$). SSC grubuna kıyasla SSC+NF, SSC+kalp 1 inh. ve SSC+MA gruplarında % nöron canlılığının olarak anlamlı düzeyde daha fazla olduğu gözlenmiştir (**Şekil 4.5.1**).



Şekil 4.5.2 Primer kortikal nöronlarda NF, MA ve Kalpain 1 inhibitörünün SSC toksisitesini önlemede % nöron canlılığına ait veriler gösterilmiştir. % nöron canlılığı olarak verilen sonuçlar ortalama \pm standart sapma değerine karşılık gelmektedir. Kontrol grubuna göre, SSC, SSC+ NF, SSC+Kalp 1 inh. ve SSC+MA grupları; SSC grubuna göre, SSC+ NF, SSC+Kalp 1 inh. ve SSC+MA grupları arasında anlamlı düzeyde fark olduğu gözlenmiştir ($p < 0,05$). Kontrol grubu için $n=8$ (4 kuyu*2 bağımsız deney), diğer gruplar için $n=6$ (Üç kuyu*2 bağımsız deney).

HT-22 hipokampal nöron kültüründe K, SSC, SSC+NF, SSC+kalp 1 inh. ve SSC+MA grupları arasında kontrol grubuna ve SSC grubuna kıyasla %nöron canlılığındaki değişim: Kontrol grubuna kıyasla, SSC, SSC+NF, SSC+kalp 1 inh. ve SSC+MA gruplarında % nöron canlılığının anlamlı düzeyde daha az olduğu saptandı ($p=0,000$). SSC grubuna kıyasla SSC+NF, SSC+kalp 1 inh. ve SSC+MA gruplarında % nöron canlılığının olarak anlamlı düzeyde daha fazla olduğu gözlenmiştir (**Şekil 4.5.1**).

Primer kortikal nöron kültüründe K, SSC, SSC+NF, SSC+kalp11 inh. ve SSC+MA grupları arasında kontrol grubuna ve SSC grubuna kıyasla %nöron canlılığındaki

değişim: Kontrol grubuna göre, SSC, SSC+NF, SSC+kalp 1 inh. ve SSC+MA gruplarında % nöron canlılığının istatistiksel olarak daha az olduğu belirlendi ($p=0,000$). SSC grubuna göre SSC+NF, SSC+kalp 1 inh. ve SSC+MA gruplarında % nöron canlılığının istatistiksel olarak daha fazla olduğu saptanmıştır ($p=0,000$) (**Şekil 4.5.2**).

Tablo 4.5.1 Tabloda primer kortikal ve HT-22 hipokampal nöron kültürlerinin SSC ile inkübasyonunda inhibitörlerin (Kalp 1 inh., MA, NF) SSC toksisitesini önlemede % nöron canlılığına etkisinin belirlenmesine ait istatistiksel bulgular görülmektedir.

İnhibitörlerin (Kalp 1 inh., MA, NF) SSC Toksisitesini Önlemede % Hücre Canlılığına Etkisinin Belirlenmesinde p Değerleri		
Bağımsız Değişkenler	Primer Kortikal Nöronlar	HT-22 Hipokampal Nöronlar
Kontrol-SSC	0,000*	0,000*
Kontrol-SSC+NF	0,000*	0,000*
Kontrol-SSC+Kalp 1 İn.	0,000*	0,000*
Kontrol+SSC+MA	0,000*	0,000*
SSC-SSC+NF	0,000*	0,000*
SSC-SSC+Kalp 1 İn.	0,000*	0,000*
SSC+SSC+MA	0,000*	0,000*

*İstatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark olduğunu işaret etmektedir.

5. TARTIŞMA

Nörodejeneratif hastalıklarda glutamat ve analoglarının eksitotoksik etkiye dayalı yaptığı nöron kaybı 1970'li yıllardan bu yana araştırılmaktadır (Olney 1969, Dong vd 2009, Verma vd 2022). Glutamat analogu olan SSC'nin toksik etkisi bilinmekle beraber hangi apoptotik mekanizma ile nöron kaybına yol açtığı tam olarak aydınlatılmamıştır.

Bu tezin '*SSC HT-22 hipokampal nöronlarda AIF ve kaspain aracılı, primer kortikal nöronlarda ise, kaspaz 3, kaspain ve AIF aracılı hücre ölümünü indükler.*' hipotezi araştırılarak elde edilen bulgulara göre; SSC'nin toksik etkisinin HT-22 hipokampal nöronlarda kaspaz bağımsız (kaspain, AIF), primer kortikal nöronlarda ise hem kaspaz bağımsız (kaspain, AIF) hem de kaspaz bağımlı (kaspain, AIF, sitokrom c) apoptotik yolağı aktive ettiği saptanmıştır.

Hücre hipoksi, viral enfeksiyonlar, hipertermi, radyasyon, toksinler gibi etkenlere maruz kaldığında apoptozis intrinsik mitokondriyal yolak ile uyarılır ve intermembran boşluktan sitozole, sitokrom c, AIF, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, ENDO G gibi pro-apoptotik proteinler salınır (Lorenzo ve Susin 2007). Bunlardan kaspaz bağımsız apoptotik yolakta en fazla çalışılan AIF proteindir. AIF, programlanmış hücre ölümünün indüksiyonu üzerine bir mitokondriyo-nükleer translokasyona uğrar (Abdellatif ve Kroemer 2021). Kaspazların keşfinden önce, AIF'in hücre ölümünü indükleyen bir faktör olduğu kanıtlanmıştır. (Cande vd 2004). Memelilerde, sitokrom c salınımı ve/veya kaspaz aktivasyonunun gerçekleşmediği durumlardan önce AIF'in salınımı olduğunu kanıtlayan çalışmalar mevcuttur. Bu durum örneğin fotoreseptör dejenerasyon, neonatal beyin hasarı ve miyokard enfarktüs gibi deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (Hisatomi vd 2001, Cregan vd 2004).

Deneysel çalışmalarımız sonunda hem primer kortikal nöronlar, hem de HT-22 hipokampal nöronlarda SSC'nin toksik etkisine bağlı olarak AIF salınımının kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha fazla olduğu saptandı. Böylece her iki nöron hattında da kaspaz bağımsız apoptotik yolağın aktive olduğu düşünülmektedir. HT-22 hipokampal nöronlarda glutamat eksitotoksitesinin neden olduğu hücre ölümünün Bcl-2 ailesi proteinlerinden ve kaspaz aktivasyonundan bağımsız olarak AIF aktivasyonu ile

gerçekleştiği rapor edilmiştir (Fukui vd 2009). HT-22 hipokampal nöronlarda eksitotoksik hasara bağlı hücre ölümünde AIF aktivasyonunu raporlayan benzer çalışmalar (Tobaben vd 2011, Fukui vd 2012, Tonsomboon vd 2021) tezin bulgularını desteklemektedir. Sabirzhanov ve arkadaşları (2012) primer kortikal nöronlarda apoptoz boyunca AIF'in sitozolde salınımını bildirmişlerdir.

AIF inhibitörünün HT-22 hipokampal nöronlarda SSC grubuna göre AIF salınım miktarını anlamlı düzeyde daha azalttığı, kontrol grubuna göre anlamlı fark olmadığı saptandı. Bununla beraber AIF inhibitörü SSC'nin yapmış olduğu sitotoksik etkiye bağlı %nöron canlılığı oranını anlamlı derecede arttırmış, kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaltmıştır. Primer kortikal nöronlarda ise AIF inhibitörünün SSC grubuna göre anlamlı bir fark yapmadığı gözlenmekle beraber sitotoksik etkiye bağlı %nöron canlılığında anlamlı derecede artış gözlemlendi. Buradan AIF'in güvenli dozunun daha yüksek seviyeleri ile etkinin artabileceği sonucu çıkarılabilir.

NMDA reseptör aktivasyonu ile ortaya çıkan nörotoksisite esas olarak NO üretiminin artmasına aracılık eder. Esasında NO-aracılı hücre ölümü, PARP-1 nükleer enziminin aktivasyonudur (Hill ve Fitch 2012). DNA hasarından sonra, PARP-1'e bağımlı hücre ölümünde, PARP-1'in AIF salınımını tetiklediği bildirilmiştir. Fare kortikal nöronlarında NMDA reseptör-aracılı eksitotoksisitenin AIF ve PARP-1 translokasyonunun güçlü bir etkileşiminden sonra meydana geldiği gösterilmiştir (Yu vd 2003). Glutamat agonisti olan SSC'nin benzer şekilde NMDA reseptör aracılığı ile, PARP-1 aktivasyonunu tetiklediği öngörülebilir. Bu çalışmada, AIF-aracılı kaspaz bağımsız yolağın varlığı PARP-1 aktivasyonu araştırılarak ortaya konulsaydı, daha tutarlı bulgulara erişilebilirdi.

Kalsiyum bağımlı bir protein kinaz olan kalpain, apoptozisde fodrin ve pro-apoptotik protein Bax gibi proteinlerin hücre iskeletini parçalama işlevi görür. (Wolf vd 1999) Kalpain, kaspaz bağımsız apoptotik yolakta AIF ile birlikte önemli rol oynar. Özellikle nöronlara kalsiyum akışının hızlı olduğu glutamat toksisitesinde, intrasellüler kalsiyumun yüksek seviyeleri nitrik oksit sentaz ve kalpaini aktive ederek mitokondriyal disfonksiyona neden olur (Andrabi vd 2006). Kalpain aktivasyonu apoptozisin başlangıcında gerçekleşen erken bir olaydır ve kalpain inhibitörleri bu ölüm sürecini azaltabilir.

Bu çalışmada, HT-22 hipokampal ve primer kortikal nöronlarda SSC'nin toksik etkisine bağlı olarak kalpain salınımının kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde daha fazla olduğu saptandı. AIF salımının artışı da gözönünde bulundurulduğunda, kalpainin AIF ile birlikte kaspaz bağımsız apoptotik yolağı aktifleştirdiği söylenebilir. Farklı hücre hatlarında glutamat indüklü sitotoksisite oluşturularak karşılaştırılmalı kolektif bir çalışmada rat primer kortikal nöron kültüründe ve HT-22 hipokampal nöron hatlarında

kaspaz bağımsız kalpain aracılı hücre ölümünün gerçekleştiği bildirilmiştir (Kritis vd 2015). Kumar ve arkadaşlarının (2017) yaptığı çalışmada primer kortikal ve hipokampal nöronlarda SSC'nin NMDA reseptörü üzerinden kalsiyum miktarını arttırarak kalpaini aktive ettiği rapor edilmiştir. ROS ve glutamat modeli oluşturularak kalpain aktivasyonun raporlandığı çalışmalar (Zhang ve Bhavnani 2006, Tonsomboon vd 2021) tezin bulguları ile örtüşmektedir.

Kalpain inhibitörünün HT-22 hipokampal nöronlarda SSC grubuna göre kalpain aktivasyonunu %60 oranında, primer kortikal nöronlarda ise yaklaşık %50 oranında azalttığı ve kalpain salınım miktarının anlamlı düzeyde daha az olduğu saptandı. Buna ek olarak nöron hatlarında kalpain inhibitörünün % nöron canlılığı testinde SSC'nin tek başına yapmış olduğu etkiye kıyasla %nöron canlılığı oranının anlamlı düzeyde daha fazla, kontrol grubuna kıyasla daha az olduğu saptanmıştır. Buradan hareketle, kalpain inhibitörünün her iki nöron hattında da kalpain aktivasyonunu önemli derecede baskıladığı sonucuna varılabilir. Bulgularımızın aksine oksitativ glutamat toksisitesinin HT-22 ve primer nöron kültüründe ne kaspaz ne de kalpain inhibisyonunun (kalpain III inhibitörü, 10µM) hücre ölümünü azaltmadığı proteazom inhibisyonu ile nöroprotektif etki sağlandığı raporlanmıştır (Leyen vd 2005). Bu çalışmadan farklı olarak kalpain 1 inhibitörü kullandık. İnhibitörlerin yapısal farklılığı sonucu değiştirmiş olabilir. Hücre içi serbest kalsiyum konsantrasyonundaki bir artış, kalpain aktivasyonunu tetiklerken, düşük hücre içi kalsiyum seviyeleri ve endojen bir kalpain inhibitörü olan kalpastatin, kalpain aktivitesini sınırlar (Kharatmal vd 2015). Hücre düşük düzeyde kalsiyum artışını kompanze edebilir. NMDA reseptörü üzerinden yüksek düzeyde kalsiyum artışına bağlı kalpain aktivasyonunu kalpain inhibitörlerinin başarılı şekilde apoptozu baskıladığı çalışmalar mevcuttur (Jantas vd 2011, Kumar vd 2017).

İntrinsik mitokondriyal apoptozis mitokondriden sitozole salınan sitokrom c ve Apaf-1'in oluşturduğu apoptozom kompleksinin inaktif prokaspaz-9'u aktif kaspaz 9'a dönüştürmesi ile gerçekleşir. Bu yolak kaspaz enzimlerini aktive ettiği için kaspaz bağımlı apoptotik yolak olarak bilinir (Kroemer vd 2007, Jiang vd 2004).

Bu çalışmanın bulgularına göre, HT-22 hipokampal nöronlarda SSC'nin toksik etkisine bağlı olarak sitokrom c aktivasyonunda kontrol grubuna göre anlamlı bir fark gözlenmedi. Primer kortikal nöronlarda ise sitokrom c aktivasyonunda anlamlı derecede artış saptandı. Sitokrom c'nin aktivasyonu ile ilişkili olarak HT-22 hipokampal nöronlarda kaspaz bağımlı apoptotik yolağın aktifleşmediği, primer kortikal nöronlarda ise kaspaz bağımlı apoptotik yolağın aktifleştiği sonucuna varılabilir.

Sitokrom c inhibitörünün HT-22 hipokampal nöronlarda kontrol grubuna ve SSC grubuna kıyasla sitokrom c aktivasyonunda anlamlı fark olmamakla beraber inhibitörün sitokrom c salınımını baskıladığı gözlemlendi. Primer kortikal nöronlarda ise

sitokrom c inhibitörünün hem kontrol grubuna göre hem de SSC grubuna göre sitokrom c aktivasyonunu anlamlı derecede azalttığı gözlemlendi. Her iki nöron hattında da kontrol grubuna göre sitokrom c aktivasyonundaki azalışın inhibitörün spesifik olarak sitokrom c aktivasyonunu baskıladığı sonucuna varılabilir. Primer kortikal nöronlarda SSC'nin yapmış olduğu toksik etkiyi baskılaması sitokrom c-aracılı kaspaz bağımlı apoptotik yolağın aktifleştirdiğini desteklemektedir. Ayrıca sitokrom-c inhibitörü SSC'nin yapmış olduğu sitotoksik etkiye bağlı nöron canlılığını her iki nöron hattında da SSC grubuna göre anlamlı derecede arttırmıştır. Bu sonuç SSC toksisitesinin primer kortikal nöronların sitokrom c-aracılı kaspaz bağımlı apoptotik yolağı aktive ettiği sonucu ile örtüşmektedir. Bununla beraber, primer kortikal nöronlarda sitokrom c inhibitörünün terapötik etkisi olduğu söylenebilir. HT-22 hipokampal nöronlarda SSC'nin toksik etkisinin sitokrom c inhibitörü ile azalmasının sitokrom c'nin baskılanması ile dolaylı olarak AIF salımının azalmasına bağlı olarak nöron canlılığında artış olduğu çıkarımı yapılabilir.

Sistein proteaz ailesinden olan kaspaz enzimlerinin aktifleşmesi; apoptoziste, hücre iskeletinin yıkımı ve nükleer proteinlerin parçalanmasında önemli rol oynar. Hem ekstrinsik hem de intinsik apoptotik yolda son ortak yol, yıkımda etkili olan kaspaz 3'ü aktive eder (Obeng 2021).

Bu çalışmanın sonuçlarına göre, HT-22 hipokampal nöronlarda SSC'nin toksik etkisine bağlı olarak kaspaz 3 aktivasyonunda kontrol grubuna göre anlamlı bir fark gözlemlenmedi. Primer kortikal nöronlarda ise kaspaz 3 aktivasyonunun anlamlı derecede daha fazla olduğu saptandı. Kaspaz 3 aktivasyonu ile ilişkili olarak HT-22 hipokampal nöronlarda kaspaz bağımlı apoptotik yolağın aktifleşmediği, primer kortikal nöronlarda ise kaspaz bağımlı apoptotik yolağın aktifleştiği sonucu çıkarılabilir. Literatürde eksitotoksositeye bağlı hücre ölümünde HT-22 hipokampal nöronlarda kaspaz 3'ün aktifleşmediği, primer kortikal nöronlarda ise aktifleştiği bildirilmiştir (Leyen vd 2005, Zhang ve Bhavnani 2006). Bu çalışmaların aksine Mao ve arkadaşlarının (2016) yaptığı çalışmada glutamat indüklü HT-22 hipokampal nöronlarda kaspaz 3 aktivasyonunun apoptozu indüklediği ve Huperzine A'nın kaspaz 3 aktivasyonunu baskıladığı rapor edilmiştir.

