T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİKROSİSTİN-LR (MC-LR) VE β-N-METİLAMİNO-L-ALANİN (BMAA) TOKSİNLERİNİN SH-SY5Y NÖROBLASTOMA HÜCRE HATTINDA NÖRODEJENERATİF ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

SELİM SOYDAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Burak ÖTERLER

EDİRNE-2024

Selim SOYDAN'ın hazırladığı **"Mikrosistin-LR (MC-LR) ve β-N-Metilamino-L-Alanin Toksinlerinin SH-SY5Y Nöroblastoma Hücre Hattında Nörodejeneratif Etkilerinin Araştırılması"** başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından **Biyoloji** Anabilim Dalında bir **Yüksek lisans tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Ünvan, Ad, Soyad):	İmza
Prof.Dr. Burak ÖTERLER (Danışman)	……
Prof.Dr. Belgin ELİPEK	……
Prof.Dr. Halim Aytekin ERGÜL	……

Tez Savunma Tarihi: 17/07/2024

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

Prof.Dr. Burak ÖTERLER
Tez Danışmanı ……

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof.Dr. Muharrem Tolga SAKALLI
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

17/07/2024

Selim Soydan

Yüksek Lisans Tezi

Mikrosistin-LR (MC-LR) ve *β-N*-Metilamino-L-Alanin Toksinlerinin SH-SY5Y Nöroblastoma Hücre Hattında Nörodejeneratif Etkilerinin Araştırılması

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Tatlı su ekosistemlerinde bulunan siyanobakteriler, suda yüksek düzeyde azotlu ve fosfatlı besin tuzları bulmalarıyla ve ortam sıcaklığının yükselmesi ile birlikte kontrolsüz çoğalmaya başlar. Siyanobakterilerin çoğalma sürecinde aerobik ve anaerobik reaksiyonlar gerçekleşir. Böylelikle Mikrosistin-LR (MC-LR) ve β-N-metilamino-L-alanin (BMAA) gibi ciddi toksik etkileri olan siyanobakteriyel toksinler salınır. Mikrosistin-LR sitotoksik etkileriyle, BMAA da özellikle nörodejeneratif bağlantılarıyla bilinen bir toksindir. Bu tez çalışmasında Mikrosistin-LR ve BMAA toksinleri nörodejeneratif araştırmalarda model bir hücre hattı olan SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattına uygulandı. Bu toksinlere ait maruziyetin ardından nöroblastoma hücresinde apoptotik süreçler ve artan reaktif oksijen türleri gözlemlendi. Bu doğrultuda hücre ölümü ve hücresel stres bulguları nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilendirildi ve hücredeki nörodejeneratif hasar belirlendi.

Yıl : 2024

Sayfa Sayısı : 59

Anahtar Kelimeler : Apoptoz, BMAA, Mikrosistin-LR, Nörodejeneratif, Siyanobakteri, ROS, Toksin.

Master Thesis

Investigation of the Neurodegenerative Effects of Microcystin-LR (MC-LR) and β-N-Methylamino-L-Alanine Toxins on the SH-SY5Y Neuroblastoma Cell Line

Trakya University Institute of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

ABSTRACT

Cyanobacteria found in freshwater ecosystems begin to multiply uncontrollably as they find high levels of nitrogenous and phosphate nutrient salts in the water and as the ambient temperature rises. During the proliferation of cyanobacteria, aerobic and anaerobic reactions occur. Thus, cyanobacterial toxins with serious toxic effects such as Microcystin-LR (MC-LR) and β-N-methylamino-L-alanine (BMAA) are released. Microcystin-LR is a toxin known for its cytotoxic effects, and BMAA is known for its neurodegenerative connections. In this thesis study, Microcystin-LR and BMAA toxins were applied to the SH-SY5Y neuroblastoma cell line, which is a model cell line in neurodegenerative research. Following exposure to these toxins, apoptotic processes and increased reactive oxygen species were observed in the neuroblastoma cell. In this regard, findings of cell death and cellular stress have been associated with neurodegenerative diseases and neurodegenerative damage in the cell was determined.

Year : 2024

Number of Pages : 59

Keywords : Apoptosis, BMAA, Microcystin-LR, Neurodegenerative, Cyanobacteria, ROS, Toxin.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bana destek olan ve katkıda bulunan herkese içtenlikle teşekkür ederim. Öncelikle, bu çalışmanın her aşamasında bana rehberlik eden, bilgi ve deneyimlerini paylaşarak yol gösteren danışman hocam Prof. Dr. Burak ÖTERLER'e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Kendisi, akademik ve profesyonel gelişimime büyük katkı sağlamış, tezimin her detayında sabırla ve titizlikle beni yönlendirmiştir.

Bu çalışmayı yürüttüğüm ve bana gerekli altyapıyı sağlayan Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne de teşekkürlerimi sunarım. Merkezde sağlanan imkanlar ve çalışma ortamı, tezimin başarısında büyük rol oynamıştır. Ayrıca, tez çalışmamın önemli aşamalarında değerli katkılarıyla bana yardımcı olan Öğr. Gör. Dr. Deniz ŞUMNULU ve Öğr. Gör. Dr. Nebiye Pelin TÜRKER'e de teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte maddi ve manevi destekleriyle yanımda olan aileme de çok teşekkür ederim. Özellikle, bana sürekli destek olan ve her zaman yanımda olan sevgili eşim Elif SOYDAN'a minnettarım. Onun göstermiş olduğu sabır, anlayış ve destekleri için de minnettarlığımı sunarım.

Bu tez çalışması Trakya Üniversitesi'nin Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2023/130 proje numarası ile maddi olarak desteklenmiştir. Maddi destekleri ile bu tezin gerçekleşmesine imkân sağlayan Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET iv

ABSTRACT v

İÇİNDEKİLER vii

SİMGELER VE KISALTMALAR ix

ŞEKİLLER DİZİNİ x

ÇİZELGELER DİZİNİ xi

BÖLÜM 1 1

GİRİŞ 1

BÖLÜM 2 4

GENEL BİLGİLER 4

2.1. Siyanobakteriler 4

2.2. Siyanobakterilerin Çevresel Etkileşimleri 6

2.3. Siyanobakteri Toksinleri 8

2.3.1. Kimyasal Yapılarına Göre Siyanotoksinler 8

2.3.1.1. Siklik Peptitler 8

2.3.1.2. Alkaloidler 8

2.3.1.3. Protein Olmayan Aminoasitler 9

2.3.1.4. Lipopolisakkaritler 9

2.4. Mikrosistin-LR (MC-LR) 10

2.5. β-N-metilamino-L-alanin (BMAA) 12

2.6. Mikrosistin-LR ve BMAA' nın Spesifik Hücresel Etkileri 14

BÖLÜM 3 15

MATERYAL VE YÖNTEM 15

3.1. Çalışma Ortamı 15

3.2. Materyal 15
3.2.1. Hücre Kültürü için Besiyeri 15
3.2.2. Kullanılan Cihazlar 15
3.3. Yöntem 16
3.3.1. Hücre Kültürü 16
3.3.2. Hücrelerin Pasajlanması 17
3.3.3. Hücre Canlılığı ve Mitokondriyal Toksisite Testi (MTT) 17
3.3.4. Akış Sitometrisi (Flow Cytometry) Analizleri 18
3.3.4.1. Apoptoz Analizi 19
3.3.4.2. ROS Analizi 20
3.4. İstatistiksel Analizler 21
BÖLÜM 4 22
BULGULAR 22
4.1. MTT Testi 22
4.2. Flow Sitometri Analizleri 24
4.2.1. ROS Analizi 24
4.2.2. Apoptoz Analizi 27
4.3. Verilerin İstatistiki Analizi 33
BÖLÜM 5 34
TARTIŞMA 34
KAYNAKLAR 39
ÖZGEÇMİŞ 48

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
AD	Alzheimer Hastalığı
Aβ	Amiloid Beta Peptit
ATP	Adenozin trifosfat
BMAA	β-N-metilamino-L-alanin
C°	Santigrat Derece
CO_2	Karbondioksit
Ca^{+2}	Kalsiyum iyonları
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
GOE	Büyük Oksidasyon Olayı
Hücre/mL	Hücre/mililitre
P	Fosfor
IC50	Yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu
L	Litre
MC-LR	Mikrosistin-LR
Ml	Mililitre
mM	Milimolar
MTT	Hücre Canlılığı – Toksisite Testi
Na	Sodyum
PD	Parkinson Hastalığı
pH	Hidrojen İyonları Konsantrasyonu
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
µL	Mikrolitre
µg /ml	Mikrogram/mililitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Mikrosistin-LR toksininin kimyasal yapısı.....10
Şekil 2.2. β-N-metilamino-L-alanin (BMAA) toksininin kimyasal yapısı. 12
Şekil 3.1. Deneysel süreçlerin uygulandığı laminar akışlı biyogüvenlik kabini.....16
Şekil 3.2. Mikrosistin-LR ve BMAA için hazırlanan ilk stoklar 17
Şekil 3.3. MTT Analizi için maddelerin uygulanması. 18
Şekil 3.4. Flow sitometri analizi için hücrelerin konulacağı eppendorf tüplerin hazırlanması. 19
Şekil 3.5. Kontrol grubu ve IC50 dozlarına maruz bırakılan hücrelerin, 6'lı plakalarda (plate) tripsin ile muamele edilmesi. 20
Şekil 3.6. Analizlerin yapıldığı Flow Sitometri Cihazı.....21
Şekil 4.1. SH-SY5Y nöroblastoma hücresine uygulanan farklı Mikrosistin-LR dozlarında % canlılık verilerine ait sonuçlar. 22
Şekil 4.2. SH-SY5Y nöroblastoma hücresine uygulanan farklı BMAA dozlarında % canlılık verilerine ait sonuçlar. 23
Şekil 4.3. SH-SY5Y nöroblastoma hücresine uygulanan farklı Mikrosistin-LR ve BMAA karışımı dozlarında % canlılık verilerine ait sonuçlar.....23
Şekil 4.4. Ros Analizine ait flow sitometri sonuçları.....25
Şekil 4.5. Gruplar Arası Oksidatif Stres (%) Grafiği. 26
Şekil 4.6. Apoptoz analizine ait flow sitometri sonuçları. 28
Şekil 4.7. Kontrol Grubu 24 Saatlik İnkübasyon (%). 30
Şekil 4.8. BMAA 24 Saatlik İnkübasyon (%). 30
Şekil 4.9. MC-LR 24 Saatlik İnkübasyon (%) 31
Şekil 4.10. MC-LR + BMAA 24 Saatlik İnkübasyon (%).....31
Şekil 4.11. Gruplar Arası Apoptoz dağılımı (%). 32

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar 16

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Siyanobakteriler, yaygın adıyla "mavi-yeşil algler" olarak bilinen Gram-negatif prokaryotik mikroorganizmalardır. Bu mikroorganizmalar hücresel yapı açısından Gram negatif bakterilerle yakın bir benzerlik taşır. Temel hücre yapısında tanımlanmış bir çekirdek veya zara bağlı organelleri mevcut değildir (Percival & Williams, 2014). Sucul habitatlarda tek hücreli siyanobakteriler bolluk, çeşitlilik ve ekolojik karakter açısından önemli bir grup olarak kabul edilmektedir. Siyanobakteriler aynı zamanda atmosferik oksijenin birincil yükselişinden de sorumludur ve azotu fikse edebilen anahtar organizmalar olarak bilinirler (Mehdizadeh Allaf & Peerhossaini, 2022). Diğer bakterilere benzer şekilde siyanobakteriler de çok çeşitli şekil ve boyutlarda bulunur. Siyanobakteriler soliter, koloniyal ya da ipliksi formlar halinde bulunurlar (Singh & Montgomery, 2011).

Değişen iklime tepki olarak tatlı su ekosistemlerinde siyanobakteriyel çoğalmalar giderek yaygınlaşmaktadır. Artan sıcaklıklar, değişen hidrolojik yapı ve besin tuzlarının artışı, tatlı su sistemlerinde mikrobiyal biyokütle üretimi ve topluluk kompozisyonu üzerinde önemli etkilere neden olur (Carey vd., 2012). Mezo/ötrofik tatlı su ekosistemlerinde, yaz aylarında siyanobakteriyel çoğalmaların baskınlığı, ekosistem fonksiyonu üzerinde, toksinlerin üretimi ve bunu takip eden hipoksi indüksiyonunun besin ağı yapılarını ve biyojeokimyasal döngüleri değiştirmesiyle önemli etkilere sahiptir (Woodhouse vd., 2018).

Siyanobakteriyel çoğalmalar kötü bir görüntü ve kokulara neden olabilir, bulanık su oluşturabilir. Ayrıca balık ölümlerine neden olabilir. Ancak siyanobakteriyel

çoğalmaların sorunlu olarak görülmesinin en önemli nedeni, üretebilecekleri güçlü toksinler nedeniyle ciddi bir sağlık tehdidi oluşturabilmeleridir (Lürling vd., 2017).

Siyanobakterilerin sekonder metabolitleri olarak tanımlanan siyanotoksinler, çeşitli biyolojik ve biyokimyasal aktiviteler sergiler. Siyanobakterilerin ürettiği bu toksinler hem toksikolojik hem de kimyasal açıdan oldukça çeşitli bir bileşik grubudur. Siyanobakteriyel toksin mekanizmaları sitotoksik, hepatotoksik, dermatotoksik ve nörotoksik etkileriyle yaygın olarak incelenmektedir. Nörotoksik etkilerinin incelendiği çalışmalar son yıllarda artış göstermektedir. Özellikle oksidatif stres ve nörodejeneratif hastalıklarla olan ilişkisi geleceğe yön verecek bazı verileri ifade etmektedir (Bláha vd., 2009).

Hepatotoksik mikrosistinler (MC'ler) gibi rutin olarak izlenen bir dizi siyanotoksin vardır ve ayrıca nörotoksin β-N-metilamino-L-alanin (BMAA) gibi henüz tam olarak anlaşılmamış bir dizi toksin de vardır. Bu toksin nörodejeneratif hastalıklarla ilişkisi nedeniyle hızla dikkat çekmektedir (Pravadali vd., 2023).

Deneysel çalışmalar MC'nin yaygın bilinen hepatotoksik etkilerinin yanında nörotoksik etkilerinin de olduğunu da ortaya koymuştur. MC'ler hipokampusta Reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini arttırmaktadır. Bu sebeple MC'ler nörodejeneratif hasar oluşturma eğilimine de sahiptir (Zhang vd., 2020).

Nörodejeneratif hastalıklarda oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyona ve bu doğrultuda hücre ölümüne neden olur (Wang Y.,2019). BMAA'nın mitokondriyal hasara sebep olduğu bilinmektedir. Ayrıca BMAA'ya maruz kalınması sonucunda, nörodejeneratif hastalıklarda seyreden proinflamatuar profil ile de ilişki içerisinde olabileceği ifade edilmiştir (Brownson vd., 2002). Sinirbilim araştırmalarında nöron modelleri, sinir sistemi bozukluklarında yer alan moleküler ve hücresel süreçleri açıklamak için çok önemli araçlardır (Brownson vd., 2002; Mello vd., 2018).

Stabil ve tekrarlanabilir şekilde çalışmaları kolaylaştıran SH-SY5Y hücre hattı kültürü gibi in vitro modeller, nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojik mekanizmalarını keşfetmemize yardımcı olur. SH-SY5Y hücre hattı alzheimer hastalığı (AD), nörotoksisite, iskemi ve amiyotrofik lateral skleroz dahil olmak üzere nörolojik

bozuklukların in vitro modellerinde kullanılan büyük ölçüde ölümsüzleştirilmiş bir hücre hattıdır (Hoffmann vd., 2023).

Bu tez çalışmasında Mikrosistin-LR (MC-LR) ve β-N-Methylamino-L-alanine (BMAA) toksinlerinin SH-SY5Y hücre hattında nörodejeneratif hasarla ilişkili oksidatif stres mekanizması ve apoptotik bağlantıları incelenmiştir. Her iki toksinin ayrı ayrı ve kombinasyonunun nasıl bir etki göstereceği ROS ve apoptoz kiti ile araştırılmıştır.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. Siyanobakteriler

Uzun yıllardır "mavi-yeşil algler" olarak da bilinen siyanobakteriler, dünyamızda yaklaşık 3,5 milyar yıldır var olan fotosentetik prokaryotlardır (Mehdizadeh & Peerhossaini, 2022; Schopf, 1993). Deniz ve tatlı sudan karasal ekosistemlere kadar çeşitli ortamlarda popülasyon gösterirler. Siyanobakteriler, donmuş sistemler, jeotermal habitatlar ve aşırı tuzlu ortamlar gibi ekstrem koşulları tolere edebilir, hayatlarını devam ettirebilirler (Mehdizadeh & Peerhossaini, 2022). Ekstremofiller olarak siyanobakteriler termofiller (yüksek sıcaklığa toleranslı) olarak mevcut olabilir, örneğin *Synechococcus* sp. (soğuğa toleranslı), kaplıcalarda ve jeotermallerde, asidofillerde (düşük pH toleranslı), alkalifillerde (yüksek pH toleranslı) ve halofillerde (tuz toleranslı) bulunur. Bu durum yaşam alanlarının oldukça geniş perspektiflerde incelenebileceği anlamına gelmektedir (Kultschar & Llewellyn, 2018).

