



## Rotenon ile İndüklenen İn Vitro Parkinson Hastalığı Modelinde Glukagon Benzeri Peptid-1 Analogu Ekzenatidin Nöron Sağkalımına Etkisi

### Effect of Glucagon Like Peptide-1 Analogue Exenatide on Neuron Survival in Rotenone-Induced In Vitro Parkinson's Disease Model

Mümin Alper Erdoğan<sup>1</sup>, Dilek Taşkıran<sup>2</sup>

<sup>1</sup>İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye.

<sup>2</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye.

#### Özet

**Amaç:** Parkinson hastalığı (PH), beyinde substansiya nigra da bulunan dopaminerjik nöronların hasarı ve buna eşlik eden striatumda dopamin eksikliği sonucunda gelişen, bradikinezi, rijidite ve postural instabilite ile seyreden kronik ve ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır. Çalışmalar genetik ve yaşlanma, pestisid ve ağır metallere maruziyet gibi çevresel faktörlerin hastalığın etiopatogenezinde önemli role sahip olabileceğine işaret etmektedir. Rotenon, deneysel PH modeli oluşturmak ve hastalığın mekanizmasını araştırmak amacıyla kullanılan organik bir pestisiddir. Bu çalışmada amacımız insan nöroblastoma hücre serisi olan SH-SY5Y hücrelerinde rotenonun toksik etkisini ve aynı zamanda GLP-1 analogu olan ekzenatidin rotenon nörotoksitesine karşı koruyucu etkili olup olmadığını araştırmaktır.

**Materyal-Metot:** Bu amaçla SH-SY5Y hücreleri çeşitli dozlardaki rotenon ile 24 saat boyunca inkübe edildi. Ekzenatidin koruyucu etkisi yine farklı dozlardaki ekzenatidin rotenon ile birlikte kültür medyumuna eklenmesi ve 24 saat inkübe edilmesi ile incelendi. Rotenon ve ekzenatidin etkileri hücre canlılığı, klonojenik aktivite, morfolojik inceleme ve apoptotik hücre ölümünün değerlendirilmesi ile belirlendi.

**Bulgular:** Rotenon eklenen gruplarda doza bağlı olarak ve anlamlı düzeyde hücre canlılığının ve klonojenik aktivitenin azaldığı belirlendi. Ayrıca rotenon eklenen hücrelerde belirgin olarak morfolojik değişim olduğu ve apoptotik hücre ölümünde artış olduğu gözlemlendi. Ortama ekzenatidin eklenmesi ise hücre canlılığının ve klonojenik aktivitenin korunmasına, apoptotik hücre ölümünde azalmaya neden oldu.

**Sonuç:** Bulgularımız rotenonun SH-SY5Y hücrelerinde nörotoksik etkilerinin olduğunu ve in vitro PH modeli oluşturmak amacıyla kullanılabilirliğini gösterdi. Ayrıca, sonuçlarımız ekzenatidin nöronal hücrelerde rotenon ile indüklenen toksisiteye karşı nöroprotektif etkiye sahip olabileceğini gösterdi.

**Anahtar kelimeler:** Parkinson, Rotenon, Ekzenatid, Nörotoksisite, Nöroprotektif.

#### Abstract

**Objective:** Parkinson's disease (PD) is one the most common neurodegenerative disorder characterized by bradykinesia, tremor, rigidity and postural instability as a result of progressive degeneration of the dopaminergic neurons in substantia nigra pars compacta (SNc) and dopamine decrease in the striatum. Accumulating data recommends that combination of genetic and environmental factors including aging, exposure to pesticides, and heavy metals may have significant roles in the pathogenesis of PD. Rotenone, an organic pesticide, is commonly used for investigating the mechanism of neuronal degeneration in experimental PD models. In the present study, we aimed to investigate the effects of rotenone on SH-SY5Y human neuroblastoma cells, and also the neuroprotective effects of exenatide, a GLP-1 analogue, against rotenone-induced neurotoxicity.

**Material-Method:** Briefly, to induce rotenone-induced neurotoxicity, SH-SY5Y cells were exposed to various doses of rotenone for 24 hours. To explore the neuroprotective effects of exenatide, different doses of exenatide were added into the medium with or without rotenone for 24 hours. Cell viability, clonogenic potential, morphological alterations, and apoptotic cell death were evaluated.

**Results:** Our results demonstrated a dose-dependent and significant decrease in cell viability in rotenone-exposed groups. Also, rotenone-treated group showed significant morphological alterations, decreased clonogenic potential and increased apoptosis. However, treatment of the cells with exenatide significantly improved cell viability and clonogenic activity, and reduced apoptotic cell death.

**Conclusions:** In conclusion, these findings suggested that rotenone can induce neurotoxicity in neuronal cells and can be used to establish in vitro PD model. In addition, exenatide may have neuroprotective effects on neuronal cells against rotenone-induced neurotoxicity.

**Keywords:** Parkinson, Rotenone, Exenatide, Neurotoxicity, Neuroprotective .

## Giriş

Parkinson hastalığı (PH), başlıca tremor, rijidite ve bradikinezi gibi motor bulgularla ortaya çıkan kronik ve progresif bir nörodejeneratif hastalıktır. Hastalığın ortaya çıkmasına neden olan temel patoloji nigrostriatal yolağın dejenerasyonu sonucu gelişen dopamin yetmezliğidir. Son yıllarda yapılan çalışmalar olası mekanizmaların mitokondriyal disfonksiyon, glutamat reseptör aracılı eksitotoksisite, oksidatif stres, ubiquitin-proteozom sistemi, otofaji ve apoptoz ile ilişkili olduğunu göstermektedir (1-5). PH için temel patolojik değişiklikler, substantia nigra pars kompaktadaki dopaminerjik hücrelerin kaybı ve Lewy cisimciği olarak sitoplazmik inklüzyon cisimlerinin birikimi sonucu gerçekleşir. Lewy cisimcikleri hiperfosforile nörofilament proteinleri, lipidler, demir, ubiquitin ve  $\alpha$ -sinüklein içermektedir. Klinik belirtilerin ortaya çıkması için dopaminerjik nöron kaybının %70-80 seviyelerinde olması gerekmektedir (1-5).