Nöronal hücre tipine bağlı olarak glutamat indüklü apoptoziste; kaspaz 3 bağımlı yolağın, AIF ve kalpain içeren kaspaz bağımsız yolağın olmak üzere en az iki mekanizmanın yer aldığı bildirilmiştir (Zhang vd 2006) Bu çalışmaya göre glutamat indüklenmesi ile HT-22 hipokampal nöronlarda AIF ve kalpainin, primer kortikal nöronlarda ise kaspaz 3, kalpain ve AIF'in aktive olduğu gösterilmiştir. Yukarıda detaylı şekilde tartışılan çalışmamızın sonuçlarına göre HT-22 hipokampal ve primer kortikal

nöronal hücre tipine bağlı olarak SSC indüklü apoptoziste; kaspaz bağımlı (sitokrom c, kaspaz 3) ve kaspaz bağımsız (kalpain, AIF) iki yolak bu çalışma ile örtüşmektedir.

GSH, elektrofilik metabolitler ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu için gerekli bir moleküldür. GSH okside sülfüthidrilleri uzaklaştırır. Memeli hücrelerinde GSH'nin intrasellüler konsantrasyonu 0.5-10 mM arasındadır. %85-90 arasında sitozolde bulunur. GSH kullanımının artması, sınırlı glutatyon sentezi, okside glutatyonun hücre içi redüksiyonun azaltılması gibi faktörler, dokularda ve hücrelerde GSH içeriğini düşüren önemli faktörlerdir (Courtney-Martin ve Penchar 2016).

Oksidatif stres belirteci olarak düşünülen glutatyon azalması, hücre ölüm yollarının aktivasyonunu düzenleyen merkezi bir sinyalizasyon kaskatıdır (Franco ve Cidlowski 2012). Glutatyon azalması farklı hücre tiplerinde zamana bağlı-apoptozu indükler (Diaz-Hernandez 2005, Valverde vd. 2006). Çalışmanın hipotezinde GSH konsantrasyonunun zamana bağlı değişiminin, hücrenin antioksidan kapasitesi ile apoptozun başlama anı arasındaki ilişki için olası durumlar: Birinci olasılık GSH konsantrasyonunun minimum değerinde iken apoptotik belirteçlerin ortaya çıkması, ikinci olasılık GSH konsantrasyonunun azalmaya başladığı bir değerinde apoptotik belirteçlerin ortaya çıkması, üçüncü olasılık, GSH konsantrasyonu minimum düzeyde iken, apoptotik belirteçlerin oluşmaması şeklindeydi (**Şekil 2.9.1**). Tezin bulgularına göre; SSC eklenen gruplarda 2. saatten 8. saate kadar artan GSH miktarının 8. saatten 16. saate kadar azalması, antioksidan kapasitenin toksik etkiye karşı öncelikle artması ve maksimum seviyeye eriştikten sonra azalmaya başlaması birinci ve ikinci olasılık durumunu yansıtmaktadır. Böylece GSH'ın azalması ile birlikte apoptotik süreçlerin başladığı yorumlanabilir. Onaltıncı saatten 24. saate kadar olan GSH artması hücre proliferasyonuna bağlı bir artış olarak yorumlanabilir. Primer kortikal nöronlarda ise 2-8. saatler arasında GSH miktarında anlamlı artış 8-16. saatler arasında GSH miktarında anlamlı azalış olduğu saptandı. Her iki hücre hattı da GSH ile ilişkili benzer antioksidan yanıt oluşturmuştur. Bu bulgulara göre, apoptotik proteinlerin ölçümünün 16. saatten sonra yapılması sonucuna varıldı. Yalnızca HT-22 hipokampal nöronlar için 16. saatte herhangi bir apoptotik belirtecin olup olmadığını belirlemek amacıyla deney yapılabilir. Sonuç olarak kalpain, kaspaz-3, sitokrom c ve AIF proteinlerinin miktarı kontrol grubuna kıyasla yalnızca kalpainde anlamlı olarak artış belirlenmiştir. Tüm zaman dilimlerinde deneysel ölçümlerin alınamama sebebi, kitlerin, primer kortikal nöronların ve SSC miktarının yetersizliğinden kaynaklandı. Ölçümler 24. saat için uygun bulundu. Her iki nöron hattı için daha geniş zaman skalasında GSH ölçümlerinin yapılması ve aynı zaman skalasında apoptotik proteinlerin paralel şekilde ölçülüp kıyaslanması ile daha sağlıklı ve güvenilir bilgiler elde edilebilir.

Bu çalışmada, WST-8 sitotoksosite deneyi ile, AIF, kalpain ve sitokrom c inhibitörlerinin güvenli dozları ve SSC'nin LD₅₀ dozu belirlendi. SSC'nin LD₅₀ dozu primer kortikal nöronlarda 155µM ve hipokampal nöronlarda 150µM olarak bulundu. Literatürde SSC'nin toksik etkilerinin hücre hatlarında araştırıldığı sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Kumar ve arkadaşlarının (2017) yaptığı çalışmada korteks ve hipokampustan alınmış primer nöron kültüründe SSC'nin LD₅₀ dozu 100µM olarak bulunmuştur. Sisteinin nöroktoksik etkisinden bağımsız olarak, sisteinin ve metaboliti olan SSC'nin NMDA reseptörü üzerindeki etkisi sıçan hipokampusunun organotipik kültürleri üzerinde araştırılmıştır. Araştırma sonucuna göre SSC'nin 0,01 ve 0,05mM sisteinin ise 0.05mM değerinde önemli derecede hücre ölümüne sebep olduğu gösterilmiştir (Abbas vd 2008). SSC ve türlerinin Çin Hamster Ovaryum (CHO) hücre hattında antiokasidan kapasitenin araştırıldığı bir çalışmada SSC'nin LD₅₀ dozu 5 mM olarak saptanmış. Fakat 1,5 mM SSC'nin kültür ortamında 7. günden sonra hücre canlılığında azalmaya sebep olduğu rapor edilmiştir (Hecklau vd 2016). Hücre hatlarındaki ve kültür ortamındaki farklılıklar gözönünde bulundurulduğunda SSC'nin primer kortikal ve hipokampal nöronlarda LD₅₀ değerleri Literatüre paralellik göstermektedir.

AIF inhibitörü NF apoptozda kaspaz bağımsız AIF aracılı nükleozomal DNA parçalarını inhibe etmektedir (Susin vd 1996). Atiprimodun manto hücreli lenfoma hücrelerini inhibe ettiği ve mitokondriyal yolları aktive ederek apoptozu indüklediği bir çalışmada NP'nin 50µM'lık dozu kullanılarak AIF aracılı apoptozun baskılandığı gösterilmiştir (Wang vd 2007). Bulaşıcı gastroenterid virüsünün (TGEV) kaspaz yoluyla apoptozu indüklediği fakat apoptozun kaspaz inhibitörleri tarafından tamamen önlenmediği rapor edilmiştir. Bu yüzden, TGEV ile indüklenen hücre apoptozunda kaspaz bağımsız AIF aracılı bir yolak olduğu düşünülerek NF'nin 10µM'lık dozu uygulanmıştır. Kaspaz inhibitörleri ile birlikte verilen 10µM konsantrasyonunda NF'nin apoptozu baskılandığı gösterilmiştir (Ding vd 2018). Görünür ışığın mitokondriyal yol ile retina ganglion hücresinde nükleer DNA'ya zarar vererek hücre ölümünü doğrudan tetikleyip tetiklemediğini belirlemek için tasarlanan çalışmada spesifik PARP inhibitörü ve AIF inhibitörü kullanılmıştır. 10µM konsantrasyonunda NF'nin kısmen apoptotik hasarı azalttığı sonucuna varılmıştır (Guang vd 2011) Literatürde NF'nin 10-50µM uygulanan dozlarından yola çıkarak HT-22 hipokampal nöronlarda güvenli dozun belirlenmesi için 5, 10 ve 50µM'lık NF uygulandı. Yapılan çalışmaların aksine tüm dozlarda HT-22 hipokampal nöronlarda kontrol grubuna göre canlılığın yaklaşık %1,5 oranına düştüğü gözlemlendi. Güvenli dozun belirlenmesi için Literatürde farklı hücrelerde kullanılan dozların yaklaşık 1/1000 oranına düşürülerek deney tekrarlandı. NF 1, 5, 10 ve 50nM konsantrasyonlarında uygulandı. NF'nin HT-22 hipokampal nöronlarda 5nM'lık dozunun, primer kortikal nöronlarda ise 50nM'lık dozunun kontrol grubuna karşılık

istatistiksel olarak anlamlı derecede canlılığı azalttığı görüldü ($p < 0,05$). HT-22 hipokampal nöronlarda %101 olduğu ve primer kortikal nöronlarda ise %85 oranında hücre canlılığının korunduğu NF'nin 10nM'lık dozu güvenilir doz olarak kabul edildi. Burada HT-22 hipokampal nöronlarda 10nM NF uygulanan grubun kontrol grubuna göre hücre canlılığının artması (%101), buna karşın 5nM 'da daha düşük olması (%78) ve 50 nM'da artmış olması dozun miktarına bağlı hücre yanıtı olarak yorumlanabilir. Burada deneylerin tekrarlanması gerekirdi. Fakat tüm dozlarda canlılığın en az %80 oranında korunduğu dozlar güvenli doz kabul edildi. 50 nM'lık dozda nöron canlılığı %87 oranındadır. Bu veriye dayanarak NF'nin 5nM'lık doz ölçümünde deneysel hata olduğu veya yukarıda belirtildiği gibi doza bağlı hücre yanıtı şeklinde yorumlandı. NF'nin Literatürden farklı olarak çok daha düşük seviyelerde etki etmesi hücre hatlarının farklılığından deneysel şartlardan kaynaklanabilir.

Kalpain inhibitörü olarak, kalpain 1 inhibitörü (MDL-281710) kullanıldı. Bir sentetik tripeptit aldehit yapısında olan kalpain 1 inhibitörü; kalpain 1, kalpain 2, katepsin B ve katapsin L'yi inhibe eder (Sasaki vd 1990). Kalpain molekülünün aktif bölgesini bloke eden kalpain 1 inhibitörü kalpainin otolitik degregasyonunu neredeyse tamamen ortadan kaldırır (Wang vd 1996). 10-100 μ M kalpain inhibitörünün I κ B α ve I κ B β 'nin NF κ B aktivasyonunu ve TNF ve IL-1 β 'nin üretimini bloke eden ubiquitin-proteazom kompleksi tarafından I κ B α ve I κ B β 'nin bozulmasını doza bağlı olarak önlediği bilinmektedir (Haas vd 1998). 10 μ M kalpain inhibitörü I, indüklenebilir NOS geninin transkripsiyonuna müdahale ederek aktive makrofajlar tarafından NO üretimini inhibe edebilmektedir (Griscavage vd 1995). Kalpain 1 inhibitörü'nün Trypanosoma cruzi ile ilgili klinik formlara karşı in vitro aktivitesinin araştırıldığı çalışmada; 6.25-12.5-25-50 μ M dozlarında kalpain 1 inhibitörü kullanılmıştır. En düşük konsantrasyonlarda (6.25 μ M) bile enfeksiyon yüzdesinde önemli bir azalma görülmüştür (Ennes-Vidal vd 2010). Primer hipokampal ve kortikal nöronlarda SSC'nin uygulanması ile sinaptik protein gefrinin kalpaine bağlı bozulması ve daha sonra GABAerjik sinaps kaybı SSC-aracılı eksitotoksititeyi desteklemiştir. Eksitotoksik hasara karşı NMDA reseptör antagonisti ve kalpain inhibitörü (10 μ M) kullanılarak bu etkiler araştırılmıştır. SSC veya glutamatın gefrin pozitif küme yoğunluğunu önemli ölçüde azalttığı, NMDA antagonisti veya kalpain inhibitörü varlığında gefrin pozitif küme yoğunluğunun değişmediği gösterilmiştir (Kumar vd 2017). Kalpain 1 inhibitörünün çeşitli çalışmalarda uygulandığı dozlar; 30 μ M (Puskarjov vd 2012), 10 μ M (Yoshikawa vd 2005), 10-50 μ M (Atencio vd 2000), 0,1-10 μ M (Wang vd 1996) olarak tespit edildi. Buradan hareketle kalpain 1 inhibitörünün güvenli doz aralığını saptamak için 0,1, 5, 10, 20 μ M'lık dozları primer kortikal nöronlara ve HT-22 hipokampal nöronlara uygulandı. Kalpain 1 inhibitörünün HT-22 hipokampal nöronlarda 20 μ M, primer kortikal nöronlarda ise 5 μ M kalpain 1 inhibitörünün kontrol grubuna karşılık

istatistiksel düzeyde % nöron canlılığında azalma yaptığı görüldü ($p<0,05$). HT-22 hipokampal nöronlarda %93 ve primer kortikal nöronlarda ise %85 oranında hücre canlılığının korunduğu kalpain 1 inhibitörünün $10\mu\text{M}$ 'lık dozu güvenilir doz olarak kabul edildi. Bu bulgular literatür ile desteklenmektedir.

Sitokrom c inhibitörü olarak methazolamit kullanıldı. MA karbonik asit inhibitörüdür (Maren 1967). H_2O_2 salınımını azaltır, mitokondriyal membran depolarizasyon kaybını önler ve böylece sitokrom c salınımını inhibe eder (Fossati vd 2013). Sıçan glokom modelinde göz içi basıncını ve beyin omurilik sıvısı akışını, sıçan elektroşok indüklü epilepsi modelinde ise nöbetleri azalttığı rapor edilmiştir (Gray ve Rauh 1974). MA'nın subaraknoid kanamanın primer kortikal hücresel modelinde reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engellediği bildirilmiştir (Li vd 2016). Huntington hastalığında sitokrom c salınımının spesifik biyolojik önemini ve sitokrom c inhibitörlerinin terapötik potansiyelini göstermek için yapılan çalışmada mutant htt-ST14A hücreleri kullanılmıştır. MA'nın 9.5 ve $100\mu\text{M}$ 'lık dozları uygulanmıştır. $100\mu\text{M}$ MA'nın apoptojenik faktörlerin salınımını inhibe ettiği, kaspaz-9 ve kaspaz-3 aktivasyonunu engellediği gösterilmiştir (Wang vd 2008). SHSY-5Y, glioma ve insan astrosit hücre hatlarında indüklenmiş apoptozun $100\mu\text{M}$ MA ile inhibe edildiği rapor edilmiştir (Fossatia vd 2016). Wang ve ark (2009) iskemik hasarın deneysel modelinde MA ve melatonin mitokondriyal c salınımını inhibe ederek nöroprotektif etkilerini araştırmışlardır. Çalışmanın in-vitro kısmında primer kortikal nöron kültürü kullanılmış ve MA'nın 100nM - $100\mu\text{M}$ aralığında dozlarının hücre canlılığı üzerine etkilerine bakılmıştır. Deneysel olarak $10\mu\text{M}$ MA dozu uygulanmıştır (Wang vd 2009). Bu çalışmalardan hareketle MA'nin güvenli doz aralığını saptamak için 0.1 , 5 , 10 , $20\mu\text{M}$ 'lık dozları primer kortikal nöronlara ve HT-22 hipokampal nöronlara uygulandı. MA'nın HT-22 hipokampal nöronlarda $20\mu\text{M}$ 'lık dozunun, primer kortikal nöronlarda ise 5 ve $10\mu\text{M}$ 'lık dozlarının kontrol grubuna karşılık istatistiksel düzeyde % nöron canlılığını azalttığı gözlemlendi ($p<0,05$). MA'nın HT-22 hipokampal nöronlarda nöron canlılığının %83 oranında korunduğu $10\mu\text{M}$ 'lık dozu ve primer kortikal nöronlar için nöron canlılığının %85 oranında korunduğu $20\mu\text{M}$ 'lık dozu güvenilir doz olarak kabul edildi. Bu bulgular Literatür ile desteklenmektedir. MA'nın $100\mu\text{M}$ uygulandığı dozlar gözönünde bulundurulduğunda hücre hatlarının farklılığından kaynaklandığı söylenebilir.

Bu çalışmada, HT-22 hipokampal ve primer kortikal nöron hatlarının tercih edilme nedenleri:

1. SSC'nin sebep olduğu eksitotoksik etkinin nörodejenerasyonda selektif hasarlanma açısından karşılaştırılması amacıyla HT-22 hipokampal ve primer kortikal nöron hatları tercih edildi. SSC uygulanan primer kortikal

nöron hattında AIF, sitokrom c, kalpain ve kaspaz 3 salınımı, HT-22 nöron hattında ise AIF ve kalpain salınımı kontrol grubuna göre daha fazla artmıştır. Bu bulgulara göre primer kortikal nöronların eksitotoksik hasara karşı daha duyarlı olduğu söylenebilir. Oksidatif stres sırasında özellikle hipokampus, korteks ve SNc alanlarında nöronal ölüm daha fazla gerçekleşmektedir. Bu alanlar nispeten daha fazla miktarda aktif oksijene sahiptir, ancak antioksidan enzim seviyeleri daha düşüktür (Hu vd 2022). Çalışmamızda, GSH miktarı primer kortikal nöronlarda SSC grupları arasında anlamlı değişime sebep olmuştur. Primer kortikal nöronlarda glutatyon düzeyinin daha az olduğu veya salınım hızının daha düşük olduğu düşünülebilir.