Evrimsel süreçle gelişen siyanobakteriler, spesifik karmaşık morfolojilere ve hücresel farklılaşmalara sahip, oldukça geniş bir bakteri filumunu oluşturur. Oksijenli fotosentezi gerçekleştiren birincil üreticiler olmaları onları besin ağlarında önemli bir konumda tutar. Siyanobakteriler ayrıca dünyanın erken zamanlarında biyojeokimyasal akışlarda ve yaşam ile dünya arasındaki evrimsel süreçlerde de ayrıca önemli bir rol üstlenmiştir. Büyük Oksidasyon Olayı (GOE) olarak bilinen jeolojik süreçler sırasında atmosferde ve hatta okyanuslarda oksijen seviyesinin yükselmesinden sorumludurlar (Bekker vd., 2004; Demoulin vd., 2019; Hannah vd., 2004; Kasting, 2013).

Siyanobakterilerdeki hücre duvarı gram negatif bakterilerin hücre duvarlarına benzemektedir. Ancak yapısal olarak incelendiğinde peptidoglikan tabakası genellikle Gram-negatif proteobakterilere göre biraz daha kalındır (Castenholz, 2015).

Hücre şeklinin ve hücre duvarı biyosentezinin ve/veya birikiminin hücre iskeletine ait düzenlemeler, maya, bakteriler, yeşil algler ve bitkiler de olmak üzere çoğu organizmada meydana gelmektedir (Singh & Montgomery, 2011).

Siyanobakteriler, ışıktan enerji emebilen fikobilinler, karotenoidler ve çeşitli klorofil formları gibi fotosentetik pigmentleri kullanabilir. Heterotrofik prokaryotlardan farklı olarak siyanobakteriler iç zara sahiptir. Bunlar, fotosentezin gerçekleştirildiği tilakoid adı verilen keselerdir. Yeşil bitkiler gibi fototrofik ökaryotlar, dünyadaki canlı yaşamın ilk biyokimyasal süreçlerinde endosimbiyoz adı verilen bir süreç yoluyla, siyanobakterilerden geldiği düşünülen plastidler yoluyla fotosentez gerçekleştirir. Ökaryotik hücre tipine sahip bu endosimbiyotik siyanobakteriler daha sonra evrimleşmiştir ve toplu olarak plastidler olarak bilinen kromoplastlar, kloroplastlar, etioplastlar ve lökoplastlar gibi özel organellere farklılaşmıştır (Jassim vd., 2023).

Siyanobakterilerin sitoplazmasında, glikojen granülleri, karboksizomlar (çok yüzlü cisimler), polifosfat (volutin) granüleri ve gaz vakuolleri bulunmaktadır (Castenholz, 2015). Tek hücreli ve koloni oluşturan çoğu siyanobakteride ve bazı ipliksi morfolojideki formlarda hücre bölünmesi ikili bölünme şeklinde gerçekleşir. Hücre dışı ve hücre dışındaki mevcut hareketlilik ile ilgili olarak birçok siyanobakteride fimbria bulunur. Koloniyal, tek hücreli ve ipliksi siyanobakterilerin birçoğu dış zarlarının dış bölgesinde bir "zarfa" sahiptir. Bu zarf birçok spesifik özellikte glikokaliks, kapsül veya kılıf olarak ifade edilir. Ya da kıvamına bağlı olarak müsilaj olarak adlandırılabilir. Kılıfların önemli bir özelliği ise mikrofibriler bir yapı olmasıdır. Bu altyapı kılıfların birçoğunda bulunmaktadır (Castenholz, 2015; Chorus & Bartram, 1999; Mehdizadeh & Peerhossaini, 2022; Vidal vd., 2021).

Pigmentler, endüstriyel olarak çeşitli materyalleri renklendirmek için kullanılan yoğun renkli bileşiklerdir. Bu doğrultuda ticari açıdan sentezlenen pigmentlere olan talep artmakta ve bunların üretimi küresel biyoekonomi yaklaşımlarına dahil edilebilmektedir. Doğal pigmentler mikroalgler, makroalgler, siyanobakteriler, bakteriler, hayvanlar ve

bitkiler tarafından üretilir. CO_2'i ve güneş enerjisini yakalayıp amino asitler, şekerler, lipitler ve pigmentler gibi çeşitli biyokimyasal bileşikleri sentezleyen fototrofik mikroorganizmalar olan prokaryotik siyanobakterilerin keşfedilmemiş çok büyük bir biyolojik çeşitliliği vardır. Siyanobakteriler, çeşitli pigmentler oluşturan fotoototrofik prokaryotlardır. Farklı renkler sergileyen pigmentler, klorofiller (klorofil a, b, d ve f), karotenoidler (β-karoten, lutein, likopen, astaksantin, fukoksantin), fikobiliproteinler (fikoritrin, fikosiyanin ve allofikosiyanin) ve sitonemindir (Mandal vd., 2020).

Siyanobakterileri de dahil ettiğimizde bakteriler çeşitli çevresel koşullara maruz kalır ve çeşitli habitatlarda optimal koşullarda hayatta kalmaları için çeşitli adaptasyonlar geliştirirler. Bu amaç uğruna veya farklı çevresel etkiler ve stres koşulları altında bir savunma mekanizması geliştirip, büyümeyi ve üremeyi desteklemek için mevcut kaynakları tamamen kullanmak üzere morfolojilerini değiştirebilirler (Young, 2006, 2007).

Siyanobakteriler, çeşitli ortamlarda hayatta kalabilme adaptasyonları nedeniyle önemli bir ikincil metabolit kaynağıdır. Stres koşullarına göre farklı bileşik sınıfları arasında yüksek derecede yapısal varyasyonla farklı ikincil metabolit paketleri üretilebilir. Bu metabolit grupları şunları içerir; poliketidler, peptitler, alkaloitler, terpenoidler ve UV emiciler. Yırtıcı hayvanlara ve otlayanlara karşı savunma, kemosensör, fotokoruma ve antioksidan roller gibi hücresel yapılarını korumak için farklı biyolojik gelişimlere sahip olabilirler. Bu özellikler endüstriyel biyoteknolojide nutrasötikler, kozmesötikler ve farmasötikler olarak da kullanılabilir (Kultschar & Llewellyn, 2018).

Bu adaptasyonlar, çevreden gelen uyartılara, dalgalanmalara karşı uyum sağlama tepkilerini ve gelişime yönelik modifikasyonları ya da hücre farklılaşması gibi genetik olarak değişen uzun süreli yanıtları içerir. İpliksi siyanobakteriler üç farklı yaygın bilinen gelişimsel hücre tipine sahiptir. Bu hücre tipleri vejetatif hücrelerden farklılaşır ve heterosistler, akinetler ve hormogonyum olarak adlandırılır (Kumar vd., 2010; Singh & Montgomery, 2011).

2.2. Siyanobakterilerin Çevresel Etkileşimleri

N (Azot), P (Fosfor), organik madde ve diğer besinler suda zenginleştiğinde siyanobakteriler çoğalır ve baskınlık oluşturarak gruplar halinde birikirler. Tatlı su veya

denizde yeşil, kırmızı-kahverengi ve kırmızı oluşturan siyanobakteri çoğalmaları, ötrofikasyonun en dikkate değer semptomlarından biridir (Paerl, 1988).

Siyanobakteriler çoğaldığında sayı olarak fazlaca ölü siyanobakteri su koşullarında dibe çöker. Çöktüğü anda ayrışarak oksijen tüketmeye başlar. Bu durum da sudaki çözünmüş oksijeni (DO) azaltmaktadır. Çözünmüş oksijenin azalması sudaki canlıların yaşam koşullarını etkileyerek kabuklu deniz hayvanlarının, çeşitli omurgasızların, balıkların ve bitkilerin yok olmasına sebebiyet verebilir (Li, 2021).

Siyanobakterilerin çeşitli faunalarda aktivite göstermeleri sırasında metabolik atık ürünü olan çözünmüş organik madde (COM) ortama salınır. Gerçekleşen reaksiyonun ilerlemesi ile bir dizi kimyasal reaksiyon daha meydana gelir. Bunun başında çözünmüş organik karbon (DOC), çözünmüş inorganik karbona dönüşmektedir. Dönüşümün ardından miktarın büyük çoğunluğu bozunuma karşı korunaklı humusa dönüşür. Bu humus yapısıyla birlikte su şeffaflığında özellikle göllerdeki P konsantrasyonunun olumsuz bir etkisi olduğu da açığa çıkmıştır (Zhang vd., 2022).

Siyanobakteriler, miktarını 10^5 hücre/mL'ye ulaştırdığında ya da klorofil konsantrasyon miktarını 10 mikrogram/mililitreye ulaştırdığında siyanobakterilerin miktarında aşırı artış meydana gelir. Bu çoğalmalara bloom adı verilir (Fanxiang vd., 2009). Siyanobakterilerin aşırı çoğaldığı durumlara dünya çapında birçok ötrofik ile hipertrofik göl ve nehirlerde rapor bildirilmiştir (Rastogi vd., 2014).

Deniz ve tatlı su ekosistemlerinde yaşayan siyanobakteriler toksin adı verilen bir tür sekonder bileşik bileşik üretir. Bu toksik maddelerin suda yaşayan organizmalara, evcil ya da yabani hayvanlara ve insanların sağlığına ciddi etkileri vardır. Canlılarda meydana gelen siyanobakteriyel toksin zehirlenmeleri, siyanobakterilerin doğrudan tüketilmesi ya da toksin oluşumlarının meydana geldiği suların tüketilmesinden kaynaklanmaktadır.

Siyanobakterilere ait farklı spesifik etkilerdeki toksisite mekanizması, siyanobakterilerin aşırı çoğalması ve toksinlerin üretimlerinin miktarı ile doğru orantılıdır. Siyanobakterilerin artışının bir ürünü olan siyanotoksinlerin biyosentezi, pH, kısa dalga boyu radyasyon, sıcaklık, besinler, ışık yoğunluğu gibi abiyotik faktörlerden etkilenmektedir (Häder vd., 2014; Neilan vd., 2013; Rastogi vd., 2014, 2015).

2.3 Siyanobakteri Toksinleri

Siyanotoksinler toksikolojik hedefleri açısından sitotoksinler, dermatotoksinler, hepatotoksinler ve nörotoksinler olarak incelenmektedir (Bláha vd., 2009; Wiegand & Pflugmacher, 2005). Kimyasal yapılarına göre ise siyanotoksinler, birkaç ana gruba ayrılmaktadır. Bunlar; alkaloitler (heterosiklik bileşikler), peptitler ve lipidik bileşiklerdir. Lipopolisakkaritler siyanobakterilerin ayrılmaz bir bileşenidir. Bazı toksik etkilere sahip olmasından dolayı siyanotoksinler içerisinde sayılmaktadır (Chorus & Bartram, 1999).

2.3.1. Kimyasal Yapılarına Göre Siyanotoksinler

2.3.1.1. Siklik Peptitler

Silik peptitler, karboksil terminalleri, amino terminalleri ve onların yan zincirleri ya da yan zincirler ile başka bir yan zincir arasındaki kovalent bağlantı doğrultusunda oluşan bir polipeptit zinciridir. Nodularinler ve Mikrosistinler (MC'ler) en klasik iki siklik peptit yapısında siyanotoksindir (Du vd., 2019).

Siklik peptitler yapısal olarak küçük moleküller olup, doğrusal yapıdaki toksik bileşiklere göre 100 kat daha fazla toksik oldukları bilinmektedir. Pek çok siklik peptit yapıdaki toksin, hidrofilik karaktere sahiptir. Bu sebeple genellikle omurgalıların hücre zarından geçememektedir. Bu doğrultuda enerji gerektiren taşıma sistemleri ile hücre içine alınmaktadır (Kotak vd., 1995).

2.3.1.2. Alkaloidler

Alkaloidler temelde azot içeren organik bileşiklerdir. Yapı ve tür olarak incelendiğinde farklılıklar göze çarpmaktadır. Bu sebeple farklı alkaloidlerin özellikleri de spesifik ölçüde değişmektedir. Birçok alkaloid karmaşık bir döngüsel yapıyla bilinir. Anatoksinler (anatoksin-a, ATX-a), saksitoksinler (STX'ler), slindrospermopsinler (CYN'ler), lyngbyatoksinler gibi toksinler alkaloid özellikte siyanotoksinler arasında örnek gösterilebilir (Du vd., 2019).

Anatoksinleri *Anabaena* ve *Oscillatoria* gibi birçok siyanobakteri üretmektedir. Postsinaptik depolarize edici etkisi nöromüsküler blokaj yapma yeteneği sağlamaktadır. Bu durum sinir sistemini doğrudan etkileyerek Na^+ kanallarının kapanmasını engelleyip sürekli açık kalmasını sağlar. Oscillatoria ve *Anabaena circinalis*'in ürettiği saksitoksinler, bu

alglerle beslenen deniz midyelerini toksin maruziyetine bağlı olarak zehirlemektedir. Saksitoksinler sinir sistemi üzerideki Na^+ kanallarını bloke edererek sinir impulslarının iletimini engellemektedir. Bir diğer alkaloid özellikte toksin olan slindrospermopsinin, Avustralya'nın subtropikal ve tropikal bölgelerinde içme suyuna bağlı olarak gelişen sağlık sorunlarına sebep olduğu bilinmektedir. Bu toksin Siklik Guanin-alkaloid yapısındadır ve hepatotoksik özelliktedir (Carmichael & Li, 2006; Negri vd., 1997).

2.3.1.3. Protein Olmayan Aminoasitler

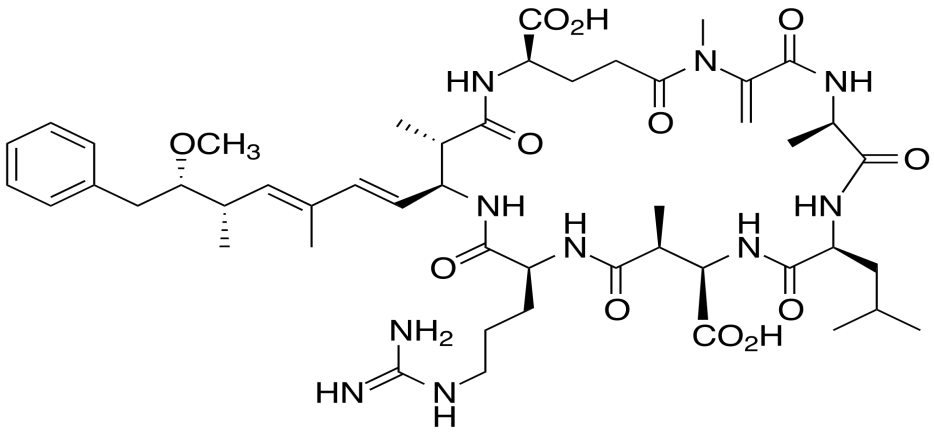
Protein oluşturmayan, amino ve karboksil gruplarını içeren doğal bileşikler protein oluşturmayan amino asitler olarak adlandırılır. Bunlar bitkilerde ve mikroorganizmalarda bulunan önemli biyoaktif maddelerden biridir. Siyanobakteriler protein olmayan bir aminoasit olan *β*-*N*-metilamino-L-alanin (BMAA) siyanotoksinini üretir. Bu toksin bir amino grubu, bir karboksil grubu ve bir metil-amino yan zincirine sahip karbondan oluşmaktadır (Buratti vd., 2017; Vega, 1967). Ayrıca BMAA'nın *p*-amino-*N*-metil alanin (BAMA), *N*-2-aminoetilglisin (AEG) ve 2,4-diaminobütirik asit (2,4-DAB) olmak üzere 3 yapısal izomeri tanımlanmıştır (Banack & Murch, 2018; Du vd., 2019).

2.3.1.4. Lipopolisakkaritler

Endotoksik özellikteki lipopolisakkaritler (LPS), aralarında siyanobakteriler de olmak üzere gram negatif bakterilerin hücrenin dış katmanının ayrılmaz bir bütünüdür. Lipopolisakkarit, Lipit A, çekirdek polisakkaritler ve bir dış polisakkarit zincirinden meydana gelir. Siyanobakterilerde bulunan Lipopolisakkaritler enterik bakterilere göre daha çeşitli uzun zincirli doymamış yağ asitlerine ve hidroksi yağ asitlerine sahiptir. Ayrıca bir diğer fark yaratan özelliği de fosfat içermemesidir (Martin vd., 1989; Wiegand & Pflugmacher, 2005). Dermatotoksik ve inflamatuar özellikleri nedeniyle LPS moleküllerine endotoksin veya tahriş edici toksinler de denilmektedir. Siyanobakteriyel LPS insanlarda cilt hastalıkları, gastrointestinal sorunlar, solunum yolu hastalıkları, ateş ve baş ağrısı gibi çeşitli rahatsızlıklara sebebiyet vermektedir (Msagati vd., 2006; Smith vd., 2008; Jakubowska & Szeląg, 2015).