PH'da dejeneratif sürecin etiyolojisi hala tam olarak açıklanamamakla birlikte hastalığın gelişiminde genetik ve çevresel faktörlerin birlikte etkili olduğu düşünülmektedir. Tek gen geçişli kalıtsal formlar hastalığın %5-10'undan sorumlu olup özellikle genç yaşta başlayan PH olgularında kalıtsal geçişin daha etkili olduğu düşünülmektedir (3). Çevresel faktörler içinde 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP), manganez, tetrahidroizokinolon ve karbonmonoksit, parakuat ve rotenon benzeri pestisitlere maruziyetin parkinsonizme yol açabileceği gösterilmiştir (6-9). Bu ajanlardan biri olan rotenon geniş spektrumlu bir insektisit, pankisit ve böcek ilacı olarak kullanılan, kokusuz, renksiz, kristalimsi bir izoflavondur. Rotenon mitokondri elektron zincirinde Kompleks I proteininin güçlü bir inhibitörüdür. Rotenon uygulaması sonucunda gelişen mitokondri disfonksiyonu dopaminerjik hücrelerin oksidatif hasara karşı var olan savunma sistemlerini bozarak dejenerasyona yol açmaktadır. Rotenon bu etkileri nedeniyle birçok çalışmada in vitro hücre hatlarında ve in vivo olarak kemirgenlerde deneysel Parkinson modeli geliştirmek amacıyla kullanılmıştır (7-12).

İlk olarak 1929 yılında La Barre tarafından barsaklardan özütlenen bazı maddelerin kan glukozunu düşürdüğü keşfedilmiş ve bu maddelere "inkretin" adı verilmiştir (13-19). Uzunca bir süre üzerinde pek durulmayan bu maddeler insülinin keşfi ile 1960'lı yıllarda yeniden araştırılmaya başlamıştır. Beslenme sırasında glukozun sindirilmesiyle salımı artan inkretinler pankreasın beta hücrelerinden insülin salgısını uyarırlar. Bugün için etkileri en iyi bilinen inkretinler glukagon benzeri peptid 1 (GLP-1) ve gastrik inhibitör popilpeptid (GIP) olup, bunlardan GIP ince barsakların yukarı bölümlerindeki K hücrelerinden, GLP-1 ince barsakların aşağı bölümlerindeki L hücrelerinden ve kolondan salgılanır (13-19).

İnkretinler G proteini ile eşlenik spesifik reseptörlerine bağlanırlar ve sonrasında adenil siklaz aktivitesinde ve hücre içinde cAMP düzeylerinde artışa yol açarak insülin salgısını glukozu bağımlı şekilde uyarırlar. Son yıllarda GLP-1 analogları (liraglutid ve ekzenatid) insülinotropik ve insülin direncini azaltıcı etkileri nedeniyle T2DM hastalarında

kullanılmakta olup normogliseminin sağlanmasında başarılı sonuçlar alınmaktadır. GLP-1 analogları, örneğin ekzenatid, inkretinlerin yıkımında görevli dipeptidil peptidaz 4 proteaz enzimine dirençli oldukları için vücuttaki yarı ömürleri uzundur. Ayrıca bu analog ajanların kan-beyin bariyerini geçebildikleri bilinmektedir (13-19).

Pankreas dışında birçok dokuda reseptörleri olan GLP-1 insülinotropik etkisinin dışında farklı etkilere sahiptir. GLP-1 reseptörleri beyinde özellikle hipokampus ve neokorteksdeki piramidal nöronlarda ve serebellumdaki Purkinje hücrelerinde eksprese edilmektedir. GLP-1 beyinde nöronal progenitörlerin proliferasyonunu uyarmakta ve öğrenme ile ilişkili uzun süreli potensiasyonu (LTP) arttırmaktadır (17, 18). Daha ilginç sonuçlar hayvanlarda gerçekleştirilen Alzheimer modellerinde elde edilmiş olup GLP-1 analoglarının hipokampustaki nöronları beta amyloid birikiminin etkilerinden koruduğu ve nöronal apoptozu azalttığı gösterilmiştir (17, 18).

Bu bilgiler ışığında çalışmamızın amacı, rotenonun in vitro koşullarda nöron canlılığı üzerindeki toksik etkilerini ve GLP-1 analogu olan ekzenatidin nörotoksisite üzerine koruyucu etkisinin olup olmadığını araştırmaktır.

## Materyal-Metot

Bu çalışmada insan nöroblastoma hücre serisi olan SH-SY5Y hücre kültürlerinde ilk olarak rotenon farklı dozlarda ve sürelerde uygulanarak bu maddenin etkin toksisite dozu belirlendi. İkinci aşamada ise etkin dozu belirlenen rotenonun toksik etkilerine karşı GLP-1 reseptör analogu ekzenatidin koruyucu etkisi yine farklı dozlarda test edildi.

### Hücre Kültürlerinde Rotenon Toksisitesinin Oluşturulması

Bu çalışmada satın alınan insan nöroblastoma hücre serisi SH-SY5Y hücreleri (ATCC®CRL2266™) DMEM/F-12, sıgır serumu (FBS), %1 (10 ml) penisilin-streptomisin ve %1 (10 ml) amfoterisin medyum içinde kültür edildi. Hücreler yeterli sayıya ulaşana kadar geçen süreçte %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 37°C'de inkübe edildi. Hücrelerin canlılık ve proliferasyonlarını her sabah invert ışık mikroskobu (Olympus CKX53) ile değerlendirildi. Hücre canlılığının belirlenmesinde Trypan blue boyası yöntemi kullanıldı (20, 21).