2. Glutamat analogu olan SSC 'nin NMDA reseptörlerinin agonisti olması nedeniyle HT-22 hipokampal ve primer kortikal nöron hatları tercih edildi. Çünkü NMDA reseptör yoğunluğu beynin hipokampal ve kortikal alanlarında yüksek düzeyde bulunmaktadır (Li vd 1999). İskemi, AH, epilepsi gibi nöroderatif hastalıklarda glutamat eksitotoksitesinin araştırıldığı in-vitro çalışmalarda HT-22 hipokampal ve primer kortikal nöron hatları kullanılmıştır (Noh vd 2006, Zhang ve Bhavnani 2006). SSC'nin nörotoksik etkilerinin araştırıldığı in vivo ve in-vitro çalışmalarda serebral korteks ve hipokampal bölümler tercih edilmiştir (Abbas vd 2008, Kumar vd 2017).
3. Diferansiye edilebilme özelliklerinden dolayı primer kortikal ve HT-22 hipokampal nöron hatları tercih edildi. Kültür ortamına eklenen N2 supplement hücrelerde farklılaşmaya sebep olmaktadır. Farklılaşan hücrelerde NMDA reseptör düzeyi artmaktadır. Böylece eksitotoksik etkiye daha duyarlı hale gelmektedir (He vd 2013). Çalışmamızda N2 supplement ile hücreler diferansiye edildi. Fakat diferansiye edilen ve edilmeyen durumların deneyleri ayrı ayrı yapıp karşılaştırılmadı. İleride böyle bir karşılaştırmanın yapılması diferansiye işlemi ile NMDA reseptör düzeylerinin artışı doğrulanabilir.

Tez çalışmasındaki kısıtlılıklar ve eksikler;

Bu çalışmada kullanılan HT-22 hipokampal nöron hattı pasaj sayısı 16 olan hücre hattından sürdürülmüştür. Her ne kadar HT-22 nörodejeratif hastalıklarda model olarak kullanılsa da, primer nöron kültürü kullanılması daha güvenilir sonuçlar verecektir. Çünkü her pasaj sonrasında hücre çeşitli farklılaşmalara uğrayabilir (Shall vd 2018). İmkanlar dahilinde primer nöron kültürü veya pasaj sayısı düşük hücre hatları tercih edilmelidir. Primer kortikal nöronlar ticari olarak temin edildi. Burada dondurulup tekrar

çözdürülmeye bağlı olarak hücre yapısında değişimler olabilir. Bu sebeplerden dolayı primer nöron kültürlerinin izole edilmez deneylerde taze kullanılması tercih edilir.

Primer kortikal nöronların yüksek maliyetinden ötürü GSH ölçümlerinde kontrol gruplarının ve 24. saat SSC ve kontrol gruplarının oluşturulmaması bu çalışmanın en önemli kısıtlılığı olmuştur. Bunun yanı sıra HT-22 hipokampal nöron hattında apoptotik proteinlerin (kalpain, AIF, kaspaz 3, sitokrom c) 16. saat için salınım miktarları kontrol grubuna göre değerlendirilirken primer kortikal nöronlarda bu deneyler yapılamadı. Aslında planlanan 2, 8, 16 ve 24. saatler için primer kortikal ve HT-22 hipokampal nöron hatlarında apoptotik proteinlerin salınım miktarlarının kontrol gruplarına göre değerlendirilmesiydi. HT-22 hipokampal nöronlarda kitlerin, primer kortikal nöronlarda ise hem nöron kültürünün hem de kitlerin yetersiz olmasından kaynaklı deneyler planlanan şekilde tamamlanamadı. Apoptotik sürecin belirlenmesinde Anneksin V-FITC, TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling) gibi immünohistokimyasal yöntemler kullanılmadı. Bu yöntemlerle apoptozun görüntülenmesi çalışmanın nitel açıdan değerlendirilmesini sağlayabilirdi. Apoptotik proteinlerin analizinde yöntem olarak western blot ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR)'ın kullanılmaması bu tezin kısıtlılıkları arasındadır. Bu çalışmada antioksidan kapasitenin belirlenmesinde yalnızca GSH miktarındaki değişimler analiz edilmiştir. Buna ek olarak; süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz gibi enzimlerin aktivitesinin araştırılması çalışmanın bulgularını destekleyebilirdi. Bu çalışmada AIF, kalpain ve sitokrom c inhibitörlerinin sadece belirlenen güvenli dozları ile deneyler sürdürüldü. İnhibitörlerin farklı dozlarının SSC'nin toksik etkisi üzerindeki inhibisyonunu nasıl etkilediğini araştıramamak deneysel kısıtlılıklardan kaynaklandı. Ayrıca kaspaz 3 inhibitörü yüksek maliyetinden dolayı temin edilemediği için ilgili deneyler eksik kalmıştır.

Kükürt içeren aminoasitlerin katabolizması literatürde kapsamlı olarak araştırılrsa da, katabolik yolağın ürünü olan SSC ile ilgili sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bu tez çalışmasında SSC'nin glutamat analogu olmasına ilişkin apoptotik süreçteki bulgulara erişildi. Özellikle İSOD ve MoCD'da nörodejenerasyonu en aza indirecek apoptotik inhibitörler saptandı. Bu çalışmada yoğunlaşılan nokta nörodejenerasyonda selektif hasarlanabilirliğin primer kortikal ve HT-22 hipokampal nöronlarda karşılaştırılmalı olarak analiz edilmesiydi. Sonuç olarak primer kortikal nöronların apoptotik sürece daha duyarlı olduğu belirlendi. Bu çalışmanın sınırları genişletilerek eksitotoksik hasara karşı beynin diğer bölümleri karşılaştırmalı olarak araştırılması önerilmektedir. Ayrıca SSC'nin tek başına yapmış olduğu etki klinik açıdan yetersiz olduğundan sülfid ile etkileşimi sonucu nörodejenerasyondaki etkisini deney hayvanları kullanarak apoptotik sürecin değerlendirilmesi düşünülmektedir.

6. SONUÇ

Bu çalışmada, HT-22 hipokampal nöronlarda SSC'nin sitotoksik etkisiyle AIF ve kalpain aktivasyonunun artması ile kaspaz bağımsız, primer kortikal nöronlarda ise AIF, sitokrom c ve kaspaz 3 aktivasyonunun artması ile hem kaspaz bağımlı hem de kaspaz bağımsız apoptotik yolağın indüklendiği sonucuna varıldı. Antioksidan kapasitenin sitotoksik etkiye yanıt oluşturmada zamana bağımlı öncelikle artış gösterip daha sonra azaldığı ve azalma anından sonra apoptozisin indüklendiği gösterildi. Özellikle sitokrom c ve kalpain inhibitörünün SSC'nin toksik etkisini azalttığı ve terapötik potansiyel taşıdığı sonucuna varıldı.

Elde edilen deneysel bulgulara göre sonuçlar aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

1. SSC'nin HT-22 hipokampal ve primer kortikal nöron hatlarında sitotoksik etkisi belirlendi ve LD₅₀ değerleri bulundu.
2. AIF, sitokrom c ve kalpain 1 inhibitörlerinin HT-22 hipokampal ve primer kortikal nöron hatlarında sitotoksik etkisi ve güvenli dozları belirlendi.
3. SSC'nin LD₅₀ dozunda HT-22 hipokampal nöronlarda zamana bağlı GSH ölçümleri yapıldı. İki ve sekizinci saatlerde kontrol gruplarına göre GSH miktarının arttığı saptandı.
4. SSC'nin LD₅₀ dozunda primer kortikal nöronlarda zamana bağlı GSH ölçümleri yapıldı. SSC grupları arasında 2-8 saatlik zaman diliminde GSH miktarının arttığı 8-16 saatlik zaman diliminde azaldığı saptandı.
5. SSC'nin LD₅₀ dozunun HT-22 hipokampal nöronlarda kontrol grubuna kıyasla AIF ve kalpain miktarlarında artış gözlemlendi.
6. SSC'nin LD₅₀ dozunun primer kortikal nöronlarda kontrol grubuna kıyasla AIF, kalpain, kaspaz 3 ve sitokrom c miktarlarında artış gözlemlendi.
7. Kalpain inhibitörü HT-22 hipokampal ve primer kortikal nöronlarda hem kontrol grubuna hem de SSC grubuna göre kalpain salınımını azalttığı saptandı.
8. Sitokrom c inhibitörü MA'nın HT-22 hipokampal nöronlarda kontrol grubuna ve SSC grubuna kıyasla sitokrom c salınımında etkisi gözlemlenmedi. Primer kortikal

nöronlarda ise MA'nın kontrol grubuna ve SSC grubuna kıyasla sitokrom c salınımını baskıladığı saptandı.

9. AIF inhibitörü NF'nin HT-22 hipokampal nöronlarda AIF salınımını SSC grubuna göre baskıladığı, kontrol grubuna göre fark olmadığı saptandı. Primer kortikal nöronlarda NF, kontrol grubuna göre sitokrom c salınımını arttırdığı, SSC grubuna göre etki etmediği gözlemlendi.
10. AIF, kalpain 1 ve sitokrom c inhibitörlerinin SSC ile birlikte verilmesiyle HT-22 hipokampal ve primer kortikal nöron hatlarında sitotoksik etkiyi inhibe edip etmediği belirlendi. Kullanılan tüm inhibitörlerin her iki nöron hattında da SSC'nin yapmış olduğu sitotoksik etkiyi anlamlı derecede azalttığı saptandı.

7. KAYNAKLAR

Abbas AK, Xia W, Tranberg M, Wigström H, Weber SG, Sandberg M. S-Sulfo-Cysteine is an Endogenous Amino Acid in Neonatal Rat Brain but an Unlikely Mediator of Cysteine Neurotoxicity. **Neurochem Res** 2008;33(2):301-307.

Abdellatif M ve Kroemer G. Exercise-induced sudden cardiac death is caused by mitochondrio-nuclear translocation of AIF **Cell Death and Disease** 2021; 12(383), doi.org/10.1038/s41419-021-03677-w

Abe K, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. **J. Neurosci.** 1996; 16: 1066–1071.

Alonzo Martínez MC, Cazorla E, Cánovas E, Anniuk E, Cores AE, Serrano AM, Molybdenum Cofactor Deficiency: Mega Cisterna Magna in Two Consecutive Pregnancies and Review of the Literature. **The Application of Clinical Genetics** 2020; 13: 49–55.

Andrabi SA, Kim NS, Yu SW, Wang H, David W. Koh DW, Sasaki M, Klaus JA, Otsuka T, Zhang Z, Koehler RC, Hurn PD, Poirier GG, Dawson VL, Dawson TM. Poly(ADP-ribose) (PAR) polymer is a death signal. **PNAS** 2006; 103(48): 18308–18313.

Ariga H, Kazuko K. Neuroprotective Function of DJ-1 in Parkinson's Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity** 2013; <http://dx.doi.org/10.1155/2013/683920>

Arnoult D, Gaume B, Karbowski M, Sharpe JC, Cecconi F, Youle RJ. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. **EMBO J** 2003; 22(17): 4385–4399.

Arundine M ve Tymianski M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. **Cell Calcium** 2003; 34: 325–337

Ashkenazi A. Ve Dixit VM. Death Receptors: Signaling and Modulation. **Science** 1998; 281: 1305-1308.

Atencio IA, Ramachandra M, Shabram P, Demers GW. Calpain Inhibitor 1 Activates p53-dependent Apoptosis in Tumor Cell Lines **Cell Growth & Differentiation** 2000; 11: 247–253.

Attwell D ve Laughlin SB, An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. **J Cereb Blood Flow Metab** 2001; 21: 1133–1145

Avila J, Llorens-Martí M, Pallas-Bazarra N, Bolos M, Perea JR, Rodríguez-Matellán A, Hernández F. Cognitive decline in neuronal aging and Alzheimer's disease: role of NMDA receptors and associated proteins. *Front Neurosci* 2017; 11:626.

Azzini E, Ruggeri S, Polito A. Homocysteine: Its Possible Emerging Role in At-Risk Population Groups. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 1421; doi:10.3390/ijms21041421

Banoa D, Ankarçrona M. Beyond the critical point: An overview of excitotoxicity, calcium overload and the downstream consequences *Neurosci. Lett.* 2018; 663: 79-85.

Bayram E, Topcu Y, Karakaya P, Yis U, Cakmakci H, Ichida K, Hiz Kurul S. Molybdenum cofactor deficiency: Review of 12 cases (MoCD and review). *European Journal of Pediatric Neurology* 2013; 17:1-6.

Bedard K ve Krause KH. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev* 2007; 87: 245–313.

Beutler E Nutritional and metabolic aspects of glutathione. *Annu. Rev. Nutr.* 1989; 9: 287-302.

Bouillaud F ve Blachier F. Mitochondria and sulfide: a very old story of poisoning, feeding, and signaling? *Antioxid. Redox Signal.* 2011; 15, 379-391.

Boujrad H, Gubkina O, Robert N, Krantic S, Santos A, Susin SA. AIF-Mediated Programmed Necrosis: A Highly Orchestrated Way to Die. *Cell Cycle* 2007; 6(21): 2612-2619.

Brickley S, Misra C, Selina Mok MH, Mishina M, Cull-Candy SG. NR2B and NR2D Subunits Coassemble in Cerebellar Golgi Cells to Form a Distinct NMDA Receptor Subtype Restricted to Extrasynaptic Sites. *J. Neurosci* 2003; 23(12): 4958–4966.

Brini M, Cali T, Ottolini D, Carafoli E. Neuronal calcium signaling: function and dysfunction. *Cell. Mol. Life Sci.* 2014; 71; 2787–2814

Broker LE, Krzyt FA, Giaccone G. Cell Death Independent of Caspases: A Review. *Clin Cancer Res.* 2005; 1131(55): 62.

Brustovetsky N, Brustovetsky T, Jemmerson R, Dubinsky JM. Calcium-induced Cytochrome c release from CNS mitochondria is associated with the permeability transition and rupture of the outer membrane. *Journal of Neurochemistry* 2002; 80(2): 207-18

Bundel D, Schallier A, Loyens E, Fernando R, Miyashita H, Liefferinge JV, Vermoesen K, Bannai S, Sato H, Michotte Y, Smolders I, Ann Massie A. Loss of system x_c^- does not induce oxidative stress but decreases extracellular glutamate in hippocampus and influences spatial working memory and limbic seizure susceptibility. *J. Neurosci.* 2011; 31: 5792–5803.

Burnashev N, Zhou Z, Neher E. Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes. *J Physiol* 1995; 485(2):403–418.

Cadet JL, Krasnova IN, Jayanthi S, Lyles J. Neurotoxicity of substituted amphetamines: molecular and cellular mechanisms. *Neurotox Res* 2007; 11(3-4):183-202.

Cande C, Vahsen N, Garrido C, Kroemer G. Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all. **Cell Death and Differentiation** 2004; 11: 591–595.

Cande C, Cecconi F, Dessen P, Kroemer G. “Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death?”, **J Cell Sci.** 2002; 115, 4727-4734.

Chen WL, Niu YY, Jiang WZ, Tang HL, Zhang C, Xia QM, Tang XQ. Neuroprotective effects of hydrogen sulfide and the underlying signaling pathways. **Rev. Neurosci.** 2015; 26(2): 129–142.

Chiku T, Padovani D, Zhu W, Singh S, Vitvitsky V, Banerjee R. H₂S biogenesis by human cystathionine gamma-lyase leads to the novel sulfur metabolites lanthionine and homolanthionine and is responsive to the grade of hyper homocysteinemia. **J. Biol. Chem.** 2009; 284: 11601–11612.

Chittajallu R, Vignes M, Dev KK. Regulation of glutamate release by presynaptic kainate receptors in the hippocampus. *Nature.* 1996; 379:78–81.

Choi DV. Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. **TINS.** 1988; 11: 465-469.

Choi DW. Excitotoxicity: Still Hammering the Ischemic Brain in 2020. **Front. Neurosci** 2020; 14:579953.

Ciechanowska A, Ciapała K, Pawlik K, Oggioni M, Mercurio D. Initiators of Classical and Lectin Complement Pathways Are Differently Engaged after Traumatic Brain Injury-Time-Dependent Changes in the Cortex, Striatum, Thalamus and Hippocampus in a Mouse Model. **Int J Mol Sci.** 2020; 22;22(1):45. doi: 10.3390/ijms22010045.

Claerhout H, Witters P, Regal L, Jansen K, Hoestenbergh MR, Breckpot J, Vermeersch P. Isolated sulfite oxidase deficiency. **J Inherit Metab Dis** 2018; 41:101–108.

Courseya TE ve Ligeti E. Regulation and termination of NADPH oxidase activity. **Cell. Mol. Life Sci.** 2005; 62: 2173–2193.

Courtney-Martin G. ve Penchar PB Sulfur Amino Acids Metabolism From Protein Synthesis to Glutathione **PNAS** 2016; 103(48):18308–18313.

Cregan SP, Dawson VL, Slack RS. Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. **Oncogene** 2004; 23: 2785–2796.

Cregan SP, Fortin A, MacLaurin JG, Callaghan SM, Cecconi F, Yu S-W, Dawson TM, Dawson VL, Park DS, Kroemer G, Ruth S, Slack RS. Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. **The Journal of Cell Biology** 2002; 158: 507–517.

Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. **Curr Opin Neurobiol** 2001; 11(3): 327-35.

Dash PK, Hergenroeder GW, Jeter CB, Choi HA, Kobori N, Moore AN. Traumatic Brain Injury Alters Methionine Metabolism: Implications for Pathophysiology. **Front. Syst. Neurosci.** 2016; 10:36.

Davis JB ve Maher P. Protein kinase C activation inhibits glutamate-induced cytotoxicity

in a neuronal cell line. **Brain Research** 1994; 652: 169-173.