2.4. Mikrosistin-LR (MC-LR)

Mikrosistinler (MC'ler), ilk defa *Microcystis aeruginosa* isimli siyanobakteriden izole edilmiştir (Azevedo vd., 1994). Beş protein olmayan amino aside ve iki değişken özellikte L-amino asit fonksiyonel grubu içerir (Şekil 2.1). Siklik bir yapıda olup literatürde bildirilen 279 karakterize edilmiş türdeşi vardır (Bouaïcha vd., 2019; Pravadali vd., 2023). En yaygın olarak bulunan ve literatürlerde rastlanan türdeşleri MC-RR ve MC-YR ve MC-LR'dir. Mikrosistinin bu türdeşleri spesifik olarak, arginin (R), Lösin (L) ve tirozin (Y) amino asitlerini içerir. Mikrosistin-LR, içlerindeki en toksik olan siyanotoksindir. İçme sularının sağlık açısından biyogüvenliğini sağlamak için Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından 1.0 ng mL^{-1} (1µg/l) kılavuz değeri belirlenmiştir (Pravadali vd., 2023; WHO., 2020).



Şekil 2.1. Mikrosistin-LR toksininin kimyasal yapısı

Mikrosistin-LR ile ilgili çalışmalara bakıldığında özellikle nörotoksik etkileri incelendiğinde toksisitesinin altında yatan çoğu moleküler mekanizma tam anlamıyla aydınlığa kavuşmuş değildir.

Enerji anlamında aktif olarak yüksek üretim sergileyen nöronlar genel olarak ATP (adenozin trifosfat) üretmek, endojen reaktif oksijen türlerinin üretimine aracılık etmek ve Ca^{+2} dengesini ve hücrelerin büyümesini sağlamak için binlerce mitokondri içerir (Nicholls & Budd, 2000). Bu işlevler spesifik olarak mitokondrinin bolluğu, sinaptik plastisite ve akson gelişimi ile ilişkili olup hücre içi düzenin sağlanması için çok önemlidir (Smith & Gallo, 2018; Todorova & Blokland, 2017; Zhang vd., 2020).

Oksidatif stres mikrosistin toksisitesiyle bağlantılı önemli bir biyokimyasal mekanizmadır. Mikrosistinlerin etkisiyle oluşan lipid membran yapılarının peroksidasyonu, apoptozun modülasyonu veya genotoksisite ciddi hücresel hasarlar oluşturabilir. Bu hasarı indükleyen mikrosistinler, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna katkı sağlayarak hasarın meydana gelmesini gerçekleştirir (Ding & Nam Ong, 2003). Araştırmacılar, daha önce MC-LR'nin insan nöroblastoma hücresi olan SH-SY5Y hücre hattı üzerinde cylindrospermopsin (CYN) toksiniyle kombinasyon halinde çalışmış ve nörotoksik etkileri konusunda insan nöroblastoma hücresindeki nöron hasarı hakkında ilk bilgiler verilmiştir (Hinojosa vd., 2019).

Özellikle yapılan bazı çalışmalar MC-LR'nin hipokampal nörotoksisiteyi ve nörofibriler yumaklar, senil plaklar ve korteks ve hipokampustaki nöron kaybıyla ifade edilen Alzheimer hastalığını (AD) indükleyebileceğini doğrulamıştır (Li vd., 2012; Van Gassen & Annaert, 2003). Hipokampus, temporal lobun derinliklerine gömülü karmaşık bir beyin yapısıdır. MC-LR'ye maruz kalınmasının ardından beyinde etkilenen birincil bölgedir (Anand & Dhikav, 2012; Kosaki vd., 2014; Wang vd., 2018).

MC-LR, hipokampusta ROS üretimiyle birlikte mitokondriyal DNA (mtDNA) hasarına neden olmaktadır (Wang vd., 2018). Mitokondri sürekli olarak fisyon, füzyon ve transporta maruz kalan bir organeldir. Mitokondri dinamiğinin bozulmasının, Parkinson hastalığı (PD), Alzheimer hastalığı (AD), Huntington hastalığı (HD) ve Amyotrofiklateral skleroz (ALS) gibi nörodejeneratif hastalıkları indükleyebileceğini öne süren çok sayıda kanıt vardır. Hasarlı iç zar yapıları ile parçalanmış mitokondri ile ortaya çıkan mitokondriyal morfolojik değişiklikler, AD modellerinin nöronlarında birçok kez tespit edilmiştir (Gao vd., 2017; Zhang vd., 2020; Zhu vd., 2013). Bu doğrultuda MC-LR'ye kronik maruz kalmanın, hipokampus ve serebral korteks arasındaki mtDNA bütünlüğünde farklı modifikasyonlara yol açabileceği düşünülmektedir. (Wang vd., 2018).

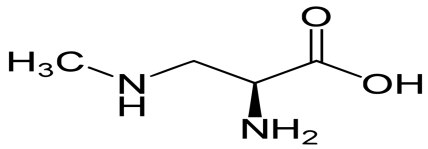
MC-LR'ın en önemli ana etki mekanizmalarından biri olan protein serin/treonin fosfatazların inhibisyonu, fosfoproteinlerin degredasyonuyla birlikte tümörün ilerlemesine ve glutatyon (GSH) seviyelerini azaltarak hücre apoptozuna yol açan bir etkiye neden olmaktadır (Hinojosa vd., 2019; MacKintosh vd., 1990). ROS düzeylerinin artmasıyla birlikte gerçekleşen nörodejeneratif hasar ve özellikle sıçanlarda MC-LR'nin sub-kronik düşük doz tedavisinin, nöronal dejeneratif değişikliklere ve hücre iskeleti ile ilişkili protein

Tau'nun hiperfosforilasyonuna yol açtığını ve sıçanlarda önemli hafıza ve bilişsel eksikliklere neden olduğu belirlenmiştir (Li vd., 2015). Bu durum nörotoksik etkiler açısından açık bir potansiyel ortaya koymuştur (Hinojosa vd., 2019). Bazı çalışmalar ise MC-LR'ın büyük hidrofilik yapısı nedeniyle organik anyon transport sisteminin bir çeşidi olan OATP1A2 kullanılarak kan-beyin bariyerinden taşındığını doğrulamaktadır (Feurstein vd., 2009; Fischer vd., 2005; Hinojosa vd., 2019; Menezes vd., 2013).

MC-LR'ın farelerde gerçekleştirdiği nörotoksik etkiler doğrultusunda kan beyin bariyerinin geçirgenliğinin arttırmasını sağlayan iki moleküler mekanizma vardır. Bunlar; MC-LR etkisiyle sıkı bağlantı noktalarının kırılması ve metaproteinaz-8 (MMP-8) ekspresyonunun indüklenmesidir (Nugumanova vd., 2023; Wang vd., 2019). Ayrıca bir dizi çalışmada MC-LR'ın nöronlardaki ubikuitin-proteazom sistemine ait fonksiyonları bozduğu ve bu durumunda nöronlardan a-sinüklein (α-sin) salınmasına yol açtığı ortaya çıkmıştır (Bougea, 2021; Goedert, 2001; Nugumanova vd., 2023).

2.5. *β-N*-metilamino-L-alanin (BMAA)

Siyanobakteriler tarafından üretilen birçok protein olmayan aminoasit β-N-metilamino-L-alanin (BMAA)'yı içermektedir (Şekil 2.2). Prensipte gıda ve içme suyu yoluyla özellikle insanlardaki protein sentezi mekanizmasını etkileyebilir. Proteinlerin katlanma süreçlerine dahil olarak yanlış katlanmış proteinlere sebep olabilir (Nugumanova vd., 2023; Song vd., 2017).



Şekil 2.2. β-N-metilamino-L-alanin (BMAA) toksininin kimyasal yapısı.

L-BMAA'nın proteinin yanlış birleşimi, protein katlanmasını ve bu doğrultuda yanlış katlanmış proteinlerin lizozomlarda art arda birikmesini etkileyebilir (Dunlop vd., 2013). Bu anormal protein sentezi mekanizmasının ayrıca L-BMAA'nın eksitotoksisite ve oksidatif stres gibi yüksek konsantrasyon etkilerinden, indirgeme/oksidasyon sistemlerinin serbest bırakılmasından ve bazı pro-apoptotik kaspazların aktivasyonundan bağımsız olarak endoplazmik retikulumda hücre stresine sebep olduğu varsayılmaktadır (Okle vd., 2013).

BMAA, bilişsel işlev ve nöromüsküler sinaptik iletimden sorumlu olan eksitatör glutamaterjik nöronlara zarar verir (Chiu vd., 2012). Bikarbonat varlığında metabolize edildikten sonra BMAA, nöronal glutamat reseptörlerini inhibe eden β-karbamat'a yapısal olarak benzemektedir (Richter & Mena, 1989). Glutamat sinaptik yarıkta kalarak eksitotoksisiteye neden olur, Ca^{+2} konsantrasyonunu arttırır ve hücre hasarına neden olur. Çeşitli organizmalarda yürütülen çalışmalarda, kas zayıflığı, ataksi, konvülsiyonlar ve diğer motor eksiklikler dahil olmak üzere BMAA toksisitesinin tutarlı semptomlarını göstermiştir (Goto vd., 2012; Liu vd., 2009; Myers & Nelson, 1990; Siesjö vd., 1989).

BMAA'ya maruz kalan nöronlarda kalsiyum akışında artışlar, sıçanlarda 5 mM'de ve farelerde 1 mM'de rapor edilmiştir (Brownson vd., 2002; Rao vd., 2006). BMAA'ya maruz kalma nedeniyle artan ROS üretimi, en düşük anlamlı etkinin 1 mM konsantrasyonda rapor edilmesiyle de tanımlanmıştır (Chiu vd., 2012). Özellikle, BMAA ile Alzheimer demansı (AD), Parkinson hastalığı (PD) ve amyotrofik lateral skleroz (ALS) dahil olmak üzere nörodejeneratif hastalıklar arasındaki ilişkiye dair son yıllarda yapılan çalışmalarda çeşitli bulgulara rastlanılmaktadır (Mello vd., 2018).

Nörodejenerasyon, merkezi sinir sisteminde (CNS) oksidatif stres, eksitotoksisite, glukotoksisite, DNA hasarı, protein birikimi ve apoptoz dahil olmak üzere çeşitli hücre hasar türlerini kapsar (Mello vd., 2018). BMAA, antioksidan glutatyonun tükenmesi ve sistein/glutamat taşınmasının tersine çevrilmesi dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar yoluyla nöral hücrelerde oksidatif hasara yol açar. Bu, motor nöron hasarı ile de doğrulanır; Düşük BMAA dozları, motor nöronlar üzerindeki AMPA reseptörlerini spesifik olarak hedefleyerek, glutamat eksitotoksisitesine ve takiben hücresel hasara neden olmaktadır (Haddad & Shan, 2009; Lobner vd., 2007; Rao vd., 2006).

BMAA'nın farelerde ve insan SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde kronik olarak uygulanmasının etkileriyle ilgili yapılan araştırmalarda ve bu siyanotoksin ile maruziyetin her iki sistemdeki birçok nörodejeneratif özelliğininin ifade edildiği bulunmuştur. Aslında BMAA'nın SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi vardır ve bu, TDP-43 ekspresyonunun artması ve sitoplazmik birikimle ilişkilidir. BMAA'ya maruz bırakılan fareler, toplam TDP-43 ve sitoplazmik ekspresyonda bir artış, omurilik ve motor kortekste apoptotik hücre ölümü ve astroglioz

ve zayıf motor koordinasyonu ve denge gibi davranışsal anormallikler ile karakterize edilen ALS ve Alzheimer benzeri bir fenotip sunmaktadır (Anzilotti, 2023; Mello vd., 2018; Muñoz vd., 2013; Salcedo vd., 2011).

2.6. Mikrosistin-LR ve BMAA' nın Spesifik Hücresel Etkileri

Son yıllarda artan ötrofikasyon ile gerçekleşen siyanobakteri çoğalmaları ile toksikolojik anlamda incelemeler artmıştır. Özellikle MC-LR ve BMAA potansiyel iki nörotoksin olarak göze çarpmaktadır. Bu doğrultuda in vitro ve in vivo çalışmaların önemi giderek artmıştır. Yapılan bir in vivo çalışmada MC-LR ve BMAA zebra balıklarında maruziyete uğratılmış ve incelenen protein profilinde ALS ile ilişkili protein TDP-43 106'nın yukarı regülasyonu (upregulation) da dahil olmak üzere nörodejenerasyonla tutarlı moleküler imzalar görülmüştür (Martin vd., 2020).

Apoptoz ve hücresel iltihaplanma, nörodejeneratif hastalıklar için spesifik özelliklerdir. Proinflamatuar sitokin TNF α'nın ekspresyonunun araştırıldığı bir çalışmada düşük dozlarda CYN, MC-LR VE BMAA gibi toksinlerin düşük doz tek tek ve karışım olarak maruziyetlerinin apoptoz ve inflamasyonu tetiklediği görülmektedir (Takser vd., 2016). Bir bakıma karışım halinde olan maruziyetlerde 3 ila 15 kat daha güçlü olduğu gösterilmiştir. Özellikle RAW246.7 fare makrofaj benzeri hücre dizisi, BV-2 hücre dizisi, N2a veya Neuro 2A fare hücre dizileri gibi bağışıklık ve beyin hücrelerinde inflamasyon ve apoptozun tetiklenme potansiyelinin yüksek olduğu bildirilmiştir (Takser vd., 2016).

SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre dizisi, biyokimyasal ve fonksiyonel özellikleri nedeniyle yaygın olarak kullanılan bir nöron modelidir ve nörotoksisite çalışmaları için oldukça uygundur. Üstelik bu hücre hattının farklılaşması, sağlıklı insan beyninde bulunanlara benzeyen fonksiyonel, biyokimyasal ve morfolojik olarak olgun nöronlar sağlar (Hinojosa vd., 2019). Bu nedenle, SH-SY5Y nöroblastoma hücresi, insan nöron hücrelerinde MC-LR'ın ve BMAA'nın neden olduğu olası hasarı değerlendirmek için çok uygun bir deneysel modeldir.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Ortamı

Bu tez çalışması, Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi (TÜTAGEM) laboratuvarları içerisinde gerçekleştirilmiştir.

3.2. Materyal

Saflığı ≥ %95 olan Mikrosistin-LR (MC-LR, Cas No: 101043-37-2) Cayman Chemical'dan (No: 10007188) temin edildi. Saflığı ≥ %98 olan β-N-methylamino-L-alanine hydrochloride (BMAA, Cas No: 16012-55-8) MedChemExpress'den (No: HY-W015546) temin edildi. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattı ile beraberinde kullanılan Tripsin EDTA ve Apoptoz kiti (Elabscience-E-CK-A211) TÜTAGEM bünyesinden temin edildi. Deneysel süreçlerde kullanılan Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Tespit Kiti Abcam (ab287839) firmasından temin edildi.

3.2.1. Hücre Kültürü için Besiyeri

SH-SY5Y gibi nöron temelli hücre hatlarının büyümesini ve gelişmesini teşvik etmek için yaygın kullanılan DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) kültür ortamı kullanıldı.

3.2.2. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Çizelge 3.1'de markası ile birlikte verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Cihazlar	**Markaları**
Santrifüj Cihazı	PrO-Research
Ters Mikroskop	Nikon
Vorteks	Dragon Lab
CO_2 İnkübatör	Panasonic
Flow Cytometry (Akan Hücre Ölçer)	Thermo Fisher
Biyogüvenlik Kabini	Faster
Çok Kanallı Otomatik Pipet	Eppendorf
Otomatik Pipet	Eppendorf
Soğutmalı Santrifüj Cihazı	HERMLE Labortechnik GmbH
Buzdolabı	Liebherr

3.3. Yöntem

3.3.1. Hücre Kültürü

Hücre Kültürü çalışmaları, laminar hava akışlı biyogüvenlik kabini içerisinde gerçekleştirildi (Şekil 3.1). Kültüre alınacak donmuş hücreler çözüldü. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattının kültürü için Dulbecco Eagle's Minimum Essential Medium (DMEM) besiyeri kullanıldı. Besiyeri 2 mM glutamin, 100 U/ml penisilin, %5 fetal sığır serumu ve 100 µg/ml streptomisin içermektedir. Hücreler, 75 cm^2'lik flasklara alınıp %5 CO_2 içeren 37 °C'lik etüvde 24 saat boyunca inkübe edildi. Hücre yoğunluğu %80-85 civarına ulaştığında hücreler, Tripsin/EDTA (%0,25'lik) ile çıkarılarak pasajlandı.