Hücrelerde rotenon toksisitesinin oluşturulabilmesi için etkin doz çalışması yapıldı. Bunun için kültür medyumlarında final konsantrasyonu 1, 10, 50, 100, 200, 250, 500 ve 1000 nM olacak şekilde rotenon eklendi ve hücreler 24 saat boyunca inkübe edildi. Rotenon için LD50 dozu saptandıktan sonra nöroproteksiyon deneylerini gerçekleştirmek üzere GLP-1 analogu olan ekzenatid (Byetta, AstraZeneca) 10, 100, 250 ve 500 nM olacak şekilde rotenonla eş zamanlı olarak kültür medyumuna eklendi. Hücreler 37°C, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatöre alınıp 24 saat boyunca inkübe edildi. Ayrıca, Ekzenatid tek başına olarak farklı dozlarda hücrelerin ortamına eklenip bu hücreler üzerindeki etkileri incelendi.

### Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Hücre canlılığını ve proliferasyonunu tayin etmek için kullanılan MTS testi (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium

salt), 37°C'de canlı hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri sonucu, tetrazolium tuzunun (suda çözünebilen formazan ürünü), renkli bir yapıya dönüştürülmesi ve bunun ölçülmesi temeline dayanır. Dehidrogenaz enzimlerinin ürettiği formazan miktarı, kültürdeki canlı hücre sayısı ile doğrudan orantılıdır. Nöroblastoma hücre hatlarının her biri için reaksiyonlar kuruldu ve her reaksiyon üç kere tekrarlandı. Hücreler, 100 µl'de ortalama  $5 \times 10^3$  hücre / kuyu olacak şekilde 96-kuyucuklu kültür kaplarına ekildi ve 24 saat sonra belirtilen ilaçlar ile muamele edildi. MTS ve PMS (phenazine methosulfate) içeren solüsyondan (20:1 v/v) 20 µl alınarak 100 µl besiyeri içeren her bir kuyuya eklendi, 37°C'de 2-3 saat inkübasyondan sonra hücre canlılığı 490 nm'de ölçüldü. Gruplardaki canlılık yüzdesi aşağıdaki formül ile hesaplandı. (20, 21).

$$\text{Canlı Hücre Yüzdesi} = \frac{\text{İlaç uygulanan hücrelerin Nab} \times 100}{\text{Kontrol hücrelerin Nab}}$$

### Klonejik Aktivenin Belirlenmesi

SH-SY5Y hücreleri, 6 kuyucuklu kültür kaplarına her 2 ml'de ortalama 750-1000 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi. 24 saat inkübasyon sonunda hücrelerin yüzeye tutunduklarından emin olunduktan sonra ilaç uygulamaları gerçekleştirildi. 1 hafta sonra ikinci kez ilaç uygulamaları yapıldı ve yaklaşık 2. hafta sonunda tedavi uygulanmamış kontrol kuyusundaki koloni sayısı ve yoğunluğu dikkate alınarak deney sonlandırıldı. Besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra kuyular bir kez PBS ile yıkandı. 40 ml metanol içinde 0,2 g kristal viyole eklenerek hazırlanmış stok solüsyon distile su ile 1/10 oranında dilüe edilerek çalışma solüsyonu elde edildi. Bu solüsyondan kuyulara 1 ml eklendi ve 5 dk beklendi. Sonrasında kuyular 3 kez distile su ile birer dakika süreyle yıkandı. Ardından plaklar kapakları açık vaziyette kurumaya bırakıldı. Son olarak da plaklardan resimler çekilerek kuyulardaki koloni sayıları ya da histogramik değerleri karşılaştırılarak sonuçlar değerlendirildi (22).

### Hücre Morfolojisinin Değerlendirilmesi

SH-SY5Y hücreleri 8 grup olarak 12 kuyucuklu kültür kaplarına  $1,5 \times 10^4$ , (n=6) olarak ekilip ve 48 saat boyunca 37°C, %5 CO<sub>2</sub>'de inkübe edildi. Süre sonunda eski besiyeri atılarak taze besiyeri içinde hazırlanmış rotenon ve/veya ekzenatid 200 µl olarak kültür ortamına eklendi. Bu deneylerde rotenon dozu 250 nM ve ekzenatid dozu ise 100, 250 ve 500 nM olarak uygulandı. Toksikite ve/veya tedavi uygulanan hücreler 24 saat boyunca 37°C, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde inkübe edilip sonra hücrelerdeki morfolojik değişiklikler Olympus CKX53 invert faz kontrast mikroskopunda incelendi (20, 21).

### Apoptotik Hücre Ölümünün Değerlendirilmesi

SH-SY5Y hücreleri 8 grup olarak 12 kuyucuklu kültür kaplarına  $1,5 \times 10^4$ , (n=6) olarak ekilip ve 48 saat boyunca 37°C, %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde inkübe edildi. Süre sonunda eski besiyeri atılarak taze besiyeri içinde hazırlanmış rotenon ve/veya ekzenatid 200 µl olarak kültür ortamına eklendi. Bu deneylerde rotenon dozu 250 nM ve ekzenatid dozu ise

100, 250 ve 500 nM olarak uygulandı. Toksikite ve/veya tedavi uygulanan hücreler 24 saat boyunca 37°C, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde inkübe edilip sonrasında hücrelerdeki apoptotik hücre ölümü Hoechst 33258 (bisbenzimid) testi ile belirlendi. Bunun için hücreler PBS ile yıkandıktan sonra 30 dakika boyunca %10 formalin ile tespit edildi. Sonrasında hücreler 1 mg/ml Hoechst 33258 ile 10 dakika karanlıkta bekletildi. Sonrasında hücreler Olympus CKX53 floresan mikroskopunda incelendi ve hücrelerdeki nükleer kondansasyon ve fragmantasyon apoptoz lehine değerlendirildi (20, 21).