Ding Li, Li J, Li W, Fang Z, Li N, Wu S, Li J, Hong M. p53- and ROS-mediated AIF pathway involved in TGEV-induced apoptosis **J. Vet. Med. Sci.** 2018; 80(11): 1775–1781.

Diaz-Hernandez JI, Almeida A, Delgado-Esteban M, Fernandez E, Bolaños JP. Knockdown of glutamate-cysteine ligase by small hairpin RNA reveals that both catalytic and modulatory subunits are essential for the survival of primary neurons. **J Biol Chem.** 2005; 25;280(47):38992-9001.

Doble A. The Role of Excitotoxicity in Neurodegenerative Disease: Implications for Therap. **Pharmacol. Ther.** 1999; 81(3): 163–221.

Dong X, Wang Y, Qin ZH. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. **Acta Pharmacol Sin** 2009; 30 (4): 379–387.

Dzubay JA ve Jahr CE. The concentration of synaptically released glutamate outside of the climbing fiber-Purkinje cell synaptic cleft. **J. Neurosci.** 1999; 19: 5265–5274.

Egbenya GL, Aidoo E, Kyei G. Glutamate receptors in brain development. **Childs Nerv Syst** 2021; 37:2753–2758.

Elkholi R, Floros KV, Chipuk JE. The role of BH3-only proteins in tumor cell development, signaling, and treatment. **Genes Cancer** 2011; 2(5): 523-537.

Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicol Pathol.** 2007; 35(4): 495–516.

Ennes-Vidal V, Menna-Barreto RFS, Santos ALS, Branquinha MH, d'Avila-Levy CM. Effects of the calpain inhibitor MDL28170 on the clinically relevant forms of *Trypanosoma cruzi* in vitro. **J Antimicrob Chemother** 2010; 65: 1395–1398

Ezza HSA ve Khadrawy YA. Glutamate Excitotoxicity and Neurodegeneration. **J Mol Genet Med** 2014, 8:4

Flores-Sotoa, Chaparro-Huertaa V, Escoto-Delgadillo M, Guerrerod U, A. Caminse A, Beas-Zaratea C. Receptor to Glutamate Nmda-Type: The Functional Diversity of the Nr1 Isoforms and Pharmacological Properties of Nr2. **Current Pharmaceutical Design** 2013;19 (38):6709-19. doi: 10.2174/1381612811319380003.

Fossati S, Todd K, Sotolongo K, Ghiso J, Rostagno A. Differential contribution of isoaspartate post-translational modifications to the fibrillization and toxic properties of amyloid β and the Asn23 Iowa mutation. **Biochem J.** 2013; 456(3): 347–360.

Fossatia S, Giannonia P, Solesioa ME, Cocklina SL, Cabreraa E, Ghisoa J, Rostagno A. The carbonic anhydrase inhibitor methazolamide prevents amyloid beta-induced mitochondrial dysfunction and caspase activation protecting neuronal and glial cells in vitro and in the mouse brain. **Neurobiol Dis.** 2016; 86: 29–40.

Franco R ve Vargas MR. Redox Biology in Neurological Function, Dysfunction, and Aging. **Antioxid. Redox Signal.** 2018; 28: 1583–1586.

Franco R ve Cidlowski JA. Glutathione Efflux and Cell Death. ***Antioxid. Redox Signal*** 2012 17(12), 1694–1713.

Frerking M, Schmitz D, Zhou Q. Kainate receptors depress excitatory synaptic transmission at CA3→CA1 synapses in the hippocampus via a direct presynaptic action. ***J Neurosci*** 2001; 21: 2958–2966.

Fu M, Zhang W, Wu L, Yang G, Li H, Wang R. Hydrogen sulfide H₂S metabolism in mitochondria and its regulatory role in energy production. ***Proc Natl Acad Sci*** 2012; 109: 2943–2948.

Fukagawa NK, Ajami AM, Young VR. Plasma methionine and cysteine kinetics in response to an intravenous glutathione infusion in adult humans. ***Am. J. Physiol.*** 1996; 270: 209-214.

Fukui M, Song JH, Choi J, Choi HJ, Zhu BT. Mechanism of glutamate-induced neurotoxicity in HT22 mouse hippocampal cells. ***Eur J Pharmacol*** 2009; 617(1-3):1-11.

Fukui M, Choi HJ, Zhu BT. Rapid generation of mitochondrial superoxide induces mitochondrion-dependent but caspase-independent cell death in hippocampal neuronal cells that morphologically resembles necroptosis. ***Toxicol Appl Pharmacol*** 2012; 262(2):156-66.

Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. ***Cell Death Differ*** 2011; 19: 107–120.

Gan L, Cookson MR, Petrucelli L, Albert R, Spada AL. Converging pathways in neurodegeneration, from genetics to mechanisms. ***Nature Neuroscience***, 2018; 2: 1300–1309.

Gao SF ve Bao AM Corticotropin-releasing hormone, glutamate, and γ -aminobutyric acid in depression. ***Neuroscientist*** 2011; 17: 124–144.

Gaull G, Sturman JA, NCR Raiha. Development of mammalian sulfur metabolism: absence of cystathionase in human fetal tissues. ***Pediatr. Res.*** 1972; 6: 538–547.

Geiger JR, Melcher T, Koh DS. Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. ***Neuron*** 1995;15:193–204.

Ghatage DG, Gosavi SR, Ganvir SM, Hazarey VK. Apoptosis: Molecular mechanism ***Journal of Orofacial Sciences*** 2012; 4(2): 103-107.

Giguère N, Delignat-Lavaud B, Herborg F, Voisin A, Li Y, Jacquemet V. Increased vulnerability of nigral dopamine neurons after expansion of their axonal arborization size through D2 dopamine receptor conditional knockout. ***PLoS Genet.*** 2019; doi: 10.1371/journal.pgen.1008352

Goedert M, Eisenberg DS, Crowther RA. Propagation of tau aggregates and neurodegeneration. ***Annu. Rev. Neurosci*** 2017; 40: 189–210.

Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM ve Baradarn B. Molecular mechanisms of

apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2015; 16: 2129-2144.

Granzotto A, d'Aurora M, Bomba M, Gatta V, Onofri M, Sensi SL. Long-Term Dynamic Changes of NMDA Receptors Following an Excitotoxic Challenge *Cells* 2022; 11:911.

Gray WD and Rauh CE. The anticonvulsant action of the carbonic anhydrase inhibitor methazolamide: Possible involvement of a noradrenergic mechanism. *Eur. J. Pharmacol.* 1974; 28(1): 42-54.

Grings M, Moura AP, Parmeggiani B, Motta MM, Boldrini RM, August PM, Matté C, Wyse ATS, Moacir Wajner M, Leipnitz G. Higher susceptibility of cerebral cortex and striatum to sulfite neurotoxicity in sulfite oxidase-deficient rats *Biochimica et Biophysica Acta* 2016: 1862; 2063–2074.

Griscavage JM, Wilk S, Ignarro LJ. Serine and cysteine proteinase inhibitors prevent nitric oxide production by activated macrophages by interfering with transcription of the inducible NO synthase gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995; 215(2): 721-729.

Guang YL, Fan B, Ma TH. Visible light may directly induce nuclear DNA damage triggering the death pathway in RGC-5 cells. *Molecular Vision.* 2011; 17: 3279-3289

Haas M, Page S, Page, M., et al. Effect of proteasome inhibitors on monocytic I κ B- α and - β depletion, NF- κ B activation, and cytokine production. *J. Leukoc. Biol.* 1998; 63(3): 395-404.

Hangen E, Cordelieres FP, Petersen JD, Choquet D, Coussen F. Neuronal Activity and Intracellular Calcium Levels Regulate Intracellular Transport of Newly Synthesized AMPAR. *Cell Reports* 2018; 24: 1001–1012.

Hansen KB, Yi F, Perszyk R, Menniti FS, Traynelis SF. NMDA receptors in the central nervous system. *Methods Mol Biol.* 2017; 1677

Hansen KB, Yi F, Perszyk RE, Furukawa H, Wollmuth LP, Gibb AJ, Stephen F. Traynelis SF. Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors. *J. Gen. Physiol.* 2018;150 (8); 1081–1105.

He MC, Liu J, Cheng SW, Xing YG, Suo WZ. Differentiation renders susceptibility to excitotoxicity in HT22 neurons. *Neural Regen Res.* 2013;8(14):1297-1306.

Hecklau C, Pering S, Seibel R, Schnellbaecher A, Wehsling M, Eichhorn T, Hagen J, Zimmer A. S-Sulfocysteine simplifies fed-batch processes and increases the CHO specific productivity via anti-oxidant activity. *Journal of Biotechnology.* 2016; 218:53-63.

Herman MA ve Jahr CE. Extracellular glutamate concentration in hippocampal slice. *J. Neurosci.* 2007; 27: 9736–9741.

Hertz L, Dringen R, Schousboe A, Robinson S. Astrocytes: glutamate producers for neurons. *J. Neurosci. Res.* 1999; 57: 417–428.

Heuss C, Scanziani M, Gähwiler BH. G-protein independent signaling mediated by metabotropic glutamate receptors. *Nat Neurosci* 1999; 2:1070–1077.

Hill, C.A., and Fitch, R.H. Sex Differences in Mechanisms and Outcome of Neonatal Hypoxia-Ischemia in Rodent Models: Implications for Sex-Specific Neuroprotection in Clinical Neonatal Practice. ***Neurol Res Int*** 2012; 2012: 867531

Hisatomi T, Sakamoto T, Murata T, Yamanaka I, Oshima, Y, Hata Y, Ishibashi T, Inomata H, Susin SA, Kroemer G. Relocalization of Apoptosis-Inducing Factor in Photoreceptor Apoptosis Induced by Retinal Detachment in Vivo. ***Am J Pathol*** 2001; 158(4): 1271–1278.

Hollien J, Lin HJ, Li H, Stevens N, Walter P, Weissman JS. Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. ***The Journal of Cell Biology***, 2009; 186(3): 323-331.

Hu S, Yang L, Ma Y, Li L, Li Z, Wen X, Wu Z. Protection against H₂O₂-evoked toxicity in HT22 hippocampal neuronal cells by geissoschizine methyl ether via inhibiting ERK pathway. *Transl Neurosci*. 2022; 13(1): 369-378.

Igney FH Krammer PH. Death And Anti-Death: Tumour Resistance To Apoptosis. ***Nature Reviews | Cancer*** 2002; 2: 277-288.

Jantas D, Lorenc-Koci E, Kubera M, Lason W. Neuroprotective effects of MAPK/ERK1/2 and calpain inhibitors on lactacystin-induced cell damage in primary cortical neurons. ***Neurotoxicology*** 2011; 32(6): 845-56.

Jayakiran M. Apoptosis-Biochemistry: A Mini Review. ***J Clin Exp Pathol***, 2015; 5:1 DOI: 10.4172/2161-0681.1000205

Jiang X ve Wang X. Cytochrome C-Mediated Apoptosis Annual Review of Biochemistry. ***Annureview biochemistry*** 2004; 73: 87-106.

Johnson JL, Waud WR, Rajagopalan KV, Duran M, Beemert FA, Wadmant SK. Inborn errors of molybdenum metabolism: Combined deficiencies of sulfite oxidase and xanthine dehydrogenase in a patient lacking the molybdenum cofactor. ***Proc. Natl. Acad. Sci*** 1980; 77(6): 3715-3719.

Kanak DJ, Rose GM, Zaveri HP, Patrylo PR. Altered network timing in the CA3-CA1 circuit of hippocampal slices from aged mice. ***PLoS One*** 2013; doi: 10.1371/journal.pone.0061364

Kharatmal SB, Singh JN, Sharma SS. Calpain inhibitor, MDL 28170 confer electrophysiological, nociceptive and biochemical improvement in diabetic neuropathy, ***Neuropharmacology***. 2015;97:113-21.

Kimura H. Signaling Molecules: Hydrogen Sulfide and Polysulfide. ***Antioxid. Redox Signal***. 2015; 22: 362–376.

Kishikawa M, Sass JO, Sakura N, Nakanishi T, Shimizu A, Yoshioka M. The peak height ratio of S-sulfonated transthyretin and other oxidized isoforms as a marker for molybdenum cofactor deficiency, measured by electrospray ionization mass spectrometry ***Biochimica et Biophysica Acta*** 2002; 1588: 135-138.

Kisker C, Schindelin H, Pacheco A, Wehbi WA, Garrett RM, Rajagopalan KV et al. Molecular basis of sulfite oxidase deficiency from the structure of sulfite oxidase. ***Cell*** 1997; 91: 973–983.

- Klein JM, Schwarz G. Cofactor-dependent maturation of mammalian sulfite oxidase links two mitochondrial import pathways. *J Cell Sci* 2012; 125: 4876–4885.
- Kohl JB, Mellis AT, Schwarz G. Homeostatic impact of sulfite and hydrogen sulfide on cysteine catabolism. *British Journal of Pharmacology* 2019; 176: 554–570.
- Kritis AA, Stamoula EG, Paniskaki KA, Vavilis TD. Researching glutamate - induced cytotoxicity in different cell lines: a comparative/collective analysis/study. *Front Cell Neurosci* 2015;91. doi: 10.3389/fncel.2015.00091.
- Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death.. *Physiological Reviews* 2007; 87(1): 99-163.
- Krueger A, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S. FLICE-Inhibitory Proteins: Regulators of Death Receptor-Mediated Apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 2001; 21(24): 8247–8254.
- Kumar A, Dejanovic B, Florian Hetsch F, Semtner M, Fusca D, Arjune S, Santamaria-Araujo JA, Winkelmann A, Ayton S, Bush AI, Kloppenburg P, Meier JC, Schwarz Guenter, Belaidi AA. S-sulfocysteine/NMDA receptor-dependent signaling underlies neurodegeneration in molybdenum cofactor deficiency *J Clin Invest* 2017; 127(12): 4365-4378.
- Kumar A. NMDA Receptor Function During Senescence: Implication on Cognitive Performance. *Front. Neurosci* 2015; 9:473.
- Kvansakul M, Yang H, Fairlie WD, Czabotar PE, Fischer SE, Perugini MA, Huang, DCS, Colman PM. Vaccinia virus anti-apoptotic F1L is a novel Bcl-2-like domain-swapped dimer that binds a highly selective subset of BH3-containing death ligands. *Cell Death and Differentiation*, 2008; 15(10): 1564-1571.
- Lau A ve Tymianski M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 2010: 460:525–542.
- Leyen K, Siddiq A, Ratan RR, Lo EH. Proteasome inhibition protects HT22 neuronal cells from oxidative glutamate toxicity. *J Neurochem.* 2005; 92(4): 824–830.
- Li JH, Wang YH, Wolfe BB, Krueger KE, Corsi L, Gabriella Stocca G, Vicini S. Developmental changes in localization of NMDA receptorsubunits in primary cultures of cortical neurons. *European Journal of Neuroscience* 1998; 10: 1704–1715.
- Li M, Wang W, Mai H, Zhang X, Wang J, Gao Y, Wang Y, Deng G, Ling Gao L, Zhou S, Chen Q, Wang X. Methazolamide improves neurological behavior by inhibition of neuron apoptosis in subarachnoid hemorrhage mice. *Sci. Rep.* 2016; 6: 35055.
- Li WH, Yang YL, Cheng X, Liu M, Zhang SS, Wang YH, Du GH. Baicalein attenuates caspase-independent cells death via inhibiting PARP-1 activation and AIF nuclear translocation in cerebral ischemia/ reperfusion rats. *Springer Nature* 2020; 25:354–369.
- Liu J, Li L,Suo WZ. HT-22 hippocampal neuronal cell line possesses functional cholinergic properties. *Life Sciences*, 2009; 84(9-10): 267-271.
- Lomonosova E ve Chinnadurai G. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene* 2008 27(1), 2-19.
- Lopatniuk P ve Witkowski JM. Conventional calpains and programmed cell death. *Acta*

biochimica Polonica, 2011; 58(3).

Lorenzo HK ve Susin SA. Therapeutic potential of AIF-mediated caspase-independent programmed cell death. *Drug Resistance Updates* 2007; 10, 235–255.

Lucas DR, Newhouse P. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA Arch Ophthalmol* 1957; 58(2):193-201.

Lü CX, Fan TJ, Hu GB, Cong RS. Apoptosis-inducing factor and apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica* 2003; 35(10): 881-885.

Ma Y ve Hendershot LM. ER chaperone functions during normal and stress conditions. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 2004; 28(1): 51-65.

Mandal PK, Seiler A, Perisic T, Kölle P, Canak A, Förster H, Weiss N, Kremmer E, Lieberman MW, Bannai S, Kuhlencordt P, Sato H, Bornkamm GW, Conrad M. System xc- and thioredoxin reductase 1 cooperatively rescue glutathione deficiency. *J. Biol. Chem.* 2010; 285: 22244–22253.

Mani S, Yang G, Wang R. A critical life-supporting role for cystathionine γ -lyase in the absence of dietary cysteine supply. *Free Radic. Biol. Med.* 2011; 50: 1280–1287.

Mao XY, Zhou HH, Li X, Liu ZQ. Huperzine A Alleviates Oxidative Glutamate Toxicity in Hippocampal HT22 Cells via Activating BDNF/TrkB-Dependent PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway. *Cell Mol Neurobiol* 2016;36(6):915-925.