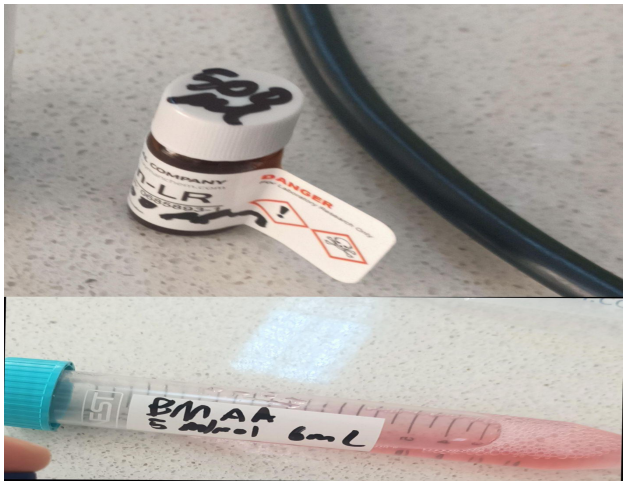
Şekil 3.1. Deneysel süreçlerin uygulandığı laminar akışlı biyogüvenlik kabini

3.3.2. Hücrelerin Pasajlanması

Hücre yoğunluğu yeterli miktara ulaştığında flask içerisindeki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırıldı. Hücreler PBS ile yıkandı. Ardından PBS uzaklaştırıldı. Yıkanmış olan hücreler Tripsin-EDTA ile muamele edildi. 5-10 dakika 37°C %5 CO_2'li inkübatörde bekletildi. Hücrelerin yüzeyden tamamen kalktığı teyit edildi. Tripsin-EDTA solüsyonunun iki katı kadar olacak şekilde besiyeri eklendi. FBS-Tripsin inhibisyonu sağlandı. Süspansiyon haline gelen karışım falkon tüpüne aktarıldı. 2500 rpm 5 dakika santrifüj edildi. Hücre peletine zarar vermeden süpernatant uzaklaştırıldı. Dipteki hücre peletine DMEM ile pipetaj yapılarak homojenize hale getirildi. Hücreler flaska aktarıldı. Besiyeri ile tamamlandı. Pasajlanan hücreler 37ºC'de %5 CO_2 içeren inkübatöre kaldırıldı.

3.3.3. Hücre Canlılığı ve Mitokondriyal Toksisite Testi (MTT)

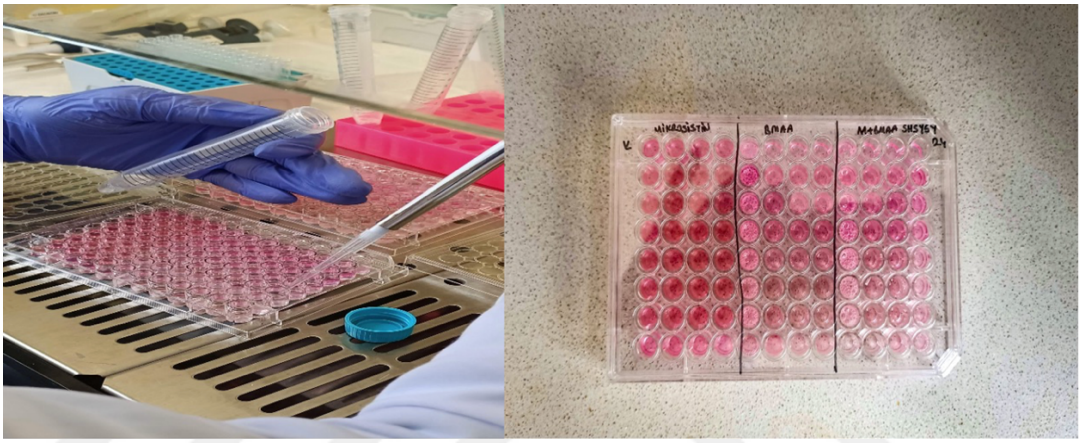
Hücre canlılığını belirlemek için 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) analizi kullanıldı. Toksisite modeli oluşturabilmek için ilk olarak MC-LR ve BMAA'nın stokları oluşturuldu. 500µg MC-LR, 500 µl etanol ile çözüldü. Çözülen MC-LR'dan 1000 ppm 500 µl ana stok oluşturuldu. BMAA'nın çözülmesi için DMEM kullanıldı. 4,65 mg BMAA tartılıp 6 ml'lik medyumda çözüldü. Totalde 5 mM 6 mL bir stok oluşturuldu (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Mikrosistin-LR ve BMAA için hazırlanan ilk stoklar

SH-SY5Y hücreleri, 96 kuyulu hücre kültürü kuyucuklu kaplarına (plate) ekildi. 24 saat boyunca 37°C'de nemli bir ortamda (%95 hava, %5CO_2) inkübe edildi. İnkübasyon süresinin ardından MTT testi için toksinlerin farklı konsantrasyonları

eklendi. Mikrosistin-LR için 10 µg/ml,5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 1,25 µg/ml, 0,625 µg/ml, 0,3125 µg/ml, 0,156 µg/ml; BMAA için 5 mM, 2,5 mM, 0,125 mM, 0,625 mM, 0,3125 mM, 0,156 mM, 0,079 mM; BMAA + Mikrosistin-LR karışımı için 2,5 µg/ml MC-LR + 2,5 mM BMAA, 1,25 µg/ml MC-LR + 1,25 mM BMAA, 0,625 µg/ml MC-LR + 0,625 mM BMAA, 0,3125 µg/ml MC-LR + 0,3125 mM BMAA, 0,156 µg/ml MC-LR + 0,156 mM BMAA, 0,079 µg/ml MC-LR + 0,079 mM BMAA, 0,039 µg/ml MC-LR + 0,039 mM BMAA olarak konsantrasyonlar uygulandı (Şekil 3.3). Ardından 24 saatlik inkübasyona bırakıldı.

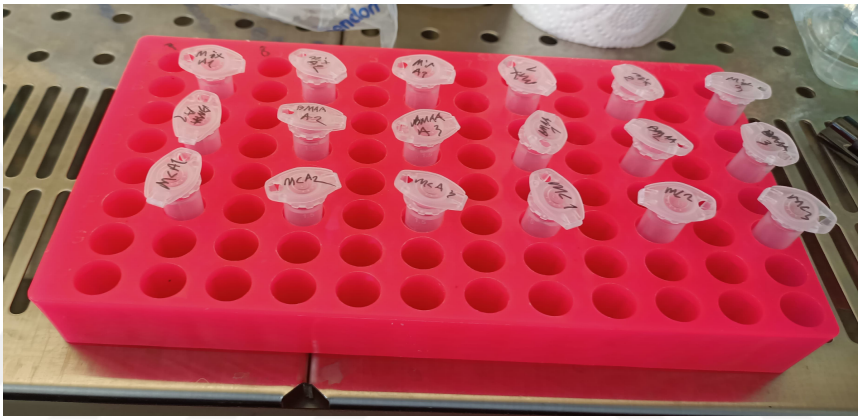


Şekil 3.3. MTT Analizi için maddelerin uygulanması.

3.3.4. Akış Sitometrisi (Flow Cytometry) Analizleri

Analizin yapılacağı Attune Focussing Cytometry Cihazı açıldı. Kalibrasyon yapıldı. Analizi yapılacak olan hücreler için cihaz programında gerekli ayarlamalar yapıldı. Cihazda çalışılacak parametreler cihaza tanıtıldı. Her bir uygulamada kontrol dahil 3 tekrar olacağından (MC-LR, BMAA, MC-LR+BMAA karışımı) 12 adet örnek (sample) oluşturuldu. Bu işlem hem Apoptoz hem de ROS başlığı altında 2 kez gerçekleştirildi. Ayrıca analiz sürecinde "unstaning control (herhangi bir işleme dahil olmamış hücreler)" olması gerektiğinden bu kontrol grubunun parametresi cihaza eklendi. Hücrelerin cihazdaki analiziyle oluşan saçılımların daha kararlı bir şekilde yorumlanması için kanallar (kapılar) olmalıdır. Apoptoz çalışmalarında BL3A VE BL4A kapılarında sonuçlar oldukça verimli çıkmaktadır. Apoptoz çalışmalarında quadran (kadran) incelenir ve histogramda ayrılan hücrelere bakılır. Histogramda pik görülmesi beklenilir.

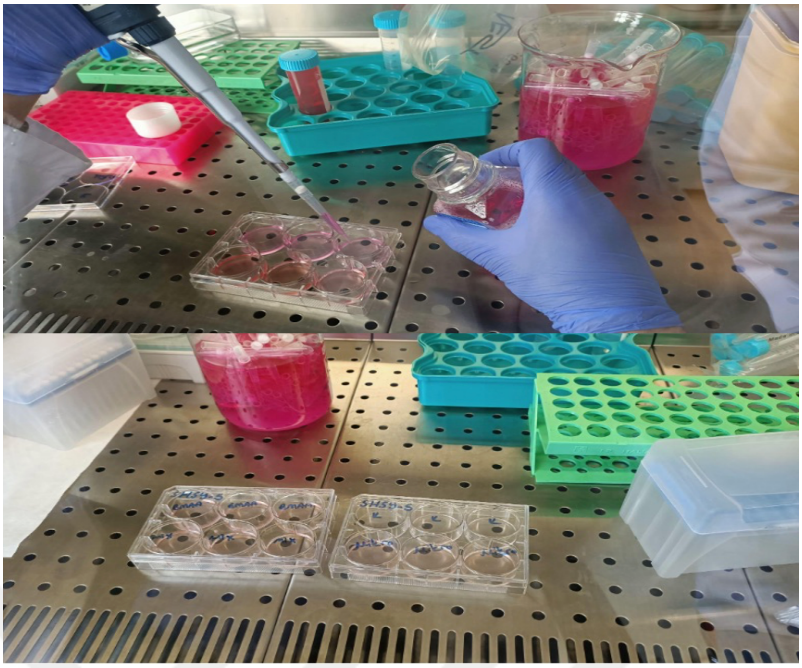
Hücrelere 2 farklı uygulama yapıldı. Hücreler Ros kit için medyum ile ve apoptoz kiti için Annexin V Binding Buffer ile dilüe edildi. Akış sitometresinde ilk olarak kontrol grupları çalışıldığından başlangıçta kontrol grubu hücreler hazırlandı. Ros kiti için C1R, C2R, C3R; Apoptoz kiti için C1A, C2A, C3A ve unstaining control için UCA, UCR şeklinde etiketlendi. Kontrol grubunun analizinin ardından eppendorf tüpleri apoptoz çalışması için MixA1, MixA2, MixA3, BMAA-A1, BMAA-A2, BMAA-A3, MCA1, MCA2, MCA3 olarak; ROS çalışması için Mix1, Mix2, Mix3, BMAA1, BMAA2, BMAA3, MC1, MC2, MC3 olarak etiketlendi. Toplamda 3'erli olarak MC-LR, BMAA ve Mix olarak toplam 9x2 adet ROS ve apoptoz çalışmaları hazırlandı (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Flow sitometri analizi için hücrelerin konulacağı eppendorf tüplerin hazırlanması.

3.3.4.1. Apoptoz Analizi

24 saatlik inkübasyonun sonunda, kuyucuklardaki toksin dozları uygulanan SH-SY5Y hücrelerine tripsin uygulaması yapıldı (Şekil 3.5) ve 1.5 ml'lik eppendorf tüplerine aktarıldı. Tüm tüpler, tripsini hücreden uzaklaştırmak için 300 G'de santrifüj cihazında 5 dakika santrifüj edildi. 5 dakikanın sonunda süpernatantlar peletten uzaklaştırıldı ve hücreler 500 µl 1× PBS' de yeniden süspanse edildi. Her numune için 200 µl 1x Annexin V bağlayıcı tampon, 2,5 µl Annexin V-FITCH ve 2,5 µl PI (propidyum iyodit) her numune için uygulanan 500 µl 1x PBS ve hücre karışımı ile karıştırıldı ve vortekslendikten sonra karanlıkta, oda sıcaklığında 15 dakika süreyle inkübe edildi. BL3-A ve BL4-A kanalları kullanılarak bir Applied Biosystems Attune akış sitometri (Flow sitometri) cihazında analiz edildi.



Şekil 3.5. Kontrol grubu ve IC50 dozlarına maruz bırakılan hücrelerin, 6'lı plakalarda (plate) tripsin ile muamele edilmesi.

3.3.4.2. ROS Analizi

Öncelikle madde uygulanmış SH-SY5Y hücreleri tripsinize edilerek 6 kuyulu plakalardan kaldırıldı (Şekil 3.5). Kaldırılan hücreler ayrı ayrı 1.5 mL eppendorf tüplere alınarak 500 G x 7,5 dakika santrifüj yapıldı. Eppendorf tüplerin dibinde pellet şeklinde toplanmış hücreler kaldırılmadan dikkatlice üst fazda bulunan süpernatant uzaklaştırıldı. Hücreler 2 kere 1x PBS ile 500g x 7.5 dk santrifüj yapılıp, vortekslenerek homojen hale getirildi. Bu sayede yıkanan hücreler ROS analizi yapılmak üzere hazır hale getirildi. Hücreler serum içermeyen 0.75 mL HAMS F12 besiyerine, toplam 10 mL besiyerinde 2µL DCFH-DA (ROS ajanı, 0.5-2µ molar konsantrasyonda) olacak şekilde süspanse hale getirildikten sonra 37°C'de 1-2 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon işlemi sonrasında hücrelerde meydana gelen ROS miktarlarının ölçümü, Applied Biosystems Attune akış sitometri cihazının BL1-H, BL-3H kanalları kullanılarak yapıldı (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Analizlerin yapıldığı Flow Sitometri Cihazı

3.4. İstatistiksel Analizler

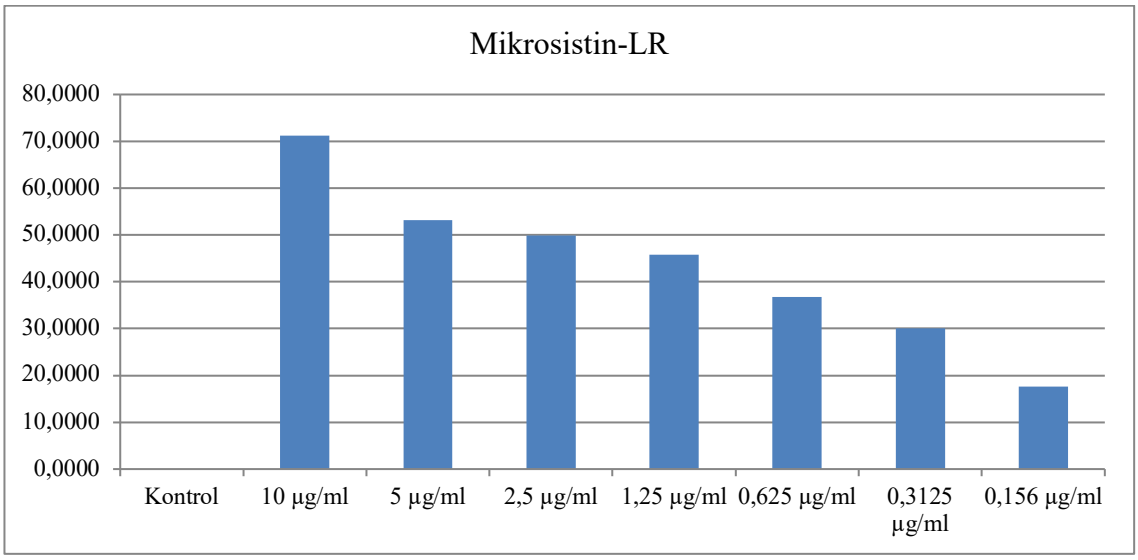
Çalışmamızda MTT testinde LD50 değerlerinin tespiti ve flow sitometri verilerinin analizi SPSS 22 (SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) yazılımı ile probit analizi ile yapılmıştır (n=4). Ortalama dozlar arasındaki canlılık farkı One-way ANOVA testi ve post hoc Duncan'ın çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirildi ($p<0.05$). Flow Sitometri analizlerine ait veriler One-way ANOVA testi, çoklu karşılaştırma testi ve robus testi ile değerlendirildi ($p<0.05$).