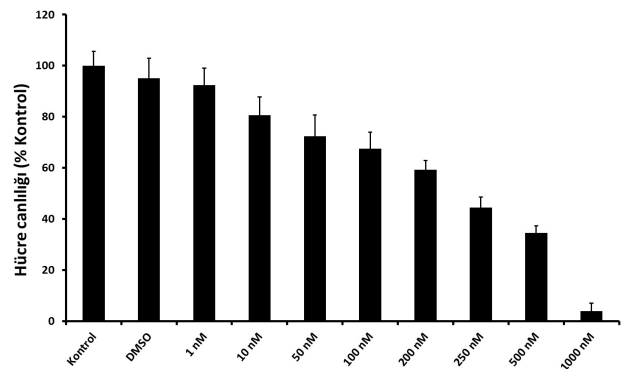
### İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen veriler ortalama±standart hata (SEM) olarak verildi. Verilerin istatistiksel analizinde SPSS 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) istatistik paket programı kullanıldı. Verilerin değerlendirilmesinde tek yönlü varyans analiz (ANOVA) ve gruplar arası karşılaştırmalarda post-hoc Tukey HSD testi kullanıldı. p<0,05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### Bulgular

#### SH-SY5Y Nöroblastoma Hücrelerinde Rotenonun Hücre Sağkalımına Etkilerinin Değerlendirilmesi

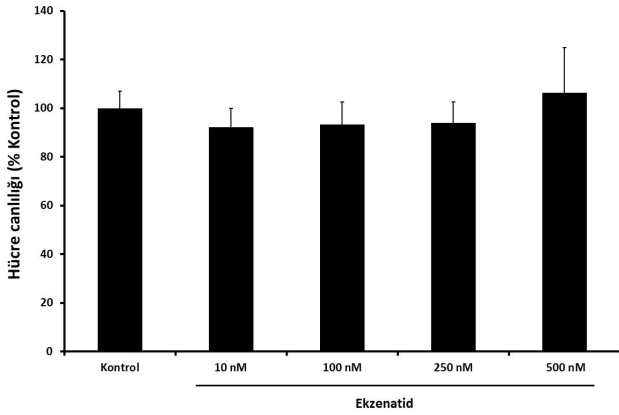
Rotenonun SH-SY5Y hücrelerindeki toksik etkileri 24 saat boyunca ve 1-1000 nM arasındaki farklı dozlarda deneyerek hücre canlılığı testi uygulandı. Şekil 1, rotenonun doza bağlı toksik etkilerini göstermektedir. Testin sonuçları değerlendirildiğinde rotenonun 1 nM'dan başlayarak doza bağlı şekilde hücre canlılığını azalttığı görüldü (p<0,05). Bu sonuçlara göre rotenon için LD50 dozu 250 nM olarak belirlendi ve sonraki deneyler bu dozla gerçekleştirildi.



Şekil 1. Farklı dozlarda rotenon eklenen SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde hücre canlılığının değerlendirilmesi

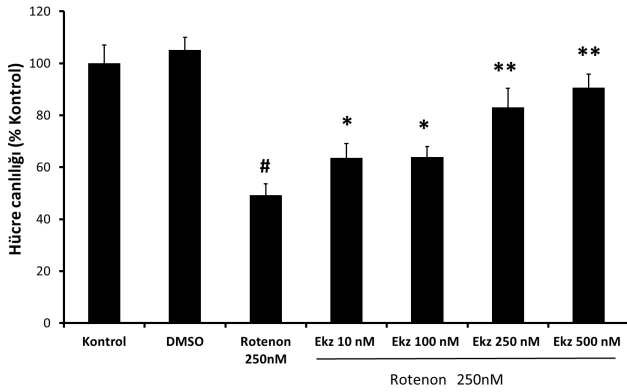
#### Ekzenatidin SH-SY5Y Nöroblastoma Hücrelerinde Rotenon Toksisitesine Karşı Koruyucu Etkisinin Değerlendirilmesi

Rotenon toksisitesine karşı GLP-1 analogu ekzenatidin nöroprotektif etkisi, farklı dozlardaki ekzenatidin SH-SY5Y hücre kültürlerine eklenmesiyle değerlendirildi. Öncelikle hücreler 10, 100, 250 ve 500 nM dozlarda ekzenatid ile muamele edilerek hücre canlılığına ve proliferasyonuna etkileri incelendi. Şekil 2'de görüldüğü üzere ekzenatid hücre canlılığına olumsuz herhangi bir etki göstermedi.



**Şekil 2.** Farklı dozlardaki ekzenatidin SH-SY5Y hücrelerindeki etkileri

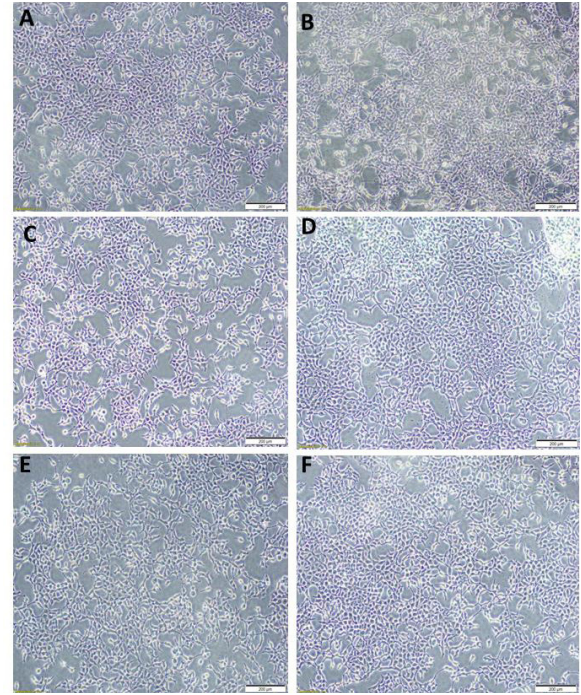
Rotenonun hücrelerdeki toksik etkilerine karşı ekzenatidin nöroprotektif etkilerini incelemek üzere rotenon ile birlikte eklendiğinde ve 24 saat boyunca inkübe edildiğinde doza bağlı olarak hücre ölümünü azalttığı gözlemlendi. Hücre canlılığı rotenon eklenen grupta  $49,22 \pm 4,32$  iken, 10 nM ekzenatid eklenen grupta  $63,65 \pm 5,44$ , 100 nM ekzenatid eklenen grupta  $63,88 \pm 4,08$ , 250 nM ekzenatid eklenen grupta  $83,08 \pm 7,28$  ve 500 nM ekzenatid eklenen grupta  $90,59 \pm 5,25$  olarak ölçüldü (Şekil 3).