Marco C ve Coletta M. Production Of S-Sulfo-Cysteine And S-Sulfo-Cysteamine From Cystine And Cystamine, Coupled To Enzymic Transamination And Deamination Of Cysteinesulfinic Acid. *Biochim. Biophys. Acta* 1961; 47: 262-266.

Maren TH. Carbonic anhydrase: Chemistry, physiology, and inhibition. *Physiol. Rev.* 1967; 47(4): 595-781.

Mark LP, Prost RW, Ulmer JL, Smith MM, Daniels DL, Strottmann JM. Pictorial review of glutamate excitotoxicity: fundamental concepts for neuroimaging. *Am. J. Neuroradiol.* 2001; 22; 1813–1824.

Marutani E ve Ichinose F. Emerging pharmacological tools to control hydrogen sulfide signaling in critical illness. *Intensive Care Medicine Experimental* 2020; 8:5 <https://doi.org/10.1186/s40635-020-0296-4>

Masliah E, Hansen L, Albright T, Mallory M, Terry RD. Immunoelectron microscopic study of synaptic pathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 1991; 81: 428–433.

McBean GJ, Aslan M, Griffiths HR, Torrão RC. Thiol redox homeostasis in neurodegenerative disease. *Redox Biology* 2015; 5:186–194.

McRae M.P. Betaine supplementation decreases plasma homocysteine in healthy adult participants: A meta-analysis. *J. Chiropr. Med.* 2013; 12: 20–25.

Meister A ve Anderson ME. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 1983; 52: 711-760.

Mewett KN, Oakes DJ, Olverman HJ, Smith DA, Watkins JC. Pharmacology of the excitatory actions of sulphonic and sulphinic amino acids. *Adv Biochem*

Psychopharmacol 1983; 37: 163-74.

Miseta A ve Csutora P. Relationship Between the Occurrence of Cysteine in Proteins and the Complexity of Organisms. ***Mol. Biol. Evol.*** 2000; 17(8):1232–1239.

Misko AL, Liang Y, Kohl JB, Eichler F. Delineating the phenotypic spectrum of sulfite oxidase and molybdenum cofactor deficiency. ***Neurol Genet*** 2020; 6(4): doi:10.1212/NXG.0000000000000486

Moore W, Wiener HL, Meister A. Inactivation of Gamma- glutamylcysteine synthetase, but not of glutamine synthetase, by S-sulfocysteine and S-sulfohomocysteine. ***J Biol Chem*** 1987; 262: 16771–16777

Moreira AA, Gomes JI, Pina CC, Savchak OK, Ribeiro JG, Rei N, Pinto S, Morais TP, Martins RS, Ribeiro FF, Sebastião AM, Crunelli V, Vaz SH. Going the Extra (Synaptic) Mile: Excitotoxicity as the Road Toward Neurodegenerative Diseases ***Front. Neurosci*** 2020; 14:90.

Morimoto BH ve Koshland DE. Induction and Expression of long- and Short-Term Neurosecretory Potentiation in a Neural Cell line. ***Neuron*** 1990; 5: 875-880.

Mosharov E. Cranford MR. Banerjee R. The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by the transsulfuration pathway and its regulation by redox changes. ***Biochemistry*** 2000; 39; 13005–13011.

Muddapu VR, Dharshini AP, Chakravarthy, S, Gromiha M. Neurodegenerative Diseases – Is Metabolic Deficiency the Root Cause? ***Front. Neurosci*** 2020; doi: 10.3389/fnins.2020.00213

Noh HS, Hah YS, Nilufar R, Han J, Bong JH, Kang SS, Cho GJ, Choi WS. Acetoacetate protects neuronal cells from oxidative glutamate toxicity. ***J Neurosci Res.*** 2006;83(4):702-9.

Nunez MT ve Hidalgo C. Noxious Iron-Calcium Connections in Neurodegeneration. ***Front. Neurosci*** 2019; 13:48.

Obeng E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. ***Brazilian Journal of Biology***, 2021; 81: 1133-1143.

Oliveiral MR, Duarte AR, Chenet AL, Almeida AJ, Andrade CL. Carnosic Acid Pretreatment Attenuates Mitochondrial Dysfunction in SH-SY5Y Cells in an Experimental Model of Glutamate-Induced Excitotoxicity. ***Neurotox Res*** 2019; 36: 551–562.

Olloquequi J, Cornejo-Córdova E, Verdaguer E, Sorian FX, Binvignat O, Auladell C, Camins A. Excitotoxicity in the pathogenesis of neurological and psychiatric disorders: Therapeutic implications. ***Journal of Psychopharmacology*** 2018; 32(3): 265-275.

Olney JW, Excitotoxic Amino Acids and Neuropsychiatric Disorders. ***Annu Rew Pharmacol Toxicology*** 1990; 30: 47-71.

Olney JW. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. ***AAAS.*** 1969; 164:719-721.

Olney JW, Ho OL, Rhee V. Cytotoxic effects of acidic and sulphur containing amino acids on the infant mouse central nervous system. ***Exp Brain Res*** 1971;14(1):61-76.

Olney JW, Misra CH, Gubareff. Cysteine-S-sulfate: brain damaging metabolite in sulfite oxidase deficiency. *J Neuropathol Exp Neurol* 1975; 34(2): 167-77.

Olney JW, McGeer EG, McGeer PL. Neurotoxicity of excitatory amino acids. In: Kainic Acid as a Tool in Neurobiology *Raven Press* 1978; 95-112.

Ossenkoppele, R. et al. Tau PET patterns mirror clinical and neuroanatomical variability in Alzheimer's disease. *Brain* 2016; 139, 1551–1567.

Pacelli C, Giguère N, Bourque MJ, Lévesque M, Slack RS, Trudeau LE. Elevated mitochondrial bioenergetics and axonal arborization size are key contributors to the vulnerability of dopamine neurons. *Curr. Biol.* 2015; 25: 2349–2360.

Paul BD Snyder, SH. H₂S signalling through protein sulfhydration and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2015; 13: 499–507.

Paul BD, Sbdio JI, Snyder SH. Cysteine Metabolism in Neuronal Redox Homeostasis. *Pharmacol Scie* 2018; 39(5): 513-524.

Paul BD, Sbdio JI, Xu R, Vandiver MS, Cha JY, Snowman AM. et al. Cystathionine γ -lyase deficiency mediates neurodegeneration in Huntington's disease. *Nature.* 2014; 509: 96–100.

Paulsen CE ve Carroll KS. Cysteine-Mediated Redox Signaling: Chemistry, Biology, and Tools for Discovery. *Chem. Rev.* 2013; 113: 4633–4679.

Phan CW, David P, Therapeutic potential of culinary- medicinal mushrooms for the management of neurodegenerative diseases: diversity, metabolite and mechanism. *Critical Reviews in Biotechnology* 2014; 35: 355-368.

Puskarjov M, Ahmad F, Kaila K, Blaesse P. Activity-Dependent Cleavage of the K-Cl Cotransporter KCC2 Mediated by Calcium-Activated Protease Calpain. *The Journal of Neuroscience*, 2012; 32(33): 11356–11364.

Puthalakath H, O'reilly LA, Gunn P, Lee, L, Kelly PN. Huntington PD, Hughes, ND, Michalak EM, Mckimm-Breschkin J, Motoyama N, Gotoh T, Akira S, Bouillet, P, Strasser A. ER stress triggers apoptosis by activating BH₃-only protein *Bim. Cell* 2007; 129(7): 1291337-1291349.

Qu K, Chen CPLH, Halliwell B, Moore PK, Wong PT-H. Hydrogen sulfide is a mediator of cerebral ischemic damage. *Stroke.* 2006; 37:889–893.

Radi R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *PNAS* 2018; 115: 5839–5848.

Rehman T, Shabbir MA, Inam-Ur-Raheem M, Manzoor MF, Ahmad N, Liu ZW, Ahmad MH, Siddeeg A, Abid M, Aadil RM. Cysteine and homocysteine as biomarker of various diseases. *Food Sci Nutr.* 2020; 8:4696–4707.

Reid M ve Jahoor F. Methods for measuring glutathione concentration and rate of synthesis. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 2000; 3 (5): 385-390.

Reiss J, Molybdenum Cofactor and Sulfite Oxidase Deficiency. *Metabolomics* 2016;

6(4): DOI: 10.4172/2153-0769.1000184

Requejo R, Hurd TR, Costa NJ, Murphy MP. Cysteine residues exposed on protein surfaces are the dominant intramitochondrial thiol and may protect against oxidative damage. *FEBS J* 2010; 277:1465–1480.

Rivero-Seguraa NA, Coronado-Maresa MI, Rincón-Herediac R, Pérez-Torresd I, Montiel T, Pavóne N, Cabrera-Reyesa EA, Massieub L, Cerbón M. Prolactin prevents mitochondrial dysfunction induced by glutamate excitotoxicity in hippocampal neurons. *Neurosci. Lett* 2019; 701: 58–64.

Ron D ve Hubbard SR. How IRE1 reacts to ER stress. *Cell* 2008; 132(1): 24-26.

Rose P, Moore PK, Zhu YZ. H₂S biosynthesis and catabolism: new insights from molecular studies. *Cell Mol Life Sci* 2017; 74: 1391–1412.

Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, Van Gorp M, Van Loo G, Vandenabeele P. 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 2004; 23(16) 2861-74.

Salih MA, Bosley TM, Alorainy IA, Sabry MA, Rashed MS, Al-Yamani EA, El-Akoum S, Mohamed SH, Abu-Amero KK, Hellani AM. Preimplantation Genetic Diagnosis in Isolated Sulfite Oxidase Deficiency. *Can J Neurol Sci.* 2013; 40: 109-112.

Salinska E, Danysz W, W.Łazarewicz J. The role of excitotoxicity in neurodegeneration. *Folia Neuropathol* 2005; 43 (4): 322-339.

Sasaki T, Kishi M, Saito M, Tanaka T, Higuchi N, Kominami E, Katunuma N, Murachi T. Inhibitory effect of di- and tripeptidyl aldehydes on calpains and cathepsins. *J. Enzyme Inhib.* 1990; 3(3): 195-201.

Sattler R ve Tymianski M. Molecular of Glutamate Receptor-Mediated Excitotoxic Cell Death. *Mol Neurobiol* 2001; 98/24 (1–3): 107–129.

Sattler R, Tymianski M. Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med* 2000; 78:3–13.

Sbodio JI, Snyder SH, Paul BD. Regulators of the transsulfuration pathway. *Br J Pharmacol* 2019; 176: 583–593.

Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 2001; 30:1191–1212.

Schuler M ve Green DR. Mechanisms of p53- dependent apoptosis. *Biochemical Society Transactions.* 2001; 29(6): 684-688.

Schwarz G, Mendel RR, Ribbe MW. Molybdenum cofactors, enzymes and pathways. *Nature* 2009; 460: 839–847.

Schwarz G. Molybdenum cofactor and human disease. *Current Opinion in Chemical Biology* 2016; 31:179–187.

Schwarz G, Belaidi AA. Molybdenum in human health and disease. *Met Ions Life Sci.* 2013;13:415-50. doi: 10.1007/978-94-007-7500-8_13.

Setién-Suero E, Suárez-Pinilla M, Suárez-Pinilla P, Crespo-Facorro B, Ayesa-Arriola, R. Homocysteine and cognition: A systematic review of 111 studies. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2016; 69: 280–298.

Sharma M, Tiwari M, Tiwari RK. Hyperhomocysteinemia: Impact on Neurodegenerative Diseases. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2015; 117: 287–296.

Shall G, Menosky M, Decker S, Nethala P, Welchko R, Leveque X, Lu M, Sandstrom M, Hochgeschwender U, Rossignol J, Dunbar G. Effects of Passage Number and Differentiation Protocol on the Generation of Dopaminergic Neurons from Rat Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells, *Int J Mol Sci* 2018;19(3):720. doi: 10.3390/ijms19030720.

Sabirzhanov B, Stoica BA, Hanscom M, Piao CS, Faden A. Over-expression of HSP70 attenuates caspase-dependent and caspase-independent pathways and inhibits neuronal apoptosis. *J Neurochem.* 2012;123(4):542-54.

Shlyakhtina Y, Pavet V, Gronemeyer H. Dual role of DR5 in death and survival signaling leads to TRAIL resistance in cancer cells. *Cell Death & Disease* 2017; 8 <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2017.423>.

Sigel A, Sigel H, Sigel RKO. Interrelations between Essential Metal Ions and Human Diseases. *Springer Dordrecht Heidelberg*, New York, London, 2013; 573.

Sjoerd JL, Hageman GJ. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 mediated caspase-independent cell death after ischemia/reperfusion. *Free Radical Biology & Medicine Science Direct.* 2005; 39: 81 – 90.

Smitha AD, Refsumb H, Bottiglieric T, Fenechd M, Hooshmande B, McCaddonf A, Millerg JW, Rosenbergh IH, Obeidi R Homocysteine and Dementia: An International Consensus Statement. *J Alzheimers Dis* 2018; 62: 561-570.

Soleimani SMA, Ekhtiari H, Cadet JL. Drug-induced neurotoxicity in addiction medicine: From prevention to harm reduction. *Prog Brain Res.* 2016; 223: 19-41.

Soria FN, Zabala A, Pampliega O, Palomino A, Miguelez C, Ugedo L, Sato H, Matute C, Domercq M. Cystine/glutamate antiporter blockage induces myelin degeneration". *Glia*, 2016; 64: 1381–1395.

Spiegel R, Schwahn BC, Squires L, Confer N. Molybdenum cofactor deficiency: A natural history. *J Inherit Metab Dis.* 2022; 45: 456–469.

Spires-Jones TL ve Hyman BT. The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease. *Neuron* 2014; 82: 756–771.

Steebhorn C, Clausen T, Sondermann P, Jacob U, Worbs M, Marinkovic S. et al. Kinetics and inhibition of recombinant human cystathionine γ -lyase. Toward the rational control of transsulfuration. *J Biol Chem* 1999; 274: 12675–12684.

Stipanuk MH. Metabolism of Sulfur-Containing Amino Acids: How the Body Copes with Excess Methionine, Cysteine, and Sulfide. *The Journal of Nutrition* 2020; doi:

<https://doi.org/10.1093/jn/nxaa094>.

Su B, Wang X, Zheng L, Perry G, Smith MA, Zhu X. Abnormal mitochondrial dynamics and neurodegenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2010; 1802:135–142.

Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Costantini P, Ferri KF, Irinopoulou T, Prevost MC, Brothers G, Mak TW, Penninger J, Earnshaw WC, Kroemer G. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* 2000; 192: 571–580.

Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hxrsch T, Marchetti P, Macho, Daugas E, Geuskens M, Kroemer G. Bcl-2 Inhibits the Mitochondrial Release of an Apoptogenic Protease. *J Exp Med.* 1996;184:1331-1341.

Szabo C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2007; 6: 917–935.

Tiranti V, Viscomi C, Hildebrandt T, Meo IV, Mineri R, Tiveron C, Levitt MD, Prella A, Fagiolari G, Rimoldi M, Zeviani M. Loss of ETHE1, a mitochondrial dioxygenase, causes fatal sulfide toxicity in ethylmalonic encephalopathy. *Nat Med* 2009;15: 200–205.

Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KP, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R. Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacol Rev* 2010; 62:405–496.

Tobaben S, Grohm J, Seiler A, Conrad M, Plesnila N, Culmsee C. Bid-mediated mitochondrial damage is a key mechanism in glutamate-induced oxidative stress and AIF-dependent cell death in immortalized HT-22 hippocampal neurons. *Cell Death Differ* . 2011;18(2):282-292.

Tonsomboon A, Prasanth MI, Plaingam W, Tencomnao T. Kaempferia parviflora Rhizome Extract Inhibits Glutamate-Induced Toxicity in HT-22 Mouse Hippocampal Neuronal Cells and Extends Longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Biology (Basel)* 2021;10(4):264. doi: 10.3390/biology10040264.

Tutuncu B, Kuçukatay V, Arslan S, Sahin B, Semiz A, Sen A. Alteration of drug metabolizing enzymes in sulphite oxidase deficiency. *J. Clin. Biochem. Nutr.* July 2012; 51(1): 50–54.

Rodriguez-Chavez V, Moran J, Molina-Salinas G, Zepeda Ruiz WA, Rodriguez MC, Picazo O, Cerbon M. Participation of Glutamatergic Ionotropic Receptors in Excitotoxicity: The Neuroprotective Role of Prolactin. *Neuroscience* 2021; 461:180–193.

Valverde M, Rojas E, Kala SV, Kala G, Lieberman MW. Survival and cell death in cells constitutively unable to synthesize glutathione. *Mutat Res* 2006; 594: 172–180.

Verhoef P, Vliet T, Oltho MR, Katan MB. A high-protein diet increases postprandial but not fasting plasma total homocysteine concentrations: a dietary controlled, crossover trial in healthy volunteers. *Am J Clin Nutr* 2005; 82: 553–8.

Verma M, Lizama BN, Charleen T, Chu CT. Excitotoxicity, calcium and mitochondria: a triad in synaptic neurodegeneration. *Translational Neurodegeneration.* 2022; 11:3

Vincent AS, Lim BG, Tan J, Whiteman M, Cheung NS, Halliwell B, Wong KP. Sulfite-mediated oxidative stress in kidney cells. *Kidney International* 2004; 65: 393–402.

Vitvitsky V, Garg SK, Banerjee R. Taurine biosynthesis by neurons and astrocytes. *J Biol Chem.* 2011; 286: 32002–32010.

Wajant H. 2002. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 2002; 296: 5573,1635-1636.