BÖLÜM 4

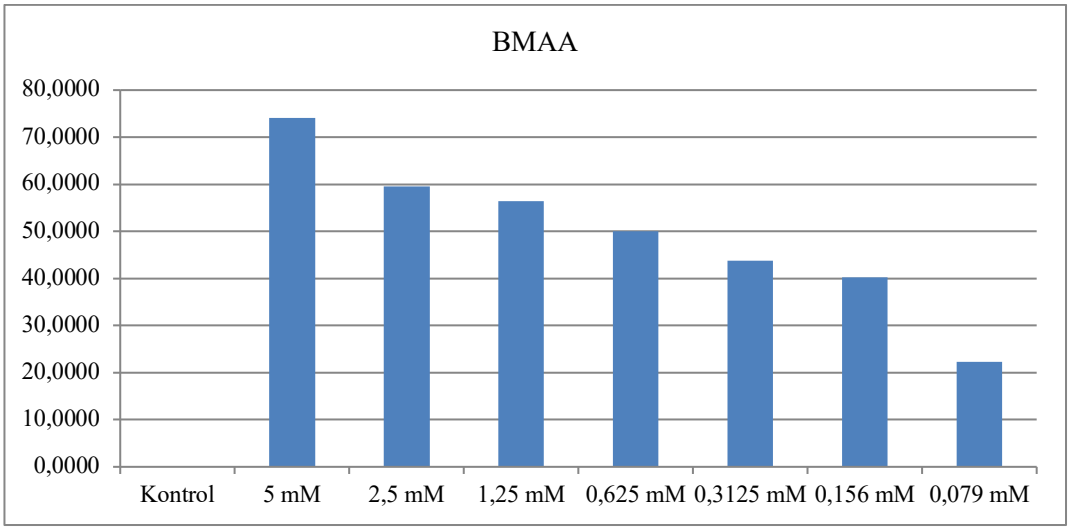
BULGULAR

4.1. MTT Testi

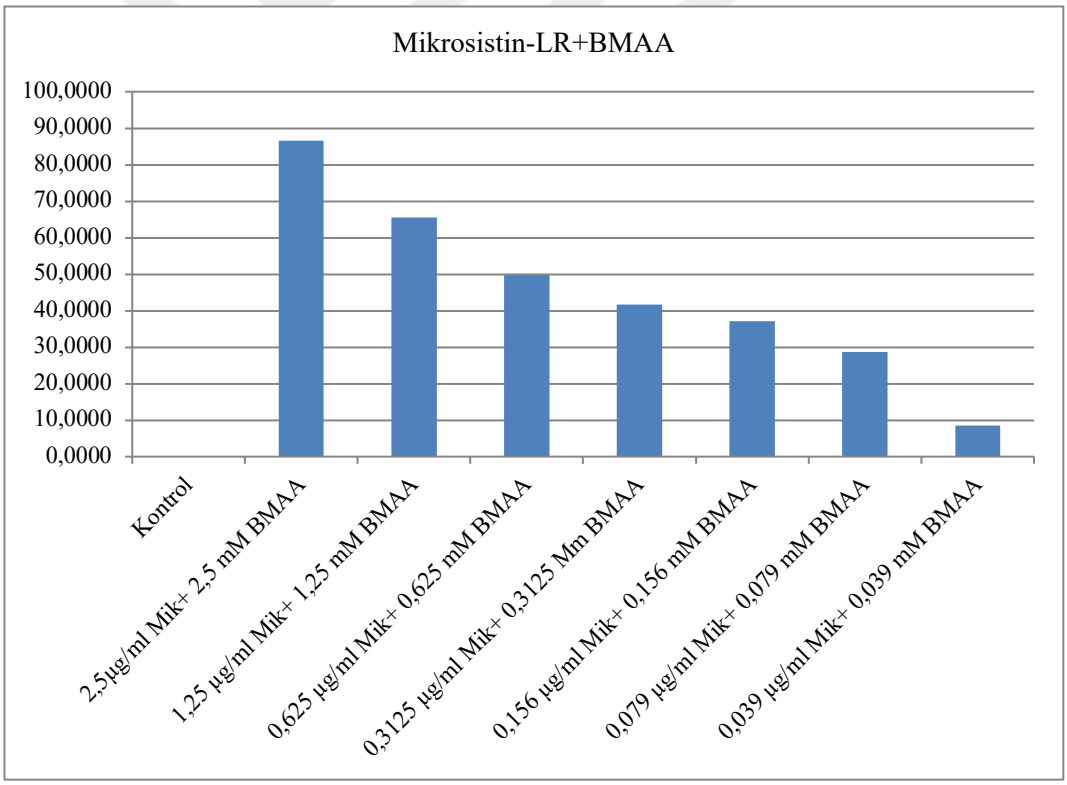
MTT deneyinde MC-LR için 0,156 µg/ml ile 10 µg/ml (Şekil 4.1), BMAA için 0,079 mM ile 5 mM (Şekil 4.2), BMAA + MC-LR karışımı için 2,5 µg/ml MC-LR + 2,5 mM BMAA ile 0,039 µg/ml MC-LR + 0,039 mM BMAA (Şekil 4.3) aralıklarında değişen konsantrasyonlar uygulandı. İstatistik hesaplarıyla beraber IC50 değerleri belirlendi. Bu değerler MC-LR için 2,238 µg/ml; BMAA için 0,655 mM; MC-LR + BMAA karışımı için 0,418 µg/ml + 0,418 mM olarak belirlendi. Dozlar arasında kontrol grubuna göre anlamlı bir fark ortaya çıktı ($p<0.05$).



Şekil 4.1. SH-SY5Y nöroblastoma hücresine uygulanan farklı Mikrosistin-LR dozlarında % canlılık verilerine ait sonuçlar ($p<0.05$).



Şekil 4.2. SH-SY5Y nöroblastoma hücresine uygulanan farklı BMAA dozlarında % canlılık verilerine ait sonuçlar ($p<0.05$).



Şekil 4.3. SH-SY5Y nöroblastoma hücresine uygulanan farklı Mikrosistin-LR ve BMAA karışımı dozlarında % canlılık verilerine ait sonuçlar ($p<0.05$).

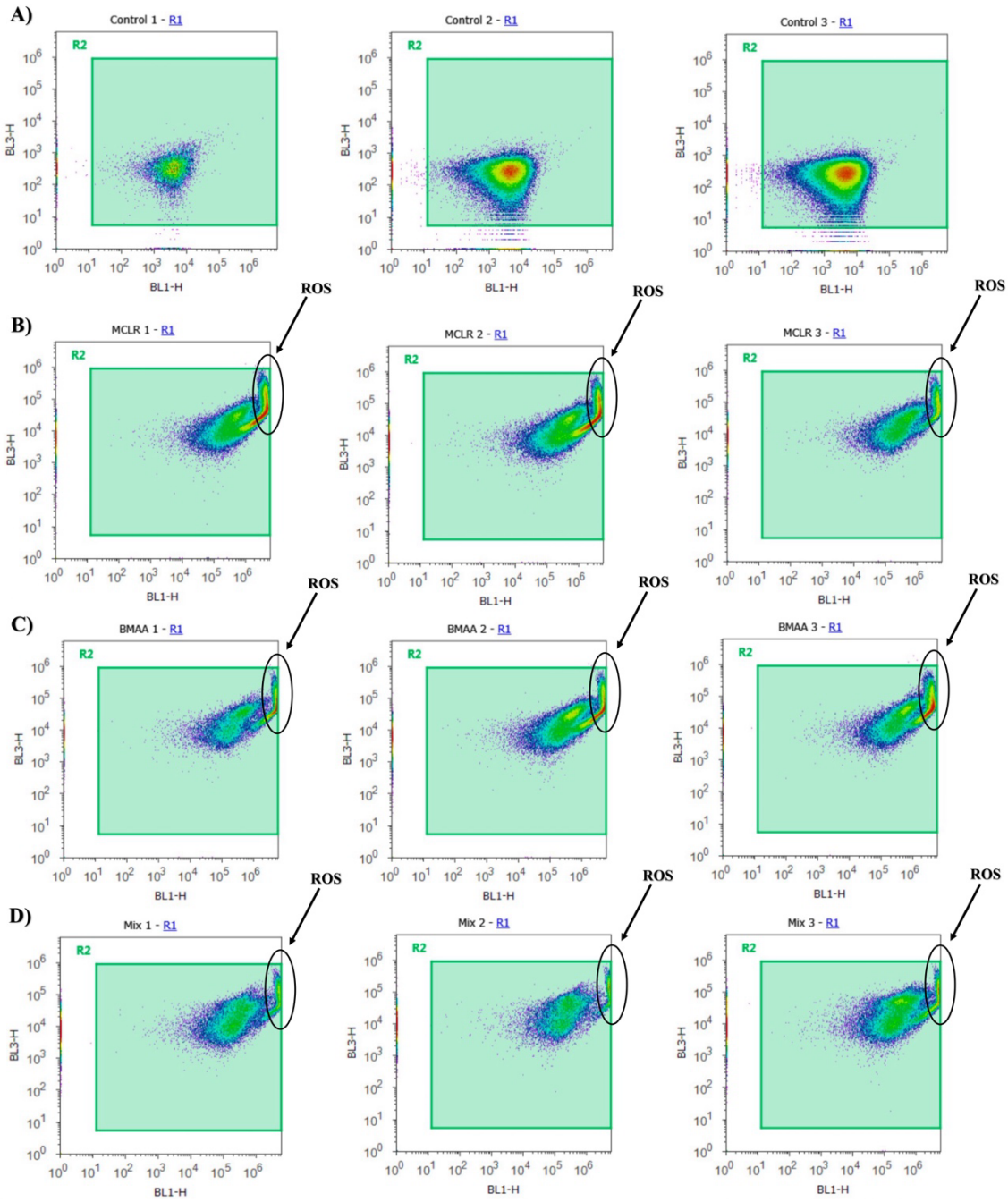
4.2. Flow Sitometri Analizleri

4.2.1. ROS Analizi

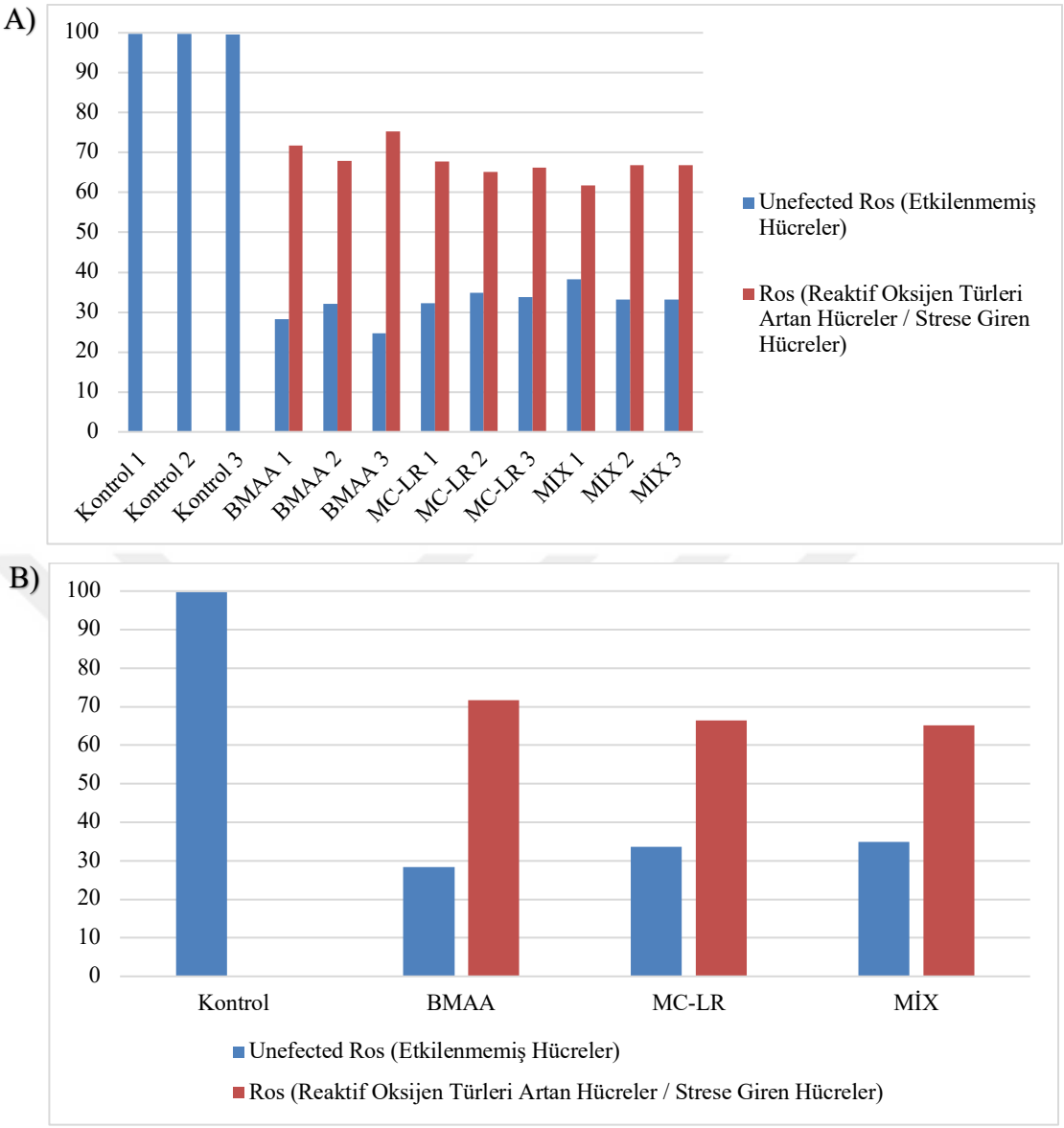
SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri, reaktif oksijen türleri (ROS) seviyelerini belirlemek amacıyla ROS kiti kullanılarak analiz edildi. Analiz, ilk olarak herhangi bir toksin uygulanmadan yapılan kontrol grubu ölçümleri için gerçekleştirildi.

Her hücreden yayılan floresan sinyali, hücre içindeki ROS seviyelerini temsil etmektedir. Kontrol grubu hücreleri herhangi bir toksin veya dış etkiye maruz bırakılmamış olup, doğal ROS seviyelerini belirlemek için kullanıldı. Flow sitometri analizinde, hücrelerin ROS seviyeleri histogram ve nokta grafikleri (dot plots) ile görselleştirildi. Flow sitometri yöntemiyle elde edilen veriler BL1-H, BL3-H kapılarında değerlendirildi. Kontrol grubu hücrelerinin çoğunluğunun minimal ROS seviyeleri sergilediği gözlemlendi (Şekil 4.4). Bu durum doğal hücresel süreçlerin düzgün işlediğini ortaya koymaktadır. BL1-H ve BL3-H kapılarında, hücrelerin doğru bir şekilde işaretlendiği ve boyanın beklenen yoğunlukta olduğu gözlemlendi. Bu, deneyin tutarlılığını ve ROS ölçüm sonuçlarının doğruluğunu teyit eder. Buradaki veriler toksinlerin uygulandığı diğer deney grupları ile yapılan karşılaştırmalar için sağlam bir referans noktası sağladı (Şekil 4.5).

SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri MC-LR, BMAA ve MC-LR + BMAA karışımı ile oluşturulan 24 saatlik toksin maruziyetlerinin ardından reaktif oksijen türleri (ROS) seviyeleri ROS kiti kullanılarak flow sitometri ile analiz edildi. Elde edilen veriler BL1-H ve BL3-H kapılarında değerlendirildi.



Şekil 4.4. Ros Analizine ait flow sitometri sonuçları. A) Kontrol grubu hücreleri, B) MC-LR etkin dozuna maruz bırakılan hücrelere ait ROS sonuçları, C) BMAA etkin dozuna maruz bırakılan hücrelere ait ROS sonuçları, D) Mikrosistin-LR+ BMAA karışımına maruz bırakılan hücrelere ait ROS sonuçları (kadranın sağ tarafına toplanan hücre topluluklarında oluşan ROS artışı, ok ile gösterildi).



Şekil 4.5. Gruplar Arası Oksidatif Stres (%) Grafiği. A) Deney grupları içerisindeki tüm deney tekrarlarının ROS dağılımı. B) Toplam ROS seviyeleri ($p<0.05$).

MC-LR, BMAA, MC-LR + BMAA dozlarına maruz kalan nöroblastoma hücrelerinin FLOW sitometri analizi sonucunda etkin dozların hepsinde ROS seviyelerinde belirgin bir artış gözlemlendi (Şekil 4.4). İşaretlenen hücrelerle ölçülen floresan yoğunluğunun histogramda sağa doğru kayması, oksidatif stresin yüksek olduğu hücrelerin oranındaki artışı ifade etmektedir (Şekil 4.4.; B-C-D).

Deney grupları ile kontrol grupları arasındaki ROS seviyelerinde anlamlı bir farklılık vardır (Şekil 4.5.; A). Toksin maruziyetleriyle birlikte etkilenmemiş sağlıklı hücrelerin sayıları tüm gruplarda belirgin olarak düştüğü gözlemlendi (Şekil 4.5.; A).