**Şekil 3.** Farklı dozlardaki ekzenatidin rotenon toksisitesine karşı nöroprotektif etkisi (# $p < 0,00001$  kontrole göre, \* $p < 0,001$  rotenon grubuna göre, \*\* $p < 0,00001$  rotenon grubuna göre)

### Rotenon ve Ekzenatid Uygulanan SH-SY5Y Nöroblastoma Hücrelerinde Morfolojik Değişikliklerin Değerlendirilmesi

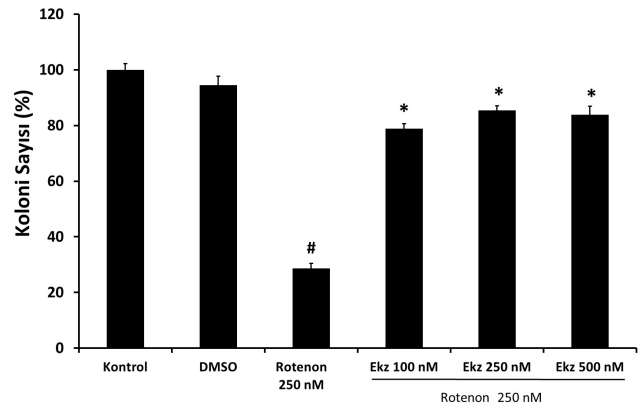
Rotenon ve ekzenatid eklenen SH-SY5Y hücrelerindeki morfolojik değişiklikler her gün faz kontrast ışık mikroskopunda incelendi ve kontrol grubuyla kıyaslandı. Şekil 4'de görüldüğü üzere rotenon eklenen grupta genel olarak hücre yoğunluğunun diğer gruplara göre daha düşük olduğu izlendi. Ayrıca kontrol grubuyla kıyaslandığında hücreler arası bağlantıların belirgin şekilde bozulduğu ve hücrelerin gövdelerinde büzülme ve deformasyonların olduğu görüldü. Buna karşılık rotenon ile birlikte ekzenatid eklenen gruplarda bu değişimlerin çok daha az olduğu gözlemlendi.



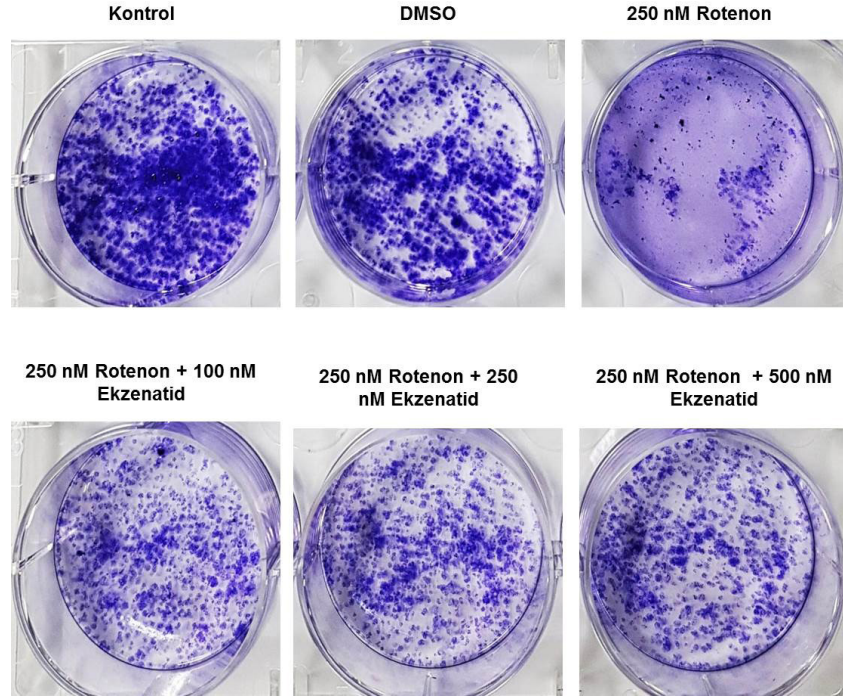
**Şekil 4.** Rotenon ve ekzenatid uygulanan SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerindeki morfolojik değişiklikler (A-Kontrol, B- DMSO, C- 250 nM rotenon, D- 250 nM rotenon+100 nM ekzenatid, E-250 nM rotenon+250 nM ekzenatid, F-250 nM rotenon+500 nM ekzenatid)

### Rotenon ve Ekzenatid Uygulanan SH-SY5Y Nöroblastoma Hücrelerinde Klonojenik Aktivitenin Değerlendirilmesi

Hücrelerin çoğalma ve koloni oluşturma potansiyeli klonojenik aktivite tayini ile değerlendirildi. Şekil 5 bu deneylerin sonucunda kontrol, DMSO, rotenon ve ekzenatid eklenen gruplardaki koloni oluşturma potansiyelini göstermektedir. Sonuçlar kantitatif olarak değerlendirildiğinde 250 nM rotenon eklenen grupta klonojenik aktivitenin kontrole göre  $28,66 \pm 1,84$  düzeyine indiği görüldü. Buna karşılık 100 nM, 250 nM ve 500 nM ekzenatid eklenen gruplarda ise klonojenik aktivitenin sırasıyla  $78,82 \pm 1,84$ ,  $85,50 \pm 1,61$ ,  $83,87 \pm 2,99$  şeklinde olduğu gözlemlendi (Şekil 6). Sonuçlar ekzenatidin rotenon toksisitesine karşı hücrelerin proliferasyonunu ve koloni oluşturma potansiyelini desteklediğini gösterdi.