Wang H ve Peng RY. Basic roles of key molecules connected with NMDAR signaling pathway on regulating learning and memory and synaptic plasticity. *Military Medical Research* 2016; 3:26.

Wang J ve Swanson RA. Superoxide and Non-ionotropic Signaling in Neuronal Excitotoxicity. *Front. Neurosci.* 2020; 14:861.

Wang KKW, Nath R, Posner A, Raser KJ, Buroker-Kilgore M, et. al. An alpha-mercaptoacrylic acid derivative is a selective nonpeptide cell-permeable calpain inhibitor and is neuroprotectiv *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996; 93: 6687-6692.

Wang M, Zhang L, Han X, Yang J, Qian J, Hong S, Samaniego F, Romaguera J, Yi Q. Atiprimod inhibits the growth of mantle cell lymphoma in vitro and in vivo and induces apoptosis via activating the mitochondrial pathways. *Blood* 2007; 109 (12): 5455-5462.

Wang X, Figueroa BE, Stavrovskaya IG, Zhang Y, Sirianni AC, Zhu S, Day AL, Kristal BS, Friedlander RM. Methazolamide and Melatonin Inhibit Mitochondrial Cytochrome C Release and Are Neuroprotective in Experimental Models of Ischemic Injury. *Stroke.* 2009; 40(5): 1877–1885.

Wang X, Pal R, Chen X, Limpeanchob N, Kumar KN, Michaelis EK. High intrinsic oxidative stress may underlie selective vulnerability of the hippocampal CA1 region. *Mol. Brain Res.* 2005; 140: 120–126.

Wang X, Zhu S, Pei Z, Drozda M, Stavrovskaya IG, Del Signore SJ, Cormier K, Shimony EM, Wang H, Ferrante RJ, Kristal BS, Friedlander RM. Inhibitors of Cytochrome c Release with Therapeutic Potential for Huntington's *Disease. J. Neurosci.* 2008; 28(38): 9473–9485.

Werge MP, McCann A, Galsgaard ED, Holst D, Bugge A, Albrechtse NW, Gluud LL. The Role of the Transsulfuration Pathway in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *J. Clin. Med.* 2021; 10: 1081. <https://doi.org/10.3390/jcm10051081>

Wernerman J ve Hammarqvist F. Modulation of endogenous glutathione availability. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 1999; 2 (6): 487-492.

Wolf BB, Goldstein JC, Stennicke HR, Beere H, Amarante-Mendes GP, Salvesen GS, Green DR. Calpain Functions in a Caspase-Independent Manner to Promote Apoptosis-Like Events During Platelet Activation. *Blood*, 1999; 94(5): 1683-1692.

Wyse ATS, Grings M, Wajner M, Leipnitz G. The Role of Oxidative Stress and Bioenergetic Dysfunction in Sulfite Oxidase Deficiency: Insights from Animal Models. *Neurotoxicity Research* 2019; 35:484–494.

Xu X, Lai Y, Hua ZC. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience Reports*, 2019; 18: 39(1)

Yagdia E, Cerellaa C, Dicatoa M, Diederichb M. Garlic-derived natural polysulfanes as hydrogen sulfide donors: friend or foe? **Food and Chemical Toxicology** 2016; doi: 10.1016/j.fct.2016.07.016.

Yoshikawa Y, Hagihara H, Ohga Y, Nakajima-Takenaka C, Murata K, Taniguchi S, Takaki M. Calpain inhibitor-1 protects the rat heart from ischemia-reperfusion injury: analysis by mechanical work and energetics. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 2005; 288: 1690–1698.

Yu SW, Wang H, Dawson TM, Dawsona VL. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 and apoptosis inducing factor in neurotoxicity **Neurobiology of Disease** 2003; 14: 303–317.

Zhang X, Chen J, Steven H. Graham SH, Du L, Patrick M. Kochanek PM, Draviam R, Guo F, Nathaniel PD, Szabo C, Watkins SC, Clark RS. Intranuclear localization of apoptosis-inducing factor (AIF) and large scale DNA fragmentation after traumatic brain injury in rats and in neuronal cultures exposed to peroxynitrite. **Journal of Neurochemistry** 2002; 82; 181–191.

Zhang X, Vincent AS, Halliwell B, Wong KP. A Mechanism of Sulfite Neurotoxicity. **The Journal Of Biological Chemistry** 2004; 279(41): 43035- 43045.

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

Zhou Y, Danbolt NC. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. **J Neural Transm** 2014; 121: 799–817.

8. ÖZGEÇMİŞ

EKLER

In vivo experimental models of schizophrenia: mechanisms, features, advantages, disadvantages

Zeynep Mine Altunay¹ , Aysel Alphan² , Esat Adıgüzel^{2,3} 

¹Department of Neuroscience, School of Medicine, University of Connecticut, Farmington, CT, USA

²Department of Neuroscience, Institute of Health Sciences, Pamukkale University, Denizli, Türkiye

³Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Pamukkale University, Denizli, Türkiye

Abstract

The experimental models of human diseases are indispensable research methods which are undesirable to be tested on humans. It is inevitable for researchers who continue their careers in the field of anatomy to be aware of these methods. Here, experimental schizophrenia models that can be used to reveal brain functions and also pathophysiology of schizophrenia are discussed. It is aimed to give general information about the features of the experimental schizophrenia models that can be used by researchers in morphological sciences; therein the references should be considered for the setup of the experimental schizophrenia models. In this review, *in vivo* and *in vitro* models of schizophrenia used on etiopathogenesis, pathophysiology, drug discovery and behavioral analysis are represented. And also we briefly indicate the molecular mechanisms of the experimental models that mimic schizophrenia-like symptoms and its behavioral outputs.

Keywords: animal models; experimental models; mental disorders; schizophrenia

Anatomy 2022;16(2):114–123 ©2022 Turkish Society of Anatomy and Clinical Anatomy (TSACA)

Introduction

Morphological sciences have been mostly concerned with describing the structural features of organisms. As research techniques have been developed today, the scope of research in anatomy, which is one of the main branches of morphology, has also expanded. The experimental animal models developed based on evolutionary relationship of the human and other species have begun to be used in research to understand function of organism and pathology of illness. *In vivo* and *in vitro* experimental models are indispensable way for applying methods that are undesirable to be tested on humans. To be aware of these methods is inevitable for researchers who continue their careers in the field of anatomy. Here, experimental schizophrenia models that can be used to reveal brain functions and pathophysiology of the illness are discussed. It is aimed to give general information about the features of the experimental models; therein the references should be considered for the setup of the experimental schizophrenia models.

In this review, we represent the *in vivo* and *in vitro* models of schizophrenia for researches on etiopathogenesis, pathophysiology, drug discovery and behavioral analysis. In addition, we briefly indicate the molecular mechanisms of the experimental models that mimic schizophrenia-like symptoms and its behavioral outputs.

In Vivo Models of Schizophrenia (General Characteristics of Schizophrenia)

Schizophrenia is a serious and complex mental illness that has neurodevelopmental origin. It affects approximately 1% of the general population and is thought to result from interplay between genetic and environmental factors. It is unclear that how these risk factors collectively contribute to pathology. As multiple etiological factors contribute to the schizophrenia spectrum, altered symptomatology can be observed as the condition progresses. Symptoms of schizophrenia is classified primarily into three: positive, negative, and cognitive symptoms.^[1–3] Positive symptoms (hallucinations, delusions, disorganized thought processes, disorganized or catatonic behavior, etc.) have an acute

onset, respond to antipsychotics and are composed of biochemical dysregulations.¹⁸ Negative symptoms (affective flattening, alogia, apathy, anhedonia and asociality, attention disorders, etc.) respond to antipsychotics weakly, can be seen in combination with cognitive and behavioral disorders which also contain abnormal involuntary movements.^{19,41} Cognitive symptoms (attention disorders, memory deficits, executive functioning, etc.) respond poorly to drugs and have negative effects on illness processes, quality of daily life.^{11,51}

Although the pathophysiology of schizophrenia is not identified completely, it is well recognized that it has a complex structure. As a result, rather than relying on a single approach to explain schizophrenia, a combination of different approaches such as chemical, environmental, genetic, and structural components may be more helpful in understanding schizophrenia's pathogenesis.^{15,61}

Alterations in neurotransmitters are one of the most important aspects of schizophrenia pathophysiology.^{7,81} Reduced plasma dopamine metabolites are a sign of dopaminergic dysregulation in patients with a poor prognosis and social impairments. Higher dopamine metabolites, on the other hand, are detected mostly in patients with positive symptoms.⁹¹ Glutamatergic hypofunction,¹⁰¹ serotonergic dysregulation (as 5-HT1A receptor overexpression),¹¹¹ and changes in prefrontal cortex gamma-aminobutyric acid (GABA) neurotransmission (such as GABA-A receptor upregulation) have all been reported in the neurotransmitter researches.¹²¹

The researches on the brains of schizophrenic subjects are focused mainly on temporal cortex, frontal cortex, striatum, thalamus, hippocampus.¹³⁻¹⁵¹ In these researches, decrease in temporal cortex, hippocampus, amygdala and parietal cortex volume are reported.

Genetic predisposition, because of the strong link with schizophrenia etiology, is a crucial issue for most of the researches.¹⁶¹ DISC1,¹⁷¹ and dystrobrevin binding protein 1 (DTNBP1), dysbindin,¹⁸¹ NRG1, ErbB4,¹⁹¹ GAD, BDNF^{20,211} are some of the mostly studied genes in the schizophrenia researches. Furthermore, environmental factors that include physiological, pharmacologic and psychological events have an influence on schizophrenia etiology.²²¹

In present review, we provide a brief overview of five animal models of schizophrenia. Also, we summarized common pathways involved in schizophrenia-like brain and behavioral abnormalities, which are specific to the animal model of interest.

At least twenty animal models of schizophrenia have been using in researches, and new ones are created in line

with purposes of the researches. In this review, we focused on prevalently used animal models:

- pharmacologic animal models,
- lesion animal models,
- neurodevelopmental animal models,
- genetic-epigenetic animal models,
- combinations of animal models

Pharmacologic Animal Models

In 1950's first animal model of schizophrenia was developed in the basis of amphetamine. Psychosis that stimulated with amphetamine is used to mimic positive symptoms.²³¹ Pharmacologic animal models are based on the dysregulations in neurotransmitters. However, these models have constructive validity, they maintain limited information about cognition and thought processes.²⁴⁻²⁸¹

Serotonergic approach: Serotonergic (5-HT) neurotransmission is reported as an important issue for schizophrenia: Indolamines' (LSD: lyseric acid diethylamide) and phenethylamines' (mescaline), two main hallucinogenic drugs, effect mechanisms are mentioned to be mediated by 5-HT2A receptors.²⁸¹ On the other hand decrease in 5-HT2A receptor and increase in 5-HT1A receptor in the prefrontal cortex²⁹¹ are reported, and also the neuroendocrine respond to 5-HT2A receptor agonists is found to be weaker in schizophrenic individuals than healthy subjects.³⁰¹ In dopaminergic and glutamatergic animal models and also in human subjects, LSD-mechanism on startle habituation and pre-pulse inhibition (PPI) are shown to act directly via 5-HT2A receptor stimulation.³¹¹ Similarly phencyclidine (PCP) acts via indirect activation of 5-HT2A receptors and impairs PPI.³²¹ 5-HT5A receptor antagonist ASP5736's (N-(diaminomethylene)-1-(3,5-difluoropyridin-4-yl)-4-fluoroisoquinoline-7-carboxamide (2E)-but-2-enedioate) therapeutic effects on positive and cognitive symptoms of schizophrenic individuals are mentioned as a validity for serotonergic approach.³³¹

Dopaminergic approach: In dopaminergic approach, it is assumed that dysregulation in dopamine (DA) neurotransmission leads to the manifestation of the disorder. Positive symptoms are proposed to be thrived as a consequence of hyperactivity in mesolimbic dopaminergic neurons.³⁴¹ On the other hand, hypo-dopaminergic processes in fronto-cortical areas are proposed to lead negative symptoms.³⁵¹

Locomotor hyperactivity and stereotypic behaviors can be induced after a single amphetamine administration in the animal models. Repeated amphetamine administration may cause impairment in locomotor activity and hyperac-

tivation in striatum dopaminergic neurotransmission, however alterations in social interaction may not observed in this animal model of schizophrenia. As a conclusion it is claimed that DA based animal models have limited constructive validity.^[25,27]

Glutamatergic approach: Despite the amphetamine model, through the glutamatergic approach cognitive deficits, negative and positive symptoms, can be mimicked in the same animal model.^[24-31] N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) inhibitors like PCP, dizocilpine and ketamine are reported to induce schizophrenia like symptoms (hallucination, delusion, etc.) in healthy subjects.^[28,29,31,32] Especially PCP is mentioned as an effective inducer of positive symptoms together with its influence on negative and cognitive symptoms.^[28,31] PCP treatment to animals can mimic several behavioral and neurochemical abnormalities reported in schizophrenic patients, including hyperlocomotion, impairments in pre-pulse inhibition,^[41] social interaction, working memory, and cognition.^[35,36] Chronic PCP administration has been linked to a decrease in social contact. The acute treatment of haloperidol and clozapine are reported to reverse social interaction in the same study. As a result of those findings researchers concluded that this model mimics social withdrawal which is a negative symptom of schizophrenia.^[31,39] The effects of PCP on gene expression in the brain are explored, and the expression levels of 146 genes (associated with apoptosis, neurological disorders, and schizophrenia-related genes) are found to be altered. Analyzing the signalization pathways reveal an increase in calcium signaling and long-term synaptic potentiation. These findings also support the use of PCP injection as a schizophrenia animal model.^[37]

GABAergic approach: In prefrontal cortex γ -aminobutyric acid (GABA) neurons receive synaptic inputs from dopaminergic terminals, on the other hand they have inhibitory control over excitatory outputs of the pyramidal neurons, and also they have regulatory effects on developmental alterations that are seen in late adolescence. This mechanism makes GABAergic, dopaminergic and glutamatergic interactions a considerable issue in schizophrenia researches.^[40,44]

Increase in GABA-A receptor expression^[45] and decrease in glutamic acid decarboxylase 67 (GAD67) expression in prefrontal cortex^[46] reflect GABAergic alterations that consist in pathophysiology of schizophrenia. After a decrease in calcium flux as a result of NMDAR hypofunction, GAD67 downregulation has been reported as a result of interneurons' response to NMDAR antagonism.^[47] The decrease in PPI after injection of the GABA-A receptor antagonist picrotoxin to the rat medial pre-

frontal cortex^[48] and the decrease in parvalbumin-containing GABAergic interneurons after prenatal MAM injection^[49] have both been demonstrated in animal studies.

Risk factors like early life stress and trauma are shown to increase psychosis risk and accomplish subjects more vulnerable to hippocampal hyperactivity in their late life by impairing developing GABAergic neurons.^[50] Hippocampal hyperactivity is associated with cognitive dysfunction^[51] and impairment in perceived reality.^[52] In schizophrenic individuals hippocampal hyperactivity level^[52] or glutamatergic dysregulation leads to decrease in hippocampal volume which is used to mimic hippocampal dysfunction in developmental animal models of schizophrenia.^[51]

Lesion Animal Models

Because of the prefrontal cortex's executive functions in attention, working memory, social interaction and emotional processes, prefrontal cortical lesions are widely used in schizophrenia researches.^[53] Behavioral experiments support the prefrontal cortex's regulatory role on subcortical DA activity.^[34] Increase in amphetamine induced stereotypic behavior and continuous hyperexcitability with stress exposure are reported after prefrontal cortex lesion in adult rats.^[55]

Hippocampal formation plays a key function in prefrontal cortex modulation and has direct control over the dopaminergic system.^[54] Because of these features, lesions of hippocampal formation are used in researches: Excitotoxic lesions of dorsal and ventral hippocampus are found to stimulate different behavioral profiles. Lesions of dorsal hippocampus are not found to be effective in amphetamine induced locomotor activity.^[57] However by kainic acid administration, neural loss is reported in dorsal hippocampus, and this model is proposed as a neurodegenerative animal model of schizophrenia.^[58] On the other hand, lesions of ventral hippocampus by DA agonists are found to stimulate locomotor activity.^[57]

Because of its importance in filtering sensory information, the thalamus is being addressed in researches. Abnormalities in corticothalamic limbic system are proposed as a useful target for studying sensorimotor deficits.^[59] To sum up, although lesion models have face and predictive validity, dimensions of lesions and adult nature have limiting impacts on construct validity.

Lesions of ventral hippocampus are developed to mimic pathological conditions including ventricular enlargement and hippocampal atrophy. Abnormal behaviors after adolescence are reported to be induced by excitatory toxin ibotenic acid microinjection as a neonatal

lesion of ventral hippocampus. This model is shown to be resulted in behavioral alterations in different developmental stages: Spatial and working memory deficits are reported on postnatal day 25, however increase in social withdrawal and aggression are seen on postnatal day 35. Increase in sensitivity to dopaminergic and glutamatergic agonists, impairments in PPI and reward mechanisms and increase in drug sensitivity are reported around postnatal day 56.^[13]

Neurodevelopmental Animal Models

Weinberger (1986) was the first to propose the neurodevelopmental hypothesis, stating that brain developmental defects that occur early in life increase the chance of clinical symptoms later in life.^[14] Neurodevelopmental animal models consist of prenatal exploration to environmental risk factors or toxic compounds. Based on schizophrenia epidemiology neurodevelopmental animal models of schizophrenia have construct and face validity.^[15,60]

There are several methods that are used to induce inflammation: polyribonucleic-polyriboctidylc acid [poly(I:C)],^[61] methylazoxymethanol acetate (MAM)^[62] and bacterial endotoxin lipopolysaccharide (LPS).^[63,64] On the other hand multiple environmental stressors can be used alone or together to induce molecular processes related with schizophrenia: Social isolation,^[65] maternal separation,^[66] water stress.^[67]

Usage of two different stress factors in different developmental stages are proposed to be more effective to mimic schizophrenia spectrum, which is also called two-hit animal model of schizophrenia.^[67] Prenatal LPS administration with juvenile stress or prenatal poly(I:C) with neonatal LPS.