24 Saatlik IC 50 dozlarına (Mikrosistin-LR 2,238 µg/ml; BMAA için 0,655 mM; Mikrosistin-LR + BMAA karışımı için 0,418 µg/ml + 0,418 mM) maruz bırakılan SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerine ait toplam ROS aktiviteleri incelendiğinde en yüksek ROS seviyesinin %71,699 ile BMAA siyanotoksin maruziyetine ait olduğu gözlemlendi. MC-LR siyanotoksinine ait uygulamanın %66,363'lük bir oranla BMAA'ya göre düşük olduğu görülmektedir. BMAA-Mikrosistin-LR karışımı %65,144'lük ROS seviyesi ile toksinlerin tek başına maruziyetlerine göre daha düşük olduğu gözlemlendi. Bu süreçte kontrol grubundaki %0,00003'lük minimal ROS seviyesi deney gruplarının başarısını doğrulamaktadır (Şekil 4.5.; B).

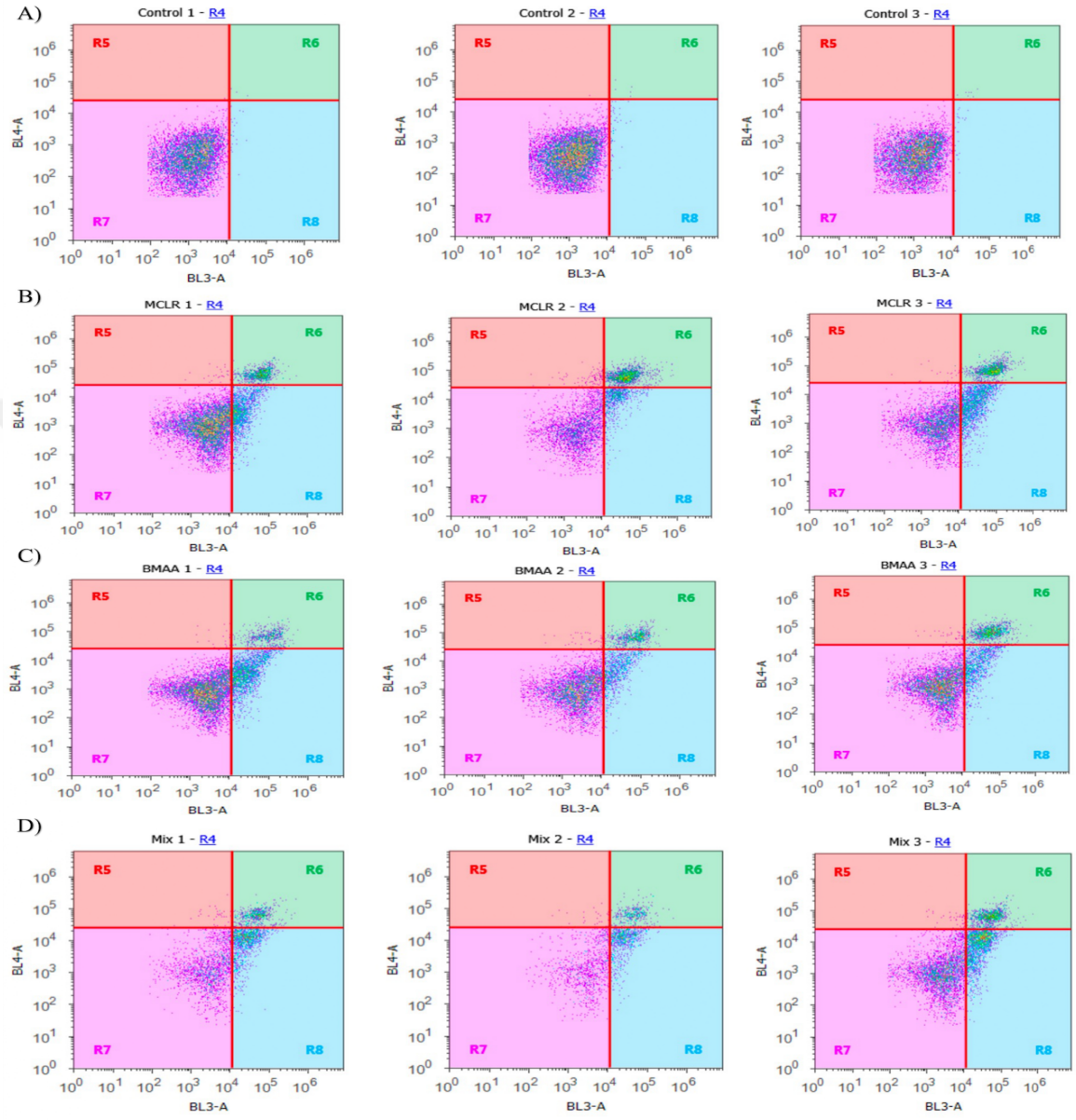
Elde edilen bu ROS seviyelerindeki değişimler Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların gerçekleşmesi için zemin hazırlamaktadır. ROS artışındaki biyokimyasal prosesler hücrelerin apoptoza gitme ihtimallerini arttırmaktadır. Oksidatif stres artışı ve Apoptoz oluşumu nörodejeneratif hasar için önemli belirteçlerdir. Bu doğrultuda nörodejeneratif bağlantılar için önemli bir diğer analiz için Apoptoz kiti kullanılmıştır.

4.2.2. Apoptoz Analizi

Mikrosistin-LR, BMAA ve Mikrosistin LR + BMAA toksinlerinin SHSY5Y nöroblastoma hücresindeki etkilerini belirlemek için flow sitometri analizi kullanılmıştır. Bu analizde, özellikle belirlenen kanallarda (kapılarda) gözlemlenen değişiklikler, hücrelerdeki apoptotik süreçlerin varlığını ve yoğunluğunu yansıtmaktadır.

Tez çalışmasında SH-SY5Y nöroblastoma hücresine ait kontrol grubunda apoptoz kiti uygulaması ile elde edilen sonuçlar, Annexin V ile boyanmış (işaretlenmiş) hücrelerinin boyutu veya kompleksitesinde bir değişiklik olmadığını göstermektedir. İşaretlenen kadran alana bakıldığında kontrol hücrelerin DNA bütünlüğünde bir değişiklik olmaması ile bağlantılı olarak yüksek bir apoptoz indüksiyonunun olmadığı ve apoptotik sürecin minimal düzeyde seyrettiği gözlemlendi. BL3A ve BL4A kapılarının oluşturduğu alan

incelendiğinde hücrelerin sitoplazmik yapısında değişiklik olmamasıyla birlikte hücrelerin sağlıklı olduğu ve apoptotik yolağa girmedikleri gözlemlendi (Şekil 4.6A).



Şekil 4.6. Apoptoz analizine ait flow sitometri sonuçları. A) Kontrol Grubu Hücrelerine ait sonuçlar, B) MC-LR maruziyetine ait sonuçlar, C) BMAA maruziyetine ait sonuçlar, D) MC-LR+BMAA maruziyetine ait sonuçlar (Dağılım grafiklerinde sol alt kadran etkilenmemiş canlı hücreleri; sağ alt kadran: erken apoptotik hücreleri; sağ üst kadran: geç apoptotik hücreleri; sol üst kadran: nekrotik hücreleri ifade eder.) dağılım grafiğinde verilmiştir.

Grafiklerdeki veriler, nöroblastoma hücrelerinde apoptoz (programlı hücre ölümü) sürecinin incelenmesine olanak sağlamaktadır. Gözlemlenen noktaların dağılımı

ve yoğunluğu, kontrol ve deney grupları arasında apoptoz oranlarının karşılaştırılmasına olanak tanımaktadır. Toksinlerin uygulanmasının ardından, hücrelerin morfolojik özelliklerinde belirgin değişiklikler meydana gelmiştir. Bu değişiklikler, tüm toksin gruplarında belirgin olarak gözlemlenmiştir (Şekil 4.6).

Mikrosistin-LR 2,238 µg/ml; BMAA için 0,655 mM; Mikrosistin-LR + BMAA karışımı için 0,418 µg/ml + 0,418 mM olarak 24 saat boyunca SH-SY5Y hücreleri IC50 dozlarına maruz bırakıldı. Kontrol grubuyla kıyasladığımızda anlamlı sitotoksik etkilerin meydana geldiği gözlemlendi (Şekil 4.6).

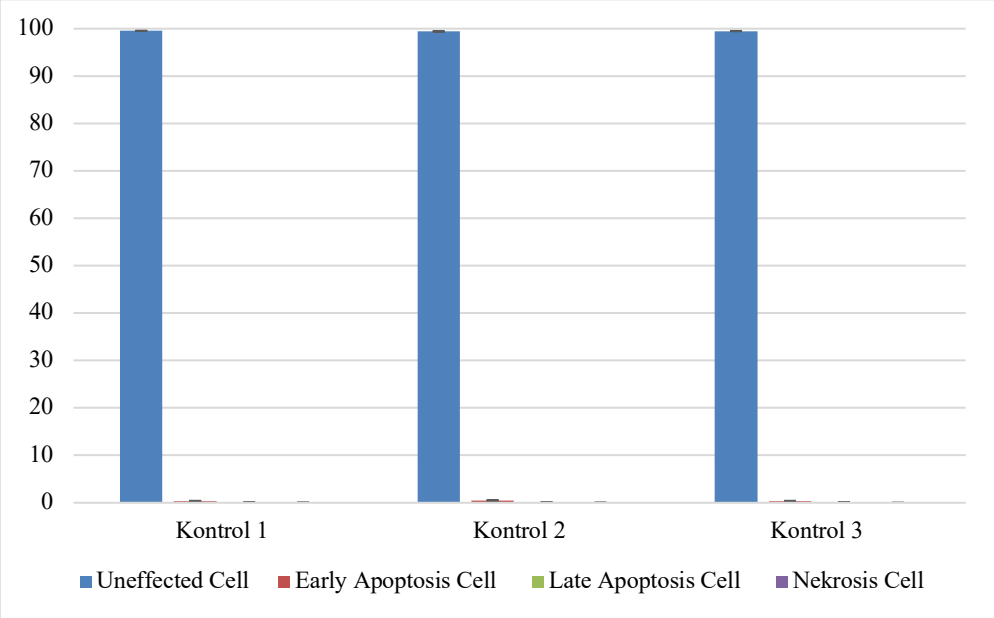
Sağlıklı hücre sayılarındaki azalış belirgin olarak ifade edilmektedir. Apoptoz sürecinin başlamasıyla, hücrelerde DNA bölünmesi ve parçalanması gibi muhtemel değişiklikler meydana gelmektedir. BL3A kapısıyla ve BL4A kapısıyla ayrılmış alanlarda gözlemlenen hücre toplulukları; etkilenmemiş canlı hücreleri, erken apoptotik hücreleri, geç apoptotik hücreleri ve nekrotik hücreleri etkin bir biçimde göstermektedir (Şekil 4.6). Bu değişiklikler 24 saatlik inkübasyonun ardından SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinin toksinlerin etkisiyle apoptotik yolağın içinde ilerlediği ve hücre ölümü sürecine girdiğini ifade eder.

Kontrol grubundaki apoptotik aktivite minimal düzeyde, hücrenin kendi biyokimyasal aktiviteleriyle sınırlı kalmıştır. Tekrarlanan kontrol çalışmalarında hücrelerin canlılık oranları kendi içerisinde anlamlı ve benzerdir (Şekil 4.7).

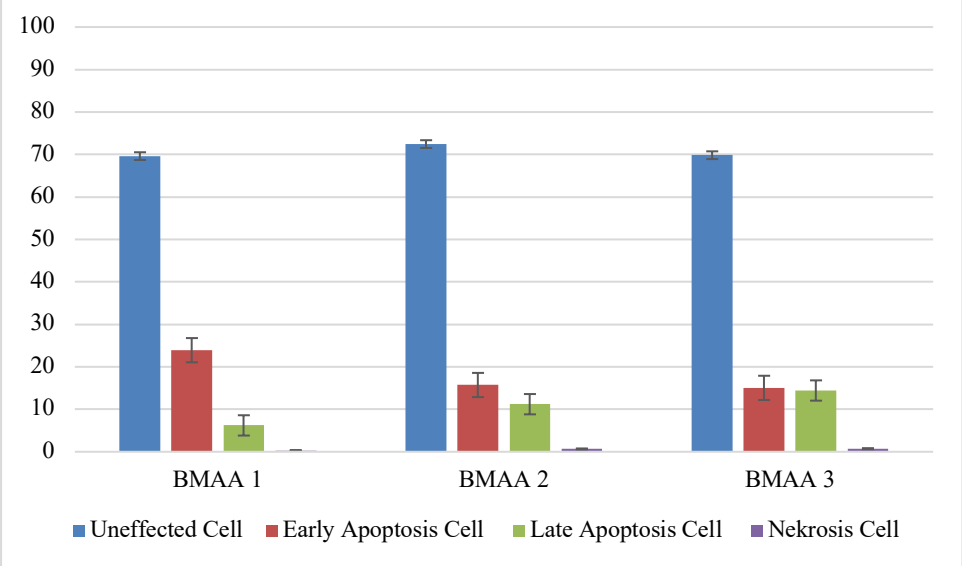
24 saatlik 0,655 mM BMAA maruziyetinin ardından kontrol grubuna göre nöroblastoma hücrelerindeki sağlıklı hücrelerin azaldığı görülmektedir. Hücrelerdeki erken apoptoz noktası geç apoptoza göre yüksek olup her iki apoptotik süreçte artış meydana gelmiştir. Apoptotik süreçle birlikte minimal düzeyde nekroza girmiş hücreler görülmektedir (Şekil 4.8).

24 saatlik 2,238 µg/ml Mikrosistin-LR maruziyetinin ardından kontrol grubuna göre sağlık hücrelerde azalma görülmektedir. Bu azalma apoptotik sürecin göstergesidir. Hücrelerdeki erken apoptotik ve geç apoptotik süreçlerde artış meydana geldiği görülmektedir. Apoptotik süreçlerin bir sonucu olan nekrotik hücreler Mikrosistin-LR maruziyetiyle genel olarak düşük seviyelerde tespit edilmiştir (Şekil 4.9).

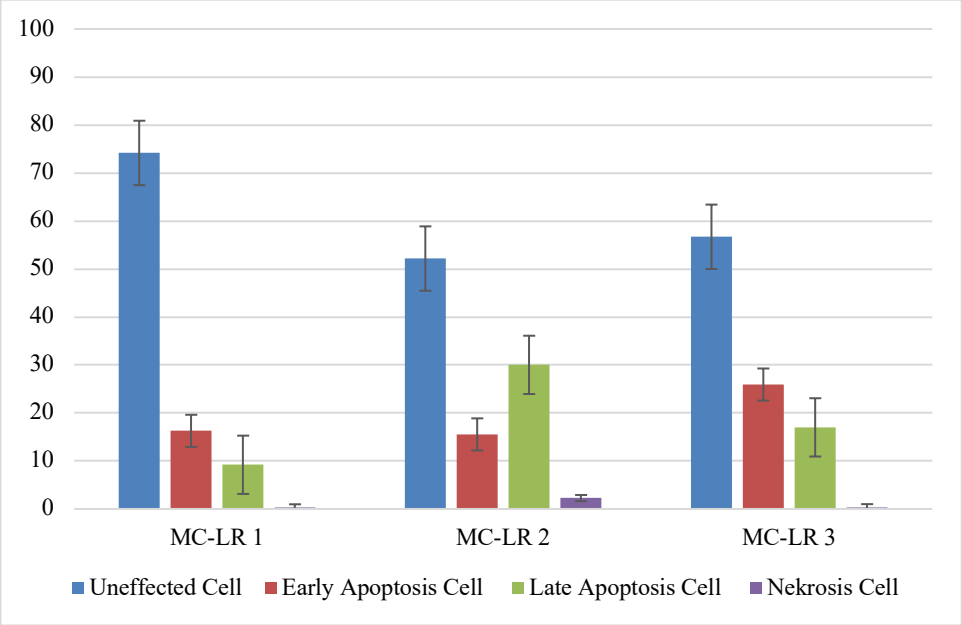
MC-LR + BMAA' nın 0,418 µg/ml + 0,418 mM 24 saatlik maruziyetinin ardından canlı hücrelerin kontrol grubuna kıyasla yüksek oranda azaldığı görülmektedir. SH-SY5Y hücrelerindeki erken apoptotik sürecin geç apoptotik sürece göre fazla olduğu gözlemlendi. Her iki apoptotik sürecin kontrol grubuna kıyasla yüksek bir oranda arttığı görülmektedir. Toksinlerin karışımıyla oluşturulan yüksek sitotoksik etkinin, apoptotik süreçle birlikte hücreleri kontrol grubuna göre yüksek seviyelerde nekroza soktuğu görülmektedir (Şekil 4.10).