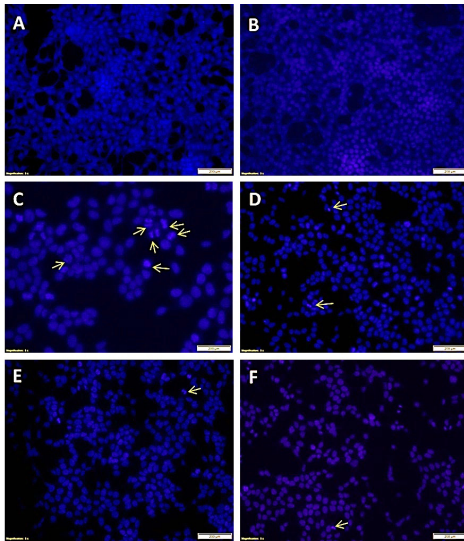
**Şekil 6.** Rotenon ve ekzenatid eklenen SH-SY5Y hücre kültürlerinde klonojenik aktivitenin kantitatif olarak değerlendirilmesi (# $p < 0,00001$  kontrole göre, \* $p < 0,0001$  rotenon grubuna göre)



Şekil 5. Rotenon ve ekzenatid eklenen SH-SY5Y hücre kültürlerinde klonojenik aktivitenin değerlendirilmesi

### Rotenon ve Ekzenatid Uygulanan SH-SY5Y İnsan Nöroblastoma Hücrelerinde Apoptotik Hücre Ölümünün Değerlendirilmesi

Rotenonun SH-SY5Y hücrelerinde apoptotik hücre ölümüne yol açıp açmadığı Hoechst 33258 (bisbenzimid) testi ile değerlendirildi. Tüm gruplardaki hücrelerde nükleer fragmantasyon ve kondansasyon apoptoz lehine değerlendirildi (Şekil 7). Buna göre rotenon eklenen grupta taranan her sahada apoptotik hücrelerde belirgin artış olduğu, ekzenatid eklenen gruplarda ise apoptotik hücrelerin sayıca çok az olduğu görüldü. Bu sonuçlar rotenon toksisitesinde apoptotik mekanizmaların etkili olabileceğini destekledi.



Şekil 7. Rotenon ve ekzenatid uygulanan SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde apoptotik hücre ölümünün değerlendirilmesi (A- Kontrol, B- DMSO, C- 250 nM rotenon, D- 250 nM rotenon+100 nM ekzenatid, E- 250 nM rotenon+250 nM ekzenatid, F-250 nM rotenon+500 nM ekzenatid). Oklar nükleer fragmantasyonu ve kondansasyonu göstermektedir.

### Tartışma

Son yıllarda yapılan çalışmalar oksidatif stres ve mitokondri fonksiyon bozukluğunun Parkinson hastağının gelişiminde önemli role sahip olduğunu ortaya koymuştur. Parkinson hastalığının etiopatogenezine ilişkin birçok in vitro ve in vivo çalışmada çevresel maruziyetin önemli bir faktör olduğu bildirilmiştir. Rotenon, tropikal bitki köklerinden ekstrakte edilen organik bir pestisiddir (6, 9). Rotenon, lipofilitesi sayesinde biyolojik membranları kolaylıkla geçebilmekte, mitokondri elektron transport zincirinde Kompleks 1 inhibisyonu yaparak süperoksit radikali oluşumu ve artan oksidatif strese bağlı mitokondrial hasar ve hücre ölümüne sebep olmaktadır (23, 24). Çalışmamızda SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerine rotenon uygulamasıyla in vitro Parkinson hastalığı modeli oluşturuldu ve Tip 2 diyabet tedavisinde başarılı şekilde kullanılan glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1) analogu ekzenatidin rotenon toksisitesine karşı nöroprotektif etkileri araştırıldı.

Çalışmamızda 1-1000  $\mu$ M arasında değişen konsantrasyonlardaki kültür medyumuna eklenen rotenon doza bağlı olarak SH-SY5Y insan nöroblastoma kültürlerinde anlamlı düzeyde hücre ölümüne neden oldu. Bu deneyleri sonucunda hücrelerin %50'sini öldüren rotenon dozu (LD50) 250 nM olarak belirlendi. Rotenonun bu dozu nöronal hücrelerde belirgin olarak morfolojik değişikliklere ve sinaptik bağlantılarda bozulmaya yol açtı. Klonojenik testin sonuçları, rotenon uygulanan gruptaki hücrelerin çoğalma ve koloni oluşturma kapasitelerinde anlamlı azalma olduğunu gösterdi. Bunun yanı sıra Hoechst 33258 boyası ile apoptotik hücre ölümünü değerlendirdiğimiz deneyler rotenonun SH-SY5Y hücrelerinde belirgin düzeyde nükleer fragmantasyona ve kondansasyona yol açtığını, dolayısıyla apoptozu