Polyribonucleic-polyriboctidylc acids [poly(I:C)]: Multiple proinflammatory cytokines are released through the binding of poly(I:C) to its receptor, toll-like receptor (TLR) 3.^[68] This viral compound has several influences on rodents: After its prenatal administration pups are reported to have increased locomotor sensitivity to psychostimulants, impaired pre-pulse inhibition and new object recognition, social withdrawal in their late life (in their adolescence or young adulthood). However, spatial memory impairments are not reported in researches.^[61,69,70] Together with those behavioral abnormalities neurochemical alterations like decrease in DA and glutamate levels in prefrontal cortex and hippocampus are shown.^[71] Increase in striatal and accumbal D1 and D2 receptors' function, increase in D2 receptor function in frontal cortex, decrease in DA and increase in tyrosine hydroxylase in striatum are demonstrated.^[72]

Bacterial endotoxin lipopolysaccharide (LPS): Bacterial endotoxin LPS has its action through TLR4 receptors on macrophages and other immune cells. After binding to its receptor, it triggers several signal transduction cascades like release of proinflammatory cytokines, activation of transcription factors (like kappaB) and anti-inflammatory modulators (cytokines, proteins, etc.).^[73]

Multiple behavioral deficits are also reported as a consequence of LPS administration: increase in locomotor activity, decrease in sociality, impairment in PPI and memory, anxiety like behaviors.^[68]

It is demonstrated that LPS administration leads to dysregulation of dopaminergic signalization: Increase in accumbal and striatal DA, decrease in striatal and frontal DA, decrease in frontal 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), increase in frontal and decrease in striatal homovallinic acid levels.^[71,74]

Methylazoxymethanol acetate (MAM): Prenatal MAM administration leads to developmental damage in fetal brain because of DNA synthesis inhibition during mitosis. This abnormal brain development results in multiple behavioral deficits like impairment in sociality, PPI, spatial cognition.^[62] In another study increase in accumbal DA levels is reported. Increase in ventral tegmental DA activity and locomotor sensitivity to amphetamine are reversed by the injection of tetrodotoxin to ventral hippocampus.^[75]

Environmental stress: Multiple environmental stress factors can be applied in different developmental stages acutely or chronically, alone or in combination: Social isolation, restraint, noise, light, water. Sociality is reported to be critical for normal developmental processes of rats; they have socially active nature which also has hierarchical rules.^[76] For this reason any kind of social deprivation can result in abnormal brain development which also leads to locomotor hyperactivity, impaired cognition, increased anxiety, depressive like behaviors and aggression which are also reported as schizophrenia symptoms.^[19,65]

Stress exposure stimulates the release of stress hormones that resulted in dysregulation of several neurochemical compounds: decrease in DA, DOPAC and homovallinic acid levels,^[77] increase in striatal and accumbal, decrease in frontal serotonin levels, increase in corticostriatal noradrenaline level which are related to anxiety and positive symptoms,^[78] downregulation in cortical parvalbumin containing GABAergic neurotransmission.^[65]

Schizophrenia-like behavioral and neurochemical abnormalities that are generated by using environmental stressors can be reversed by antipsychotics, and this condition is proposed to be sufficient for this model's validity.^[77]

Genetic Animal Models (Knockout & Transgenic)

Genetic studies are identified several specific genes that are associated with schizophrenia disorder.^[78-80] Generally, twin studies are shown that schizophrenia is a predominant genetic disorder, with estimates of heritability risk ranging at 50-80%. In researches it is demonstrated that single effects of a major gene are unlikely to mimic schizophrenia's complexity; instead, polygenic models consists of multiple-risk genes can provide the best expression for schizophrenia.^[81,82]

There are several genetic animal models of schizophrenia: neurodevelopmental candidate genes (reelin, BDNF, GAD37, N-CAM); hyperdopaminergic hypothesis related genes (Akt, PP2A, B-arrestin 2, DARPP-32); hypoglutamatergic approach related genes (NMDR receptor subunit 1, calcineurin knockout); susceptibility genes of schizophrenia (COMT, NRG1, Dysbindin, DISC1, RGS-4, CHRNA7, NPAS3, PRODH2 [22q11]).^[2,78-80,91]

N-methyl-D-aspartat (NMDA) receptor subunits importance in schizophrenia neuropathology is reported in schizophrenic postmortem brain tissues: decrease in NRI subunit expression,^[78] deficits in associative learning processes are linked with NMDAR dependent plasticity.^[79] Hyperlocomotion, stereotypic behavior, decrease in social interaction, deficits in cognition and abnormal brain development, impairment in working memory, anhedonia and anxiety,^[2,80] impairment in spatial memory, hyperactivity in novel environment and depression^[81] are reported in NRI mutant animal models of schizophrenia. These behavioral anomalies are not seen if NRI subunit deficiency is generated in adolescence.^[2]

DISC1's influence on neuronal migration, synaptic plasticity, neurogenesis together with its effect on mechanisms in schizophrenia onset, is demonstrated in multiple researches.^[82-84] Schizophrenia like behavioral deficits are reported in genetic models of DISC1: Hyperactivity in novel environment, immobility in forced swimming test, impairment in pre-pulse inhibition,^[85] hyper or hypolocomotion, impairment in cognition and alterations in brain morphology which are also compatible with schizophrenic subjects' symptoms.^[86,87]

In multiple studies, it is reported that "dysbindin1", coded by DTNBP1, has an influence in regulation of exocytosis and vesicular genesis during neurotransmitter release. In addition, it has a role in dopaminergic and glutamatergic neurotransmissions. On the other hand it is shown that DTNBP1 associates with prefrontal and cortical functions of schizophrenic individuals, whereas episodic and working memory of healthy individuals. Decrease in

dysbindin1 mRNA and protein expressions are reported in postmortem brain tissues of schizophrenic subjects.^[1,88] Sand (Sdy) mice have DTNBP1 homozygote mutations that lead to lack of dysbindin1 protein expression.^[89]

Schizophrenia like behavioral alterations as increase in locomotor activity, cognitive deficits, decrease in social interaction, and impairment in PPI and response adaptation to sensory stimulus are demonstrated.^[90] Sdy mice can be used to investigate dysbindin's potential pathways: decrease in mGluRI signalization and its association with synaptic plasticity are shown. Heterozygote mutants are also used in researches.^[89]

Combinations of Animal Models

To generate an animal model, combination of multiple animal models that includes several molecular mechanisms is suggested to mimic the complex mechanisms of schizophrenia. Animal models consist of multiple parameters can be more useful in understanding mechanisms of schizophrenia and generating more effective therapeutic strategies.^[83,89,91] For instance, measuring the adult behavioral alterations in dominant-negative N-terminus human DISC1 (DN-DISC1) expressing transgenic mice is used with the combination of neonatal^[81] and prenatal^[81] poly(I:C) injection. Deficits in hippocampus dependent fear memory, working memory, object recognition memory, decrease in sociality, aggressive behavior are reported in neonatal poly(I:C) injected DN-DISC1 mice.^[81] To determine the efficiency of animal models, behavioral alterations are investigated by using four different experimental groups: (1) control group, (2) standard genetic group (3), environmental group, (4) gene x environment group. Behavioral paradigms are found to be worsening in gene x environment group, and these kind of models are suggested to be critical for animal model's validity.^[91]

Behavioral Parameters and Their Testing Methods

Clinical symptoms and related behavioral parameters in animal models of schizophrenia:

Positive symptoms: In animal models hyperlocomotion in novel environment and as a response to stress are linked with psychomotor agitation, delusion, hallucination and psychosis which are seen in human subjects. Stereotypic behaviors, hyperlocomotion and vulnerability to stress can be investigated by open field test. In animal models hyperactivity can be measured and observed as postural disorders, climbing behavior, stereotypic movements (repeated sniffing, licking, etc.). Instead of catatonia, the term "catalepsy" is used for animals and can be measured by wire grids and bar test.

Negative symptoms: Anhedonia, lack of motivation are seen as an increased immobility in animal models and can be measured by forced swimming and sucrose preference tests. To identify mood disorders, elevated plus maze, light/dark box and open area tests can be used. Social withdrawal which is seen in schizophrenic individuals can be measured by social interaction tests in animal models. There are several protocols for social interaction tests: 3-Chamber social interaction and social novelty preference paradigm are commonly used.

Cognitive disorders: In animal models schizophrenia-like cognitive deficits can be evaluated by multiple parameters, that consist of working memory, long term memory, spatial learning memory, executive functions by using cognitive tests: Barnes maze, Radial arm maze, Morris water maze, T or Y maze, attentional set shifting task, 5-choice serial-reaction time test, radial arm maze.

Conclusion

There are multiple animal models of schizophrenia (Table 1), targeting specific mechanisms of interest. Recent researches are focused on the animal models that consist of multiple mechanisms and researchers are mentioned the requirement for the combination of multiple models to mimic this spectrum.

Animal models can reflect one or more symptoms of schizophrenia, however this disorder has much more of that. For instance animal model of amphetamine can reflect hyperactivity as a response to striatal dopaminergic activity, however other symptoms like cognitive deficits can not be observed by this animal model.^[27] On the other hand in the model of glutamatergic hypofunction, hyperactivity and worsening in positive symptoms are demonstrated.^[10] It is shown that prefrontal glutamatergic hypofunction leads not only positive symptoms, but also negative symptoms together with cognitive deficits.^[28,29]

In researches it is demonstrated that preference of animals' strain, developmental stages for any administration (like LPS, etc.) or any environmental stressors that will be applied, is critical for the studies' purpose and results.^[6] For instance after single or repeated PCP administration, decrease in sociality is reported,^[30] whereas social deficits as a response to amphetamine administration is contradictory. Prenatal administration of MAM and poly (L:C) are reported to lead decrease in sociality, however preadolescent administration of MAM also results with social deficits.^[7,8] As a response to neonatal lesion of ventral hippocampus, decrease in social interaction together with the increase in aggression is shown.^[14] Repeated administration of PCP is found to induce anhedonia like behavior,

Table 1
Results of the measurements (n=55).

Animal model	Approaches	Clinical symptoms*	Schizophrenia like symptoms	Behavioral task		
Pharmacological	Serotonergic Dopaminergic Glutamatergic GABAergic	Positive	Hyperlocomotion Climbing behavior Stereotypic movements Postural disorders	Open field test Wire grids Bar test PPI		
Lesion	Hippocampal Thalamic		Negative	Social interaction Novelty preference Explorative behavior	3-Chamber SI & NP Resident intruder Social play Self grooming	
Neurodevelopmental	Poly(L:C) LPS MAM Stress			Cognitive	Social cognition Memory Executive functioning Attention	Morris water maze Barnes maze Radial arm maze Latent inhibition 5-CSRTT Attentional set shifting T/Y maze
Genetic	Knock out Transgenic					
Combined models	Env x Env Env x Gene Gene x Gene Gene x Env x Env					

*Type of clinical symptom of schizophrenia depends on the animal model that was chosen and developmental stage of the animal model that was formed. Animal model may include one, two or all of the symptoms. 5-CSRTT: five card sorting reaction time test; Env: environmental; Gene: genetic; LPS: lipopolysaccharide; MAM: methylazoxymethanol aspartate; NP: novelty preference; Poly(L:C): polyribonucleic-polycyctidic acid; PPI: pre-pulse inhibition; SI: social interaction.

however single administration of PCP is reported to be insufficient.^[28,29]

Requirement of generating novel animal models that mimic positive, negative and cognitive disorders together in one model are demonstrated. That kind of models can include multiple molecular mechanisms like the schizophrenia spectrum itself. Thus, by using combination of multiple animal models, all forms of validity can be maintained which can also leads to investigation of better therapeutic strategies and better understanding of schizophrenia's etiopathogenesis.^[30] By this point of view, combining the interaction of two or more impact factors, as environment × gene, gene × gene, environment × environment, environment × gene × environment are proposed to be useful for modeling schizophrenia.^[30,31]

As a result, according to their research hypothesis researchers need to decide which experimental animal model or models to choose. This review aimed to provide a perspective to researchers who will conduct research on the physiopathology or treatment of schizophrenia.

Conflict of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Author Contributions

ZMA: study design, systematic search and screening of literature, drafting the manuscript, edits; AA: systematic search and screening of literature, commenting on drafts and the final version of the manuscript; EA: senior author, supervising work, commenting on drafts and final version of the manuscript.

Funding

No funding was received for this research.

References

- Andreasen NC. Symptoms, signs, and diagnosis of schizophrenia. *Lancet* 1995;346:477–81.
- Belforte JE, Zsiros V, Sklar ER, Jiang Z, Yu G, Li Y, Qutlan ME, Nakazawa K. Postnatal NMDA receptor ablation in corticolimbic interneurons confers schizophrenia like phenotypes. *Nat Neurosci* 2010;13:76–83.
- Andreassen OA, Thompson WK, Dale AM. Boosting the power of schizophrenia genetics by leveraging new statistical tools. *Schizophr Bull* 2014;40:13–17.
- Uzun Ö. Pozitif – negatif belirtiler. In: Ceylan E, Çetin M, editors. *Şizofreni*. Vol. 1. İstanbul: Yerküre Tıp ve Yayıncılık; 2005. p. 643–56.
- Foussias G, Remington G. Negative symptoms in schizophrenia: evolution and Ockam's razor. *Schizophr Bull* 2010;36:359–69.
- Boyer TA, Falkai P, Maier W. Genetic and non-genetic vulnerability factors in schizophrenia: the basis of the "two hit hypothesis". *J Psychiatr Res* 1999;33:543–8.
- Kim DH, Stahl SM. Antipsychotic drug development. *Curr Top Behav Neurosci* 2010;4:123–39.
- Taly A. Novel approaches to drug design for the treatment of schizophrenia. *Exp Opin Drug Discov* 2013;8:1285–96.
- Murray RM, Lappin J, Di Forti M. Schizophrenia: from developmental deviance to dopamine dysregulation. *Eur Neuropsychopharmacol* 2008;18:S129–34.
- Inta D, Monyer H, Sprengel R, Meyer-Lindenberg A, Gass P. A comprehensive review: mice with genetically altered glutamate receptors as models of schizophrenia. *Neurosci Biobehav Rev* 2010;34:285–94.
- Yamazaki M, Harada K, Yamamoto N, Yamizu J, Okabe M, Shimada T, Ni K, Matsuoka N. ASP5736, a novel 5-HT_{2A} receptor antagonist, ameliorates positive symptoms and cognitive impairment in animal models of schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol* 2014;24:1698–708.
- Penschuck S, Flagstad P, Dalsbøen M, Leist M, Michael-Titus AT. Decrease in parvalbumin-expressing neurons in the hippocampus and increased phenylcyclohexylamine-induced locomotor activity in the rat methylazoxymethanol (MAM) model of schizophrenia. *Eur J Neurosci* 2006;23:279–84.
- Lipska BK, Jaskiw GE, Braus AR, Weinberger DR. Prefrontal cortical and hippocampal modulation of haloperidol-induced catalepsy and amphetamine-induced stereotypic behaviors in the rat. *Biol Psychiatry* 1995;38:255–62.
- Tseng KY, Chambers RA, Lipska BK. Neonatal ventral hippocampal lesion as a heuristic neurodevelopmental model of schizophrenia. *Behav Brain Res* 2009;204:295–305.
- Flagstad P, Mørk A, Glenthøj BY, van Beek J, Michael-Titus AT, Dalsbøen M. Disruption of neurogenesis on gestational day 17 in the rat causes behavioral changes relevant to positive and negative schizophrenia symptoms and alters amphetamine-induced dopamine release in nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacology* 2004;29:2052–64.
- Rodriguez-Murillo L, Gogos JA, Karayiorgou M. The genetic architecture of schizophrenia: new mutations and emerging paradigms. *Annu Rev Med* 2012;63:63–80.
- Niwa M, Kamiya A, Murai R, Kubo KI, Gruber AJ, Tomita K, Lu L, Tomisato S, Jaaro-Peled H, Seshadri S, Hiyama H, Huang B, Kohda K, Noda Y, O'Donnell P, Nakajima K, Sawa A, Nabeshima T. Knockdown of DISC1 by in utero gene transfer disturbs postnatal dopaminergic maturation in the frontal cortex and leads to adult behavioral deficits. *Neuron* 2010;65:480–9.
- Papaleo F, Yang F, Garcia S, Chen J, Lu B, Crowley JN, Weinberger DR. Dysbindin-1 modulates prefrontal cortical activity and schizophrenia-like behaviors via dopamine/D2 pathways. *Mol Psychiatry* 2012;17:85–98.
- Mei L, Xiong W. Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 2008;9:437–52.
- Aberg KA, McClay JL, Nerella S, Clark S, Kumar G, Chen W, Khachane AN, Xie L, Hudson A, Gao G, Harada A, Hultman CM, Sullivan PF, Magnusson PKE, van den Oord EJ. Methylome-wide association study of schizophrenia: identifying blood biomarker signatures of environmental insults. *JAMA Psychiatry* 2014;71:255–64.
- Ikegami T, Bundo M, Murata Y, Kasai K, Kato T, Iwamoto K. DNA methylation of the BDNF gene and its relevance to psychiatric disorders. *J Hum Genet* 2013;58:434–8.