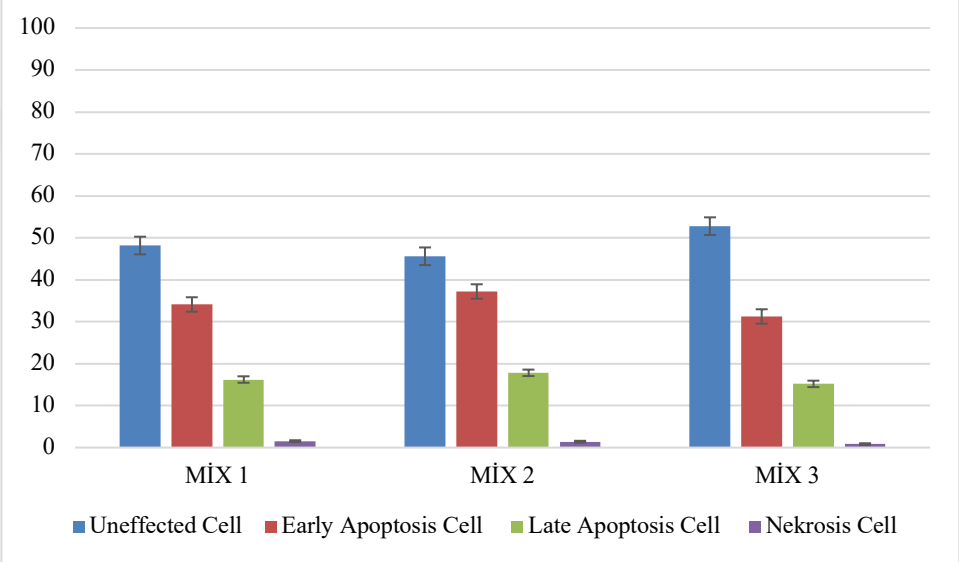
Şekil 4.7. Kontrol Grubu 24 Saatlik İnkübasyon (%).



Şekil 4.8. BMAA 24 Saatlik İnkübasyon (%).



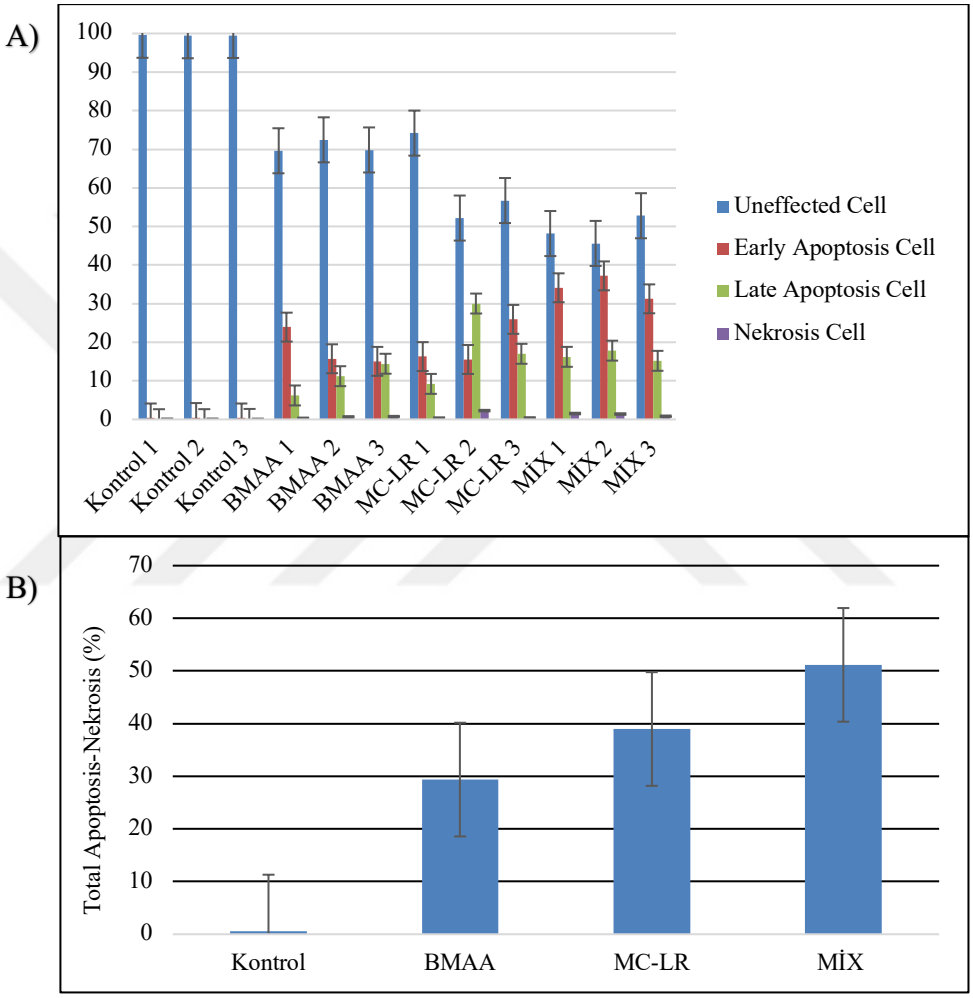
Şekil 4.9. MC-LR 24 Saatlik İnkübasyon (%).



Şekil 4.10. MC-LR + BMAA 24 Saatlik İnkübasyon (%)

Farklı toksin maruziyetlerine ait apoptoz sonuçlarında erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz süreçleri incelendi (Şekil 4.11.; A). Bu süreçler total apoptoz dağılımını ifade etmektedir (Şekil 4.11.; B). Çalışmamızda toplam apoptoz dağılımında deney grupları arasında anlamlı bir farklılık görülmektedir. Mikrosistin-LR'ın (%38,977) apoptotik

aktivitesinin BMAA'ya (%29,374) göre daha fazla olduğu görülmüştür. Mikrosistin-LR ve BMAA'nın bir arada bulunduğu karışımının farklı hücresel aktivite ve reaksiyonları tetiklemesiyle toksinlerin tek olarak maruziyetlerine göre daha güçlü bir apoptotik sürece (%51,155) sebep olduğu görülmüştür (Şekil 4.11.; B). Tüm bu apoptotik süreçler oksidatif stresin artışıyla birlikte SH-SY5Y hücrelerindeki nörodejeneratif hasarı göstermektedir.



Şekil 4.11. Gruplar Arası Apoptoz dağılımı (%). A) Etkilenmemiş, erken apoptoza girmiş, geç apoptoza girmiş ve nekroz durumuna gelmiş hücrelerin gruplar arası yüzdelik dağılımı. B) Toplam apoptoza girmiş hücrelerin gruplar arası dağılımı ($p<0.05$).

4.3. Verilerin İstatistiki Analizi

Ortalama dozlar arasındaki canlılık farkı One-way ANOVA testi ve post hoc Duncan'ın çoklu karşılaştırma testi yapıldı. Canlılık seviyeleri arasında anlamlı bir fark ortaya çıkmıştır ($p<0.05$). Uygulanacak etkin dozlar bu anlamlı farklılıkla teyit edilmiştir.

SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattında MC-LR, BMAA ve MC-LR + BMAA toksinlerinin IC50 dozları uygulandıktan 24 saat sonra apoptoz ve ROS analizleri gerçekleştirildi. Yapılan istatistiksel analizlerde, her iki analiz için de toksinlerin anlamlı etkileri olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Sonuçlar, varyansların homojen olduğunu ve ANOVA'nın uygulanabilir olduğunu gösterdi. Homojenite testlerinin ardından, SH-SY5Y hücrelerine verilen farklı toksinlerin etkilerini karşılaştırmak için ANOVA testi uygulandı. Uygulanan farklı toksin uygulamalarının nöroblastoma hücresindeki apoptozu ve reaktif oksijen seviyelerini önemli ölçüde etkilediği veri analiziyle belirlendi. Bu veriler, toksinlerin apoptoz ve hücresel stres açısından gruplar arasındaki farkları göstermektedir. ANOVA sonuçları, toksinler arasında anlamlı farklılıklar olduğunu gösterdi ($p<0.05$)." Verilerimizin normal dağılım göstermemesi ihtimaline karşı, ANOVA'nın sonuçlarını desteklemek amacıyla robust testleri uygulandı. Uygulanan robust testi, Mikrosistin LR, BMAA ve MC-LR + BMAA toksinlerinin etkilerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu doğruladı. ANOVA sonuçlarının ardından, Mikrosistin LR, BMAA ve MC-LR + BMAA toksinlerinin SH-SY5Y hücrelerindeki etkilerini ayrıntılı olarak incelemek için yapılan çoklu karşılaştırmada kontrol grubuna göre anlamlı sonuçların varlığı belirlenmiştir ($p<0.05$).

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

Gelişen teknoloji, sanayileşme, tarımın artması, klasik terimlerle nüfusun artması en nihayetinde sulak alanlar üzerindeki baskıyı arttırmaktadır. Bunun sonucunda bugün dünyanın birçok ülkesinde bulunan birçok sulak alanda ötrofikasyon problemi baş göstermektedir. Bunun sonucunda da özellikle siyanobakteri artışları sıklıkla gözlenmeye başlamıştır. İklimsel değişiklikler, kirlilik, insan baskısı sonucunda genellikle bahar aylarında meydana gelen siyanobakteri artışları diğer aylarda daha fazla meydana gelmeye başlamıştır. Bu durumla ilgili de siyanotoksinler ortaya çıkmaktadır. Bunun sonucunda özellikle içme ya da tarımsal amaçlı kullanılan rezervuarlarda bu siyanobakteriyel toksinlerin çoğalması hem hayvansal hem de insan sağlığını etkilemektedir.

Bu çalışma, doğada en çok görülen siyanobakteri toksinlerinden olan Mikrosistin-LR ve BMAA'nın SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri üzerindeki etkilerini inceleyerek nörodejeneratif süreçlerle ilişkilendirmeyi amaçlamıştır. Elde edilen bulgular, bu iki siyanobakteri toksininin nörodejenerasyon üzerinde önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda reaktif oksijen türlerinin (ROS) artması ve hücredeki artan apoptotik süreçler, nörodejenerasyonla ilişkilendirildi. ROS, oksidatif stresin bir belirteci olarak kabul edilir ve nöronal hasara neden olmaktadır (Hinojosa vd., 2019). Bu çalışmada, Mikrosistin-LR ve BMAA'nın SH-SY5Y hücrelerinde ROS seviyelerinin arttığı ve hücrelerin apoptoza girdiği görülmektedir. Bu da göstermektedir ki, bu toksik maddelerin nörodejeneratif süreçler üzerindeki etkileri oksidatif stres aracılığıyla gerçekleşebilir.

Hücrelerin Şekil 4.4'de sağa doğru yoğunlaşarak ayrılması ROS seviyesini belirgin olarak gösterip oksidatif stresin varlığını doğrulamaktadır. Bu süreçte toksine

maruz bırakılan hücrelerde büyüklük ve iç komplekslikte değişiklikler meydana gelmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda BMAA'nın hücreye dayattığı oksidatif stres etkisinin MC-LR'a ve ikisinin karışım haline kıyasla daha fazla olduğu görülmektedir. BMAA + Mikrosistin-LR karışımı ise toksinlerin tek başlarına olan maruziyetlerine göre daha az bir oksidatif stres artışı göstermiştir.

Mikrosistin-LR, hücre içi antioksidan sistemleri üzerinde inhibe edici etkisiyle oksidatif stresi arttırarak ROS seviyelerini yükseltmiş olabilir. BMAA, ise glutamat reseptörlerini etkileyerek nörotoksisiteye neden olmuş ve bu doğrultuda oksidatif stresin artmasına yol açmış olabilir. Her iki toksinin birbirleri ile olan karışımları hücre içerisinde farklı sinerjistik etkiler yaratabileceğinden oksidatif stres artışı daha azdır. Ancak karışımın oluşturduğu ağır hücresel toksisitenin etkileri apoptozun artışıyla doğrulanmıştır.

Yaptığımız çalışmada, Mikrosistin-LR ve BMAA'nın SH-SY5Y hücrelerinde apoptozu arttırdığı gözlemlenmiştir. Elde edilen bulgular, bu toksik maddelerin nöronal sağlığa zarar verme potansiyeline işaret etmektedir. Mikrosistin-LR' ın hücre içinde protein fosfatazları inhibe ettiği ve apoptotik yolağı aktive ettiği bilinmektedir (Li vd., 2012; Liu vd., 2009). Hücre ölümünün Mikrosistin-LR'ın sitotoksik etkilerinden kaynaklandığı düşünülmüştür. BMAA'nın glutamat reseptörlerine bağlanarak eksitotoksisiteye yol açmasıyla birlikte nöronal bir hasara sebep olur (Liu vd., 2009). Bu nedenle, hücre ölümünün BMAA'nın nörotoksik etkilerinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Ayrıca hücrelerdeki apoptotik sürecin ilerlemesi her iki toksin için de çeşitli proteinlerin fosforilasyonu ve aktivasyon mekanizmalarıyla açıklanabilir. Apoptozun yüksek olması, nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde önemli bir rol oynar. Nöroblastoma hücresinde gözlenen yüksek apoptoz, nörodejeneratif hasar ile ilişkilendirilmektedir.

Yaşlanmanın, çeşitli nörodejeneratif hastalıkların meydana gelmesinde hızlandırıcı faktör olduğu düşünülmektedir. Bu koşullar, beynin stratejik açıdan önemli bölgelerindeki spesifik nöronal yapı ve fonksiyon kaybıyla ifade edilir. Bu kayıp iletişimsel bozulmalara ve biyolojik sistemlerin kaybına sebep olur. Yapılan çeşitli çalışmalarda, ubikuitin-proteaz gibi bazı sistem düzenleyici proteinler, oksidatif stres ve mitokondri ilişkilerini nörodejeneratif bağlantılarla açıklanmıştır (Jaafaru vd.,2019).

Hücredeki mitokondriyal bozukluğun, birçok nörodejeneratif hastalığın oluşmasından sorumlu olan reaktif oksijen türlerinin artmasına ve bu doğrultuda hücre içerisinde oksidatif hasara sebep olduğu kanıtlanmıştır. ROS üretimindeki artış ile birlikte birçok mitokondriyal parametre etkilenir ve bu doğrultuda Ca^{+2} alımı, MTTP (Mikrozomal Trigliserid Transfer Proteini) aktivasyonu ve ATP üretimi üzerinde hasar meydana gelir. Bu hasarla birlikte hücre kayıpları ve nöronal bölgelerde ciddi hasarlar meydana gelmektedir. Hücredeki bu tip hasarlardan sorumlu olabilecek oksidatif stres mekanizması, Bax ve sistein proteaz (kaspaz) aileleri gibi mitokondriyal ölüm efektör moleküllerini içeren reaksiyonlar yoluyla nöron hücrelerindeki sinyal iletimini uyarmaktadır (Jaafaru vd.,2019).

Nöron Hücrelerinde tau proteinin hiperfosforilasyonu ve agregasyonu nörodejeneratif hastalıklarda tauopatiler adı verilen geniş bir nörodejeneratif bozukluk ailesinin patolojik özellikleridir. Tau'nun artan fosforilasyonunun tau-mikrotübül etkileşimlerini dengesizleştirdiği, mikrotübül instabilitesine, mikrotübüller boyunca taşıma kusurlarına ve nihayetinde nöronal ölüme yol açtığı gösterilmiştir. Oksidatif stres, tauopatilerin başka bir patolojik özelliğidir. Ancak kesin olarak hastalıklarla ilişkisi kurulamamıştır. BMAA ve Mikrosistin-LR, tau fosforilasyonuna yol açabilecek iki toksik ajandır (Arif vd., 2014; Alavi & Soussi, 2015). Tez çalışmasındaki SH-SY5Y hücreleri üzeriyle gösterilen bulgularda oksidatif stresin artışı ve ilerleyen apoptotik süreçler bu fosforilasyonun bir göstergesi olabilir.

Ayrıca (Li vd., 2015) MC-LR maruziyetiyle artan hücre içi Ca^{+2} seviyelerinin fosfataz kalsinörin aktivasyonuna yol açtığını ve bu doğrultuda proapoptotik Bcl-2 ailesi üyesi Bad'in defosforilasyonu yoluyla hücrelerin apoptoza sürüklendiğini bildirmiştir. Bu süreçle ilgili kalsiyum salınımı, ilişkili sitokrom C salınımıyla birlikte, iyi bilinen apoptotik proteinler olan kaspaz protein ailesini de ayrıca aktive etmektedir. Yapılan bu tez çalışması ayrıca bu sürecin gerçekleşme potansiyelini doğrulamaktadır.