uyardığını ortaya koydu. Literatürdeki diğer çalışmalar göz önüne alındığında sonuçlarımız tutarlılık göstermektedir (23-26). Örneğin Park ve Kim (25), 24 saat boyunca 0,1-20 µM olarak uyguladıkları rotenonun SH-SY5Y hücrelerinde doza bağlı hücre sağkalımını azalttığını, apoptozu indüklediğini ve apoptozla ilişkili Bcl-2 proteini ailesinden Bcl-2 ekspresyonunu azaltırken, Bax ekspresyonunu arttırdığını göstermişlerdir. Bir başka çalışmada ise Jang ve ark. (26), 200 nM rotenonun SH-SY5Y hücrelerinde sağkalımını %60'a indirdiğini ve apoptotik hücre ölümünü anlamlı düzeyde uyardığını bildirmişlerdir. Literatürdeki bu sonuçlar ve çalışmamızın sonuçları birlikte rotenonun hücre ölümünde apoptotik yollar üzerinden etkili olduğunu desteklemektedir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz diğer bir önemli bulgu GLP-1 analogu ekzenatidin rotenon ile indüklenen hücre toksisitesini anlamlı düzeyde önlemesidir. Farklı dozlarını denediğimiz ekzenatid nöroblastoma hücrelerinde hücre ölümünü azalttı. Bu etkinin nasıl gerçekleştiğini incelediğimiz deneyler ekzenatidin apoptotik hücre ölümünü azaltarak bu etkiyi gösterdiğini ortaya koydu. Ekzenatid aynı zamanda hücrelerin proliferasyon ve koloni oluşturma yeteneğini de korudu. Ortama rotenon ile birlikte ekzenatid eklenen gruplarda hücreler arası bağlantıların ve hücre bütünlüğünün korunduğu gözlemlendi.

Son yıllarda Tip 2 diyabetin tedavisinde başarılı şekilde kullanılan GLP-1 analoglarının glukoz metabolizması üzerindeki etkilerinin yanı sıra santral ve periferik sinir sistemi üzerinde de önemli etkilerinin olduğu bildirilmiştir (17-20). GLP-1'in özellikle hipokampal ve kortikal nöronlar ve serebellumdaki Purkinje hücrelerinde reseptörleri mevcuttur. GLP-1'in sentetik mimetikleri olan ekzenatid ve liraglutid kan-beyin bariyerini geçerek beyinde büyüme faktörü gibi davranır. GLP-1'in kendisi ve sentetik analogları Aβ amiloidin hipokampusta sinaptik plastisite üzerine olan yıkıcı etkisini azaltır (17-20, 27, 28). GLP-1'in nöroprotektif etkileri diğer büyüme faktörlerinin etkilerine benzemekte olup başlıca MAP/ERK yolağı ve PI3K/protein kinaz B (AKT) yolağı üzerinden hücre büyümesi, çoğalması ve onarımı ile ilgili genlerin ekspresyonunu uyarır, hücre metabolizmasını harekete geçirir, apoptozu ve inflamasyonu baskılar. Sonuç olarak GLP-1 ve analogları sinaptogenez, nörogenez, hücre tamirinin uyarılması ve inflamatuvar yanıtın baskılanması gibi çok geniş bir yelpazede etki göstererek nöroprotektif etki sağlar (17-20, 27, 28).

GLP-1 analoglarının nöroprotektif etkilerini gösteren çalışmalardan birinde 6(OH)-dopamin ile PH modeli oluşturulmuş sıçanlara uygulanan exendin-4 tedavisinin L-dopa ile uyarılan dopamin sekresyonunda artışa ve diskinetik hareketlerde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (29). Bir başka çalışmada ise MPTP ile oluşturulmuş fare PH modelinde uzun etkili GLP-1 analogları olan liraglutide ve lixisenatide tedavisi denenmiş ve motor işlevlerde düzelme, bazal ganglionlarda dopamin sentezinde artış ve proapoptotik BAX ekspresyonunda azalma saptanmıştır (30). Literatürde kısa ve uzun etkili GLP-1 analoglarının nöronal hücre kültürlerinde çeşitli ajanlarla oluşturulmuş toksisite modellerinde nöroprotektif etkileri gösterilmiş

olmakla birlikte rotenon ile indüklenmiş in vitro PH modeli üzerine etkilerini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak çalışmamızın sonuçları daha önce 6-(OH)dopamin, MPTP ve rotenon gibi ajanlarla hayvanlarda oluşturulan in vivo PH modellerinde GLP-1'in koruyucu etkilerini bildiren çalışmaların sonuçları ile uyumlu görünmektedir.

## Sonuç

Sonuç olarak çalışmamızda elde edilen bulgular, bir pestisid olarak kullanılan rotenonun nöronal hücre kültürlerinde doza bağlı nörotoksositeye yol açtığını ve Tip 2 diyabet olgularında tedavi amaçlı kullanılan GLP-1 analogu ekzenatidin in vitro koşullarda nöroprotektif etkili olduğunu ortaya koydu. Çalışmamızın sonuçları GLP-1 analoglarının diyabet tedavisi dışında PH gibi nörodejeneratif süreçlerde de etkili olabileceği yönündeki görüşü desteklemektedir. Gelecekte yapılacak daha detaylı hayvan modelleri ve klinik çalışmalarda uzun etkili GLP-1 analoglarının denenmesi ile çalışmamızın sonuçlarının daha da anlam kazanacağını düşünmekteyiz.

Bu çalışma Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri'nin 16-TIP-056 no'lu projesi kapsamında desteklenmiştir.