22. Van Os J, Kenis G, Rutten BPF. The environment and schizophrenia. *Nature* 2010;468:203–12.
23. Featherstone RE, Rizos Z, Kapur S, Fletcher PJ. A sensitizing regimen of amphetamine that disrupts attentional set-shifting does not disrupt working or long-term memory. *Behav Brain Res* 2008;189:170–9.
24. Marcotte ER, Pearson DM, Seiravata LK. Animal models of schizophrenia: a critical review. *J Psychiatry Neurosci* 2001;26:395–410.
25. Carlsson A. The dopamine theory revisited. In: Hirsch SR, Weinberger DR, editors. *Schizophrenia*. Oxford: Blackwell Science; 1995. p. 379–400.
26. Dworkin RH, Opler LA. Simple schizophrenia, negative symptoms, and prefrontal hypodopaminergia. *Am J Psychiatry* 1992;149:1284–5.
27. Papaleo F, Yang F, Garcia S, Chen J, Lu B, Crawley JN, Weinberger DR. Dysbindin-1 modulates prefrontal cortical activity and schizophrenia-like behaviors via dopamine/D2 pathways. *Mol Psychiatry* 2012;17:85–98.
28. Javitt DC, Zukin SR. Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 1991;148:1301–8.
29. Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, Heninger GR, Bowers MB Jr, Charney DS. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. *Arch Gen Psychiatry* 1994;51:199–214.
30. Jenkins TA, Harre MK, Reynolds GP. Effect of subchronic phencyclidine administration on sucrose preference and hippocampal parvalbumin immunoreactivity in the rat. *Neurosci Lett* 2010;471:144–7.
31. Cohen J, Struening EL. Opinions about mental illness in the personnel of two large mental hospitals. *J Abnorm Psychol* 1962;64:349–60.
32. Xu Y, Wang CZ, Liu J, Anastasio NC, Johnson KM. Brain-derived neurotrophic factor prevents phencyclidine induced apoptosis in developing brain by parallel activation of both the ERK and PI3K/Akt pathways. *Neuropharmacology* 2010;58:330–6.
33. Seifler A, Ghauffrida A. Evaluation of NMDA receptor models of schizophrenia: Divergences in the behavioral effects of sub-chronic PCP and MK-801. *Behav Brain Res* 2009;204:410–5.
34. Geyer MA, Krebs-Thomson K, Braff DL, Swerdlow NR. Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacology (Berl)* 2001;156:117–54.
35. Noda A, Noda Y, Kamei H, Ichihara K, Mamiya T, Nagai T, Sugitara S, Furukawa H, Nabeshima T. Phencyclidine impairs latent learning in mice: interaction between glutamatergic systems and sigma(1) receptors. *Neuropsychopharmacology* 2001;24:451–60.
36. Jentsch JD, Roth RH. The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 1999;20:201–25.
37. Martin MV, Mimics K, Nisenbaum LK, Vawter MP. Olanzapine reversed brain gene expression changes induced by phencyclidine treatment in non-human primates. *Mol Neuropsychiatry* 2015;1:82–93.
38. Harrison PJ, Burnet PW. The 5-HT2A (serotonin2A) receptor gene in the aetiology, pathophysiology and pharmacotherapy of schizophrenia. *J Psychopharmacol* 1997;11:18–20.
39. Burnet PW, Eastwood SL, Harrison PJ. [3H]WAY-100635 for 5-HT1A receptor autoradiography in human brain: a comparison with [3H]8-OH-DPAT and demonstration of increased binding in the frontal cortex in schizophrenia. *Neurochem Int* 1997;30:565–74.
40. Abi-Dargham A, Laruelle M, Aghajanian GK, Charney D, Krystal J. The role of serotonin in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 1997;9:1–17.
41. Geyer MA. Behavioral studies of hallucinogenic drugs in animals: implications for schizophrenia research. *Pharmacopsychiatry* 1998;31:573–9.
42. Yamada S, Harano M, Annoh N, Nakamura K, Tanaka M. Involvement of serotonin 2A receptors in phencyclidine-induced disruption of prepulse inhibition of the acoustic startle in rats. *Biol Psychiatry* 1999;46:832–8.
43. Lewis DA, Pierri JN, Volk DW, Melchitzky DS, Woo TU. Altered GABA neurotransmission and prefrontal cortical dysfunction in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 1999;46:616–26.
44. Homayoun H, Moghaddam B. NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons. *J Neurosci* 2007;27:11496–500.
45. Benes FM, Vincent S, Alsterberg G, Bird ED, SanGiovanni JP. Increased GABA_A receptor binding in superficial layers of cingulate cortex in schizophrenics. *J Neurosci* 1992;12:924–9.
46. Aklejian S, Kim JJ, Potkin SG, Hagman JO, Tafazzoli A, Bunney WE, Bunney WE Jr, Jones EG. Gene expression for glutamic acid decarboxylase is reduced without loss of neurons in prefrontal cortex of schizophrenics. *Arch Gen Psychiatry* 1995;52:258–66.
47. Zhang Y, Behrens MM, Lisman JE. Prolonged exposure to NMDAR antagonist suppresses inhibitory synaptic transmission in prefrontal cortex. *J Neurophysiol* 2008;100:959–65.
48. Jajda K, Koeh M. Picrotoxin in the medial prefrontal cortex impairs sensorimotor gating in rats: reversed by haloperidol. *Psychopharmacology (Berl)* 1999;144:347–54.
49. Guidotti A, Autz J, Davis JM, Dong E, Grayson DR, Veldic M, Zhang X, Costa E. GABAergic dysfunction in schizophrenia: new treatment strategies on the horizon. *Psychopharmacology (Berl)* 2005;180:191–205.
50. Tricote L, Pelkey KA, Erkkila BE, Jeffries BW, Yuan X, McBain CJ. A blueprint for the spatiotemporal origins of mouse hippocampal interneuron diversity. *J Neurosci* 2011;31:10948–70.
51. Tregellas JR, Smucny J, Harris JG, Olincy A, Maharajh K, Kronberg E, Eichman LC, Lyons E, Freedman RE. Intrinsic hippocampal activity as a biomarker for cognition and symptoms in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2014;171:549–56.
52. Schobel SA, Chaudhury NH, Khan UA, Paniagua B, Seyner MA, Aslani I, Inbar BP, Corcoran CM, Lieberman JA, Moore H, Small SA. Imaging patients with psychosis and a mouse model establishes a spatiotemporal pattern of hippocampal dysfunction and implicates glutamate elevation as a pathogenic driver. *Neuron* 2013;78:81–93.
53. Levin HS, Eisenberg HM, Benton AL. *Frontal lobe and dysfunction*. Oxford: Oxford University Press; 1991. 448 p.
54. Le Moal M, Simon H. Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles. *Physiol Rev* 1991;71:155–234.
55. Jaskiw GE, Weinberger DR. Ibotenic acid lesions of medial prefrontal cortex augment swim-stress-induced locomotion. *Pharmacol Biochem Behav* 1992;41:607–9.

56. Grace AA. Gating of information flow within the limbic system and the pathophysiology of schizophrenia. *Brain Res Brain Res Rev* 2000;31:330-41.
57. Mintlema G, Braitt AM, Chase R. Heterogeneity of the hippocampus: effects of subfield lesions on locomotion elicited by dopaminergic agonists. *Behav Brain Res* 1998;92:31-45.
58. Csernansky JG, Csernansky CA, Kogelman L, Montgomery EM, Bardgett ME. Progressive neurodegeneration after intracerebroventricular kainic acid administration in rats: implications for schizophrenia? *Biol Psychiatry* 1998;44:1143-50.
59. Lewis DA, Levitt P. Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annu Rev Neurosci* 2002;25:409-32.
60. Koenig JI, Elmer GI, Shepard PD, Lee PR, Mayo C, Joy B, Hercher E, Brady DL. Prenatal exposure to a repeated variable stress paradigm elicits behavioral and neuroendocrinological changes in the adult offspring: potential relevance to schizophrenia. *Behav Brain Res* 2005;156:251-61.
61. Meyer U. Prenatal poly(I:C) exposure and other developmental immune activation models in rodent systems. *Biol Psychiatry* 2014;75:307-15.
62. Moore H, Jentsch JD, Ghajamnia M, Geyer MA, Grace AA. A neurobehavioral systems analysis of adult rats exposed to methylazoxymethanol acetate on E17: implications for the neuropathology of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2006;60:253-64.
63. Kirsten TB, Taricano M, Florio JC, Palermo-Neto J, Bernardi MM. Prenatal lipopolysaccharide reduces motor activity after an immune challenge in adult male offspring. *Behav Brain Res* 2010;211:77-82.
64. Lin YL, Wang S. Prenatal lipopolysaccharide exposure increases depression-like behaviors and reduces hippocampal neurogenesis in adult rats. *Behav Brain Res* 2014;259:24-34.
65. Powell SB, Sejnowski TJ, Behrens MM. Behavioral and neurochemical consequences of cortical oxidative stress on parvalbumin-interneuron maturation in rodent models of schizophrenia. *Neuropharmacology* 2012;62:1322-31.
66. Van Vugt RWM, Meyer F, van Hulzen JA, Verhoeven J, Gools AR, Verheij MMM, Martens GJM. Maternal care affects the phenotype of a rat model for schizophrenia. *Front Behav Neurosci* 2014;8:1-9.
67. Davis J, Moylan S, Harvey BH, Maes M, Berk M. Neuroprogression in schizophrenia: pathways underpinning clinical staging and therapeutic corollaries. *Aust N Z J Psychiatry* 2014;48:512-29.
68. Forrest CM, Khalil OS, Pizar M, Smith RA, Darlington LG, Stone TW. Prenatal activation of toll-like receptors-3 by administration of the viral mimetic poly(I:C) changes synaptic proteins, N-methyl-D-aspartate receptors and neurogenesis markers in offspring. *Mol Brain* 2012;5:22.
69. Arseneault D, St-Amour L, Casboni G, Rousseau LS, Cicchetti F. The different effects of LPS and poly I:C prenatal immune challenges on the behavior, development and inflammatory responses in pregnant mice and their offspring. *Brain Behav Immun* 2014;38:77-90.
70. Bitanhrwe BKY, Peleg-Railstein D, Mouttet F, Feldon J, Meyer U. Late prenatal immune activation in mice leads to behavioral and neurochemical abnormalities relevant to the negative symptoms of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 2010;35:2462-78.
71. Vuilleumot S, Weber L, Feldon J, Meyer U. A longitudinal examination of the neurodevelopmental impact of prenatal immune activation in mice reveals primary defects in dopaminergic development relevant to schizophrenia. *J Neurosci* 2010;30:1270-87.
72. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000;406:782-7.
73. Ozawa K, Hashimoto K, Kishimoto T, Shimizu E, Ishikura H, Iyo M. Immune activation during pregnancy in mice leads to dopaminergic hyperfunction and cognitive impairment in the offspring: a neurodevelopmental animal model of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2006;59:546-54.
74. Lodge DJ, Behrens MM, Grace AA. A loss of parvalbumin containing interneurons is associated with diminished oscillatory activity in an animal of schizophrenia. *J Neurosci* 2009;29:2344-54.
75. Möller M, Du Preez JL, Viljoen FP, Berk M, Emsley R, Harvey BH. Social isolation rearing induces mitochondrial, immunological, neurochemical and behavioural deficits in rats, and is reversed by dopamine or N-acetyl cysteine. *Brain Behav Immun* 2013;30:156-67.
76. Möller M, Du Preez JL, Viljoen FP, Berk M, Harvey BH. N-acetyl cysteine reverses social isolation rearing induced changes in corticostriatal monoamines in rats. *Metab Brain Dis* 2013;28:687-96.
77. Fone KCF, Porkess MV. Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents—relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 2008;32:1087-102.
78. Ibrahim HM, Healy DJ, Hogg AJ Jr, Meador-Woodruff JH. Nucleus-specific expression of ionotropic glutamate receptor subunit mRNAs and binding sites in primate thalamus. *Brain Res Mol Brain Res* 2000;79:1-17.
79. Stephan KE, Baldeweg T, Friston KJ. Synaptic plasticity and dysconnectivity in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2006;59:929-39.
80. Fradley RL, O'Meara GF, Newman RJ, Andrieux A, Job D, Reynolds DS. STOP knockout and NMDA NR1 hypomorphic mice exhibit deficits in sensorimotor gating. *Behav Brain Res* 2005;163:257-64.
81. Miyamoto Y, Yamada K, Noda Y, Mori H, Mishima N, Nabeshima T. Hyperfunction of dopaminergic and serotonergic neuronal systems in mice lacking the NMDA receptor 1 subunit. *J Neurosci* 2001;21:750-7.
82. Ming GL, Song H. DISC1 partners with GSK3beta in neurogenesis. *Cell* 2009;136:990-2.
83. Ito D, Nagai T, Koike H, Kitahara Y, Mizoguchi H, Niwa M, Jaaro-Peled H, Natta A, Yoneda Y, Nabeshima T, Sawada A, Yamada K. Combined effect of neonatal immune activation and mutant DISC1 on phenotypic changes in adulthood. *Behav Brain Res* 2010;206:32-7.
84. Abazyan B, Nomura J, Kannan G, Ishizuka K, Tamashiro KL, Nacifora F, Pogorelec V, Ladenheim B, Yang C, Krastova IN, Cadet JL, Pardo C, Mori S, Kamaya A, Vogel MW, Sawa A, Ross CA, Pletnikov MV. Prenatal interaction of mutant DISC1 and immune activation produces adult psychopathology. *Biol Psychiatry* 2010;68:1172-81.
85. Harrison PJ, Weinberger DR. Schizophrenia genes, gene expression and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol Psychiatry* 2005;10:40-68.
86. Schurov IL, Handford EJ, Brandon NJ, Whitting PJ. Expression of disrupted in schizophrenia 1 (DISC1) protein in the adult and developing mouse brain indicates its role in neurodevelopment. *Mol Psychiatry* 2004;9:1100-10.
87. Shen S, Lang B, Nakamoto C, Zhang F, Pu J, Kuan SL, Chatzi C, He S, Mackie I, Brandon NJ, Marquis KL, Day M, Hurko O, McCaig CD, Riedel G, St Clair D. Schizophrenia-related neural and

- behavioral phenotypes in transgenic mice expressing truncated Disc1. *J Neurosci* 2008;28:10893–904.
88. Bhardwaj SK, Ryan RT, Wong TP, Srivastava LK. Loss of dysbindin-1, a risk gene for schizophrenia, leads to impaired group I metabotropic glutamate receptor function in mice. *Front Behav Neurosci* 2015;9:72.
 89. Xu Y, Sun Y, Ye H, Zhu L, Liu J, Wu X, Wang L, He T, Shen Y, Wu JY, Xu Q. Increased dysbindin-1B isoform expression in schizophrenia and its propensity in aggressive formation. *Cell Discov* 2015;1:15032.
 90. Neeley EW, Berger R, Koenig JI, Leonard S. Strain dependent effects of prenatal stress on gene expression in the rat hippocampus. *Physiol Behav* 2011;104:334–9.
 91. Petrowski Z, Adam G, Tuboly G, Kekesi G, Beneke G, Keri S, Horvath G. Characterization of gene-environment interactions by behavioral profiling of selectively bred rats: the effect of NMDA receptor inhibition and social isolation. *Behav Brain Res* 2013;240:134–45.
 92. Nestler EJ, Hyman SE. Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci* 2010;13:1161–9.
 93. Weinberger DR, Egan MF, Bertolino A, Callicott JH, Mattay VS, Lipska BK, Berman KF, Goldberg TE. Prefrontal neurons and the genetics of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2001;50:825–44.
 94. Maric NP, Srivastava DM. Why schizophrenia genetics needs epigenetics: a review. *Psychiatr Danub* 2012;24:2–18.
 95. Muraki K, Tanigaki K. Neuronal migration abnormalities and its possible implications for schizophrenia. *Front Neurosci* 2015;9:74.
 96. Ram E, Raphaeli S, Avtal A. Prepubertal chronic stress and ketamine administration to rats as a neurodevelopmental model of schizophrenia symptomatology. *Int J Neuropsychopharmacol* 2013;16:2307–14.

ORCID ID:

Z. M. Altunay 0000-0002-7663-7417;
 A. Alphan 0000-0001-9624-2036;
 E. Adigüzel 0000-0002-1110-5786

Correspondence to: Esat Adigüzel, MD

Department of Anatomy, Faculty of Medicine,
 Pamukkale University Denizli, Türkiye
 Phone: +90 542 711 80 31
 e-mail: adiguzel@pau.edu.tr

Conflict of interest statement: No conflicts declared.



This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0 Unported (CC BY-NC-ND 4.0) Licence (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>) which permits unrestricted noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. *Here is the article:* Altunay ZM, Alphan A, Adigüzel E. *In vivo* experimental models of schizophrenia: mechanisms, features, advantages, disadvantages. *Anatomy* 2022;16(2):114–123.