## Kaynaklar

1. de Lau LM, Breteler MM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2006; 5(6): 525-35.
2. Akbayır E, Şen M, Ay U, Şenyer S, Tüzün E, Küçükali C. Parkinson hastalığının etyopatogenezi. *Deneyel Tıp Dergisi* 2017; 7(13): 2-22.
3. Shulman JM, De Jager PL, Feany MB. Parkinson's disease: genetics and pathogenesis. *Annu Rev Pathol* 2011; 6: 193-222.
4. Lill CM. Genetics of Parkinson's disease. *Mol Cell Probes* 2016; 30 (6): 386-96.
5. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press. Oxford, UK; 4th ed. 2007; 440-613.
6. Cannon JR, Greenamyre JT. The role of environmental exposures in neurodegeneration and neurodegenerative diseases. *Toxicol Sci* 2011; 124: 225-50.
7. Kang SY, Lee SB, Kim HJ, Kim HT, Yang HO, Jang W. Autophagic modulation by rosuvastatin prevents rotenone-induced neurotoxicity in an in vitro model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 2017 Mar 6; 642: 20-26. doi: 10.1016/j.neulet.2017.01.063.
8. Sherer TB, Betarbet R, Stout AK, Lund S, Baptista M, Panov AV, Cookson MR, Greenamyre JT. An in vitro model of Parkinson's disease: linking mitochondrial impairment to altered alpha-synuclein metabolism and oxidative damage. *J Neurosci*. 2002 Aug 15; 22(16): 7006-15.
9. Greenamyre JT, Betarbet R, Sherer TB. The rotenone model of Parkinson's disease: genes, environment and mitochondria. *Parkinsonism Relat Disord* 2003; 9: 59-64.
10. Betarbet R, Sherer TB, Greenamyre JT. Animal models of Parkinson's disease. *Bioessays* 2002; 24: 308-18.

11. Cannon JR, Tapias V, Na HM, Honick AS, Drolet RE, Greenamyre JT. A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2009; 34: 279-90.
12. Alam M, Schmidt WJ. Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces parkinsonian symptoms in rats. *Behav Brain Res* 2002; 136: 317-24.
13. Hölscher C. Incretin analogues that have been developed to treat type 2 diabetes hold promise as a novel treatment strategy for Alzheimer's disease. *Recent Patents on CNS Drug Discovery* 2010; 5(2): 109-17.
14. Hölscher C. The incretin hormones glucagon like peptide 1 and glucose-dependent insulinotropic polypeptide are neuroprotective in mouse models of Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia* 2014; 10(1 Suppl): S47-54.
15. Hamilton A, Hölscher C. Receptors for the incretin glucagon-like peptide-1 are expressed on neurons in the central nervous system. *Neuroreport* 2009; 20(13): 1161-66.
16. Duarte AI, Candeias E, Correia SC, Santos RX, Carvalho C, Cardoso S, Plácido A, Santos MS, Oliveira CR, Moreira PI. Crosstalk between diabetes and brain: glucagon-like peptide-1 mimetics as a promising therapy against neurodegeneration. *Biochimica et Biophysica Acta* 2013; 1832(4): 527-41.
17. Gault VA, Hölscher C. GLP-1 agonists facilitate hippocampal LTP and reverse the impairment of LTP induced by beta-amyloid. *European Journal of Pharmacology* 2008; 587(1-3): 112-27.
18. Gault VA, Hölscher C. Protease-resistant glucose-dependent insulinotropic polypeptide agonists facilitate hippocampal LTP and reverse the impairment of LTP induced by beta-amyloid. *Journal of Neurophysiology* 2008; 99(4): 1590-95.
19. Velmurugan K, Bouchard R, Mahaffey G, Pugazhenti S. Neuroprotective actions of glucagon-like peptide-1 in differentiated human neuroprogenitor cells. *Journal of Neurochemistry* 2012; 123(6): 919-31.
20. Khalilnezhad A, Taskiran D. The investigation of protective effects of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogue exenatide against glucose and fructose-induced neurotoxicity. *Int J Neurosci* 2019; 129(5): 481-91.
21. Taskiran D, Evren V. Estradiol protects adipose tissue-derived stem cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced toxicity. *Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology* 2012; 26(8): 301-7.
22. Tekedereli I, Akar U, Lopez-Berestein G, Ozpolat B. Therapeutic silencing of nanoliposomal EF2K by siRNA in primary and metastatic breast cancer in animal models. *PLoS One* 2012; 7(7): e41171.
23. Newhouse K, Hsuan SL, Chang SH, Cai B, Wang Y, Xia Z. Rotenone-induced apoptosis is mediated by p38 and JNK MAP kinases in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *Toxicol Sci* 2004; 79: 137-46.
24. Radad K, Rausch WD, Gille G. Rotenone induces cell death in primary dopaminergic culture by increasing ROS production and inhibiting mitochondrial respiration. *Neurochem Int* 2006; 49(4): 379-86.
25. Park HJ, Kim HJ. Inhibitory effect of nicardipine on rotenone-induced apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Mol Med Rep* 2013; 7(3): 941-46.
26. Jang W, Kim HJ, Li H, Jo KD, Lee MK, Yang HO. The Neuroprotective effect of erythropoietin on rotenone-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells through the induction of autophagy. *Mol Neurobiol* 2016; 53(6): 3812-21.
27. Kimura R, Okouchi M, Fujioka H, Ichiyanagi A, Ryuge F, Mizuno T, Imaeda K, Okayama N, Kamiya Y, Asai K, Joh T. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) protects against methylglyoxal-induced PC12 cell apoptosis through the PI3K/Akt/mTOR/GCLc/redox signaling pathway. *Neuroscience* 2009; 162(4): 1212-19.
28. Athauda D, Foltynie T. The glucagon-like peptide 1 (GLP) receptor as a therapeutic target in Parkinson's disease: mechanisms of action. *Drug Discov Today* 2016; May; 21(5): 802-18.
29. Abuirmeileh A, Harkavyi A, Rampersaud N, Lever R, Tadross JA, Bloom SR, Whitton PS. Exendin-4 treatment enhances L-DOPA evoked release of striatal dopamine and decreases dyskinetic movements in the 6-hydroxydopamine lesioned rat. *J Pharm Pharmacol* 2012; 64(5): 637-43.
30. Liu W, Jalewa J, Sharma M, Li G, Li L, Hölscher C. Neuroprotective effects of lixisenatide and liraglutide in the 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 2015; 303: 42-50.