Demansın en yaygın şekli olan Alzheimer hastalığı (AD) ilerleyen bilişsel gerilemeye beyin fonksiyonlarında bozulmaya ve ölüme yol açan yaşlanma ile ilgili bir durumdur (Zheng vd., 2013). AD'nin mekanizması incelendiğinde ROS'un ve ROS ile ilişkili olarak nörofibriler yumakların ve β-amiloid plakların patofizyolojik bir işaret olduğu düşünülmektedir. Hücrenin enerji metabolizmasından sorumlu olan mitokondrinin

fonksiyon kayıpları, Alzheimer'ın erken evrelerinde sıklıkla karşılaşılmaktadır. AD hastalarının hipokampusunda yapılan araştırmalarda mitokondri miktarının azalması ve bu doğrultuda 8-hidroksiguanozin ve nitrotirozin gibi mitokondriyal hasar belirteçlerinin artması sıklıkla rastlanılmıştır. Bu durum mitokondriyal fonksiyon kaybı ile Aβ birikimi arasındaki bağlantıyı açıklamaktadır. Bazı in vivo veriler Aβ birikiminin mitokondrideki fonksiyonun azalmasına, ROS seviyesinin artmasına ve böylelikle sinaptik dejenerasyona sebep olduğunu ifade etmektedir (Griebsch vd., 2023). Sonuç olarak tez çalışmamızda ifade edilen MC-LR ve BMAA gibi ROS seviyelerini arttıran ve hücreyi oksidatif strese sokan bu toksinler potansiyel olarak mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ile birlikte Aβ birikimine ve bilişsel işlev kayıplarına yol açabilir.

PINK1 ve Parkin gibi sinyal proteinleri, sporadik Parkinson hastalığında mutasyona uğrar ve bu da işlevsiz mitokondri birikimine yol açar (Griebsch vd., 2023). PINK1 (PTEN ile indüklenen kinaz 1), kinaz alanı aşağı yöndeki proteinleri doğrudan fosforile edebilen ve bunun sonucunda mitokondriyal fonksiyonun değişmesine, oksidatif hasara ve Parkin'e bağımlı proteinlerin bozulmasına yol açabilen entegre bir mitokondriyal membran proteinidir. Bununla birlikte, mitokondri hasar gördüğünde ve mitokondriyal membran potansiyeli tükendiğinde, PINK1 dış mitokondriyal membranda stabilize olur ve burada Parkin'i hasarlı mitokondriye alır (Zhang vd.,2016).

Çalışmamızda yüksek ROS seviyeleri açısından incelediğimizde özellikle BMAA'nın hücredeki protein yapısının değiştirme kabiliyeti ve Mikrosistin-LR'ın inhibe edici etkisi bu oluşumlara zemin hazırlayabilir. Daha ileri boyutta nöroblastoma hücrelerini oksidatif stres ve mitokondriyal bozunma ile apoptoza götürmüş olabilir.

Sonuç olarak, sanayi devrimi ile başlayan teknolojik gelişmeler sonucu dünyayı etkisi altına alan sanayileşme süreciyle birlikte, nüfus artışı, tarımsal gelişmeler ve hızlı kentleşmeyle doğal kaynaklar hızla tüketilmektedir. Tüm bunların bir sonucu olarak ta çevre sorunları son yıllarda giderek artış göstermektedir. Artan kirlilikle birlikte özellikle en çok sulak alanlar ve bu alanlarda yaşayan canlılar etkilenmektedir. Kentsel, endüstriyel atıksular ve tarımsal alanlardan gelen yüzeysel akışlar su kaynaklarının fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini hem doğrudan hemde dolaylı olarak etkilemektedir. Atık suların taşıdıkları besin tuzları (nutrient) sulak alanlarda yaşayan alglerin sayıca artmalarına ve su kalitesinin de bozulmasına ve devamında da ötrofikasyona neden olmaktadır. Kirlilik

artışına bağlı olarak siyanobakteri biyokütlesinin sudaki artışı da su kalitesini etkilemektedir. Özellikle siyanobakteri artışlarının yaşandığı sulak alanlarda siyanobakteri toksinlerinin de görülmesi mümkündür. İçme ve kullanma sularında bulunabilen siyanobakteriyel toksinler, insan ve hayvan sağlığı açısından büyük risk teşkil etmektedir. Dolayısıyla meydana gelen siyanobakteri artışları ile birlikte ortama salınacak olan toksik sekonder metabolitler ile artık sadece su kirliliği değil, bu suların kullanılmasıyla birlikte gelecekte siyanobakteri toksinleri ile ilgili hastalıkların artacağıda söylenebilir. Bu çalışma, MC-LR ve BMAA'nın nöroblastoma hücrelerinde nörodejeneratif süreçleri tetikleyebileceğini göstermektedir. Elde edilen bulgular, siyanobakteri kaynaklı toksinlerin potansiyel nörodejeneratif etkilerini anlamak ve önlemek için ileri araştırmaların gerekliliğini vurgulamaktadır. Ayrıca, içme ve kullanım amacıyla tüketilen sularda, su kalitesinin ve siyanotoksin miktarlarının düzenli olarak izlenmesinin temiz su kaynaklarının sürdürülebilir kullanımı açısından önemli olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Alavi Naini, S. M., & Soussi-Yanicostas, N. (2015). Tau Hyperphosphorylation and Oxidative Stress, a Critical Vicious Circle in Neurodegenerative Tauopathies?. Oxidative medicine and cellular longevity, 2015, 151979.

Anand, K. S., & Dhikav, V. (2012). Hippocampus in health and disease: An overview *Annals of Indian Academy of Neurology*, *15*(4), 239–246.

Anzilotti, S., Valente, V., Brancaccio, P., Franco, C., Casamassa, A., Lombardi, G., Palazzi, A., Conte, A., Paladino, S., Canzoniero, L. M. T., Annunziato, L., Pierantoni, G. M., & Pignataro, G. (2023). Chronic exposure to l-BMAA cyanotoxin induces cytoplasmic TDP-43 accumulation and glial activation, reproducing an amyotrophic lateral sclerosis-like phenotype in mice. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, *167*, 115503.

Arif, M., Kazim, S. F., Grundke-Iqbal, I., Garruto, R. M., & Iqbal, K. (2014). Tau pathology involves protein phosphatase 2A in parkinsonism-dementia of Guam. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(3), 1144–1149.

Azevedo, S. M. F. O., Evans, W. R., Carmichael, W. W., & Namikoshi, M. (1994). First report of microcystins from a Brazilian isolate of the cyanobacteriumMicrocystis aeruginosa. *Journal of Applied Phycology*, *6*(3), 261–265.

Banack, S. A., & Murch, S. J. (2018). Methods for the Chemical Analysis of β-N-Methylamino-L-A lanine: What Is Known and What Remains to Be Determined. *Neurotoxicity Research*, *33*(1), 184–191.

Bekker, A., Holland, H. D., Wang, P.-L., Rumble, D., 3rd, Stein, H. J., Hannah, J. L., Coetzee, L. L., & Beukes, N. J. (2004). Dating the rise of atmospheric oxygen. *Nature*, *427*(6970), 117–120.

Bláha, L., Babica, P., & Maršálek, B. (2009). Toxins produced in cyanobacterial water blooms-toxicity and risks. *Interdisciplinary Toxicology*, *2*(2), 36–41.

Bouaïcha, N., Miles, C. O., Beach, D. G., Labidi, Z., Djabri, A., Benayache, N.

Y., & Nguyen-Quang, T. (2019). Structural Diversity, Characterization and Toxicology of Microcystins. *Toxins*, *11*(12).

Bougea, A. (2021). Synuclein in neurodegeneration. *Advances in Clinical Chemistry*, *103*, 97–134.

Brownson, D. M., Mabry, T. J., & Leslie, S. W. (2002). The cycad neurotoxic amino acid, beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA), elevates intracellular calcium levels in dissociated rat brain cells. *Journal of Ethnopharmacology*, *82*(2-3), 159–167.

Buratti, F. M., Manganelli, M., Vichi, S., Stefanelli, M., Scardala, S., Testai, E., & Funari, E. (2017). Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. *Archives of Toxicology*, *91*(3), 1049–1130.

Carey, C. C., Ibelings, B. W., Hoffmann, E. P., Hamilton, D. P., & Brookes, J. D. (2012). Eco-physiological adaptations that favour freshwater cyanobacteria in a changing climate. *Water Research*, *46*(5), 1394–1407.

Carmichael, W. W., & Li, R. (2006). Cyanobacteria toxins in the Salton Sea. *Saline Systems*, *2*, 5.

Castenholz, R. W. (2015). General characteristics of the Cyanobacteria. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1–23). John Wiley & Sons, Ltd.

Chiu, A. S., Gehringer, M. M., Braidy, N., Guillemin, G. J., Welch, J. H., & Neilan, B. A. (2012). Excitotoxic potential of the cyanotoxin β-methyl-amino-L-alanine (BMAA) in primary human neurons. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, *60*(6), 1159–1165.

Chorus, I., & Bartram, J. (1999). *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. CRC Press.

Demoulin, C. F., Lara, Y. J., Cornet, L., François, C., Baurain, D., Wilmotte, A., & Javaux, E. J. (2019). Cyanobacteria evolution: Insight from the fossil record. *Free Radical Biology & Medicine*, *140*, 206.

Ding, W.-X., & Nam Ong, C. (2003). Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity. *FEMS Microbiology Letters*, *220*(1), 1–7.

Dunlop, R. A., Cox, P. A., Banack, S. A., & Rodgers, K. J. (2013). The non-

protein amino acid BMAA is misincorporated into human proteins in place of L-serine causing protein misfolding and aggregation. *PloS One*, *8*(9).

Du, X., Liu, H., Yuan, L., Wang, Y., Ma, Y., Wang, R., Chen, X., Losiewicz, M. D., Guo, H., & Zhang, H. (2019). The Diversity of Cyanobacterial Toxins on Structural Characterization, Distribution and Identification: A Systematic Review. *Toxins*, *11*(9). /

Fanxiang, K., State Key Laboratory of Lake Science and Environment, Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing, P. R. China, Ronghua, M. A., Junfeng, G. A. O., & Xiaodong, W. U. (2009). The theory and practice of prevention, forecast and warning on cyanobacteria bloom in Lake Taihu. *Journal of Lake Sciences*, *21*(3), 314–328.

Feurstein, D., Holst, K., Fischer, A., & Dietrich, D. R. (2009). Oatp-associated uptake and toxicity of microcystins in primary murine whole brain cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *234*(2), 247–255.

Fischer, W. J., Altheimer, S., Cattori, V., Meier, P. J., Dietrich, D. R., & Hagenbuch, B. (2005). Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *203*(3), 257–263.

Gao, J., Wang, L., Liu, J., Xie, F., Su, B., & Wang, X. (2017). Abnormalities of Mitochondrial Dynamics in Neurodegenerative Diseases. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, *6*(2).

Goedert, M. (2001). Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nature Reviews. Neuroscience*, *2*(7), 492–501.

Goto, J. J., Koenig, J. H., & Ikeda, K. (2012). The physiological effect of ingested β-N-methylamino-L-alanine on a glutamatergic synapse in an in vivo preparation. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP*, *156*(3-4), 171–177.

Griebsch, L. V., Theiss, E. L., Janitschke, D., Erhardt, V. K. J., Erhardt, T., Haas, E. C., Kuppler, K. N., Radermacher, J., Walzer, O., Lauer, A. A., Matschke, V., Hartmann, T., Grimm, M. O. W., & Grimm, H. S. (2023). Aspartame and Its Metabolites Cause Oxidative Stress and Mitochondrial and Lipid Alterations in SH-SY5Y Cells. *Nutrients*, *15*(6), 1467.

Häder, D.-P., Villafañe, V. E., & Helbling, E. W. (2014). Productivity of aquatic

primary producers under global climate change. *Photochemical & Photobiological Sciences: Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, *13*(10), 1370–1392.

Haddad, G., Yu, Shan. *Brain Hypoxia and Ischemia*. (2009). Humana Press.

Hannah, J. L., Bekker, A., Stein, H. J., Markey, R. J., & Holland, H. D. (2004). Primitive Os and 2316 Ma age for marine shale: implications for Paleoproterozoic glacial events and the rise of atmospheric oxygen. *Earth and Planetary Science Letters*, *225*(1-2), 43–52.

Hinojosa, M. G., Prieto, A. I., Gutiérrez-Praena, D., Moreno, F. J., Cameán, A. M., & Jos, A. (2019). Neurotoxic assessment of Microcystin-LR, cylindrospermopsin and their combination on the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line. *Chemosphere*, *224*, 751–764.

Hoffmann, L. F., Martins, A., Majolo, F., Contini, V., Laufer, S., & Goettert, M. I. (2023). Neural regeneration research model to be explored: SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Neural Regeneration Research*, *18*(6), 1265–1266.

Jaafaru, M. S., Nordin, N., Rosli, R., Shaari, K., Bako, H. Y., Noor, N. M., & Abdull Razis, A. F. (2019). Prospective role of mitochondrial apoptotic pathway in mediating GMG-ITC to reduce cytotoxicity in H_2O_2-induced oxidative stress in differentiated SH-SY5Y cells. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, *119*, 109445.

Jakubowska, N., & Szeląg-Wasielewska, E. (2015). Toxic picoplanktonic cyanobacteria--review. *Marine Drugs*, *13*(3), 1497–1518.

Jassim, Y. A., Awadh, E. F. A., & Al-Amery, S. M. H. (2023). A review of general properties of blue-green algae (Cyanobacteria). *Biomedicine and Chemical Sciences*, *2*(2).

Kastin, J. (2013). What caused the rise of atmospheric O2?. *Chemical Geology*, *362*, 13–25.

Kosaki, Y., Lin, T.-C. E., Horne, M. R., Pearce, J. M., & Gilroy, K. E. (2014). The role of the hippocampus in passive and active spatial learning. *Hippocampus*, *24*(12), 1633–1652.

Kotak, B. G., Lam, A. K.-Y., Prepas, E. E., Kenefick, S. L., & Hrudey, S. E. (1995). Variability of the hepatotoxin microcystin-lr ın hypereutrophıc drınkıng water lakes. *Journal of Phycology*, *31*(2), 248–263.

Kultschar, B., & Llewellyn, C. (2018). Secondary metabolites in Cyanobacteria. In *Secondary Metabolites - Sources and Applications*. InTech.

Kumar, K., Mella-Herrera, R. A., & Golden, J. W. (2010). Cyanobacterial heterocysts. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *2*(4).

Li, D. (2021). Ecological threshold for prevention and control of cyanobacterial blooms in Baiyangdian Lake. *Chin. Res. Acad. Environ. Sci*.

Li, G., Cai, F., Yan, W., Li, C., & Wang, J. (2012). A proteomic analysis of MCLR-induced neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, *127*(2), 485–495.

Li, G., Yan, W., Dang, Y., Li, J., Liu, C., & Wang, J. (2015). The role of calcineurin signaling in microcystin-LR triggered neuronal toxicity. *Scientific Reports*, *5*, 11271.

Liu, X., Rush, T., Zapata, J., & Lobner, D. (2009). Beta-N-methylamino-l-alanine induces oxidative stress and glutamate release through action on system Xc(-). *Experimental Neurology*, *217*(2), 429–433.

Lobner, D., Piana, P. M. T., Salous, A. K., & Peoples, R. W. (2007). Beta-N-methylamino-L-alanine enhances neurotoxicity through multiple mechanisms. *Neurobiology of Disease*, *25*(2), 360–366.

Lürling, M., van Oosterhout, F., & Faassen, E. (2017). Eutrophication and Warming Boost Cyanobacterial Biomass and Microcystins. *Toxins*, *9*(2).

MacKintosh, C., Beattie, K. A., Klumpp, S., Cohen, P., & Codd, G. A. (1990). Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Letters*, *264*(2), 187–192.

Mandal, M. K., Chanu, N. K., & Chaurasia, N. (2020). Cyanobacterial pigments and their fluorescence characteristics: applications in research and industry. In *Advances in Cyanobacterial Biology* (pp. 55–72). Elsevier.

Martin, C., Codd, G. A., Siegelman, H. W., & Weckesser, J. (1989). Lipopolysaccharides and polysaccharides of the cell envelope of toxic Microcystis aeruginosa strains. *Archives of Microbiology*, *152*(1), 90–94.

Martin, R. M., Bereman, M. S., & Marsden, K. C. (2020). Exposure to a mixture of BMAA and MCLR synergistically modulates behavior in larval zebrafish while exacerbating molecular changes related to neurodegeneration. In *bioRxiv*.

Mehdizadeh Allaf, M., & Peerhossaini, H. (2022). Cyanobacteria: Model

Microorganisms and Beyond. *Microorganisms*, *10*(4).

Mello, F. D., Braidy, N., Marçal, H., Guillemin, G., Nabavi, S. M., & Neilan, B. A. (2018). Mechanisms and Effects Posed by Neurotoxic Products of Cyanobacteria/Microbial Eukaryotes/Dinoflagellates in Algae Blooms: a Review. *Neurotoxicity Research*, *33*(1), 153–167.

Menezes, C., Alverca, E., Dias, E., Sam-Bento, F., & Pereira, P. (2013). Involvement of endoplasmic reticulum and autophagy in microcystin-LR toxicity in Vero-E6 and HepG2 cell lines. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, *27*(1), 138–148.

Msagati, T. A. M., Siame, B. A., & Shushu, D. D. (2006). Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. *Aquatic Toxicology*, *78*(4), 382–397.

Muñoz-Saez, E., de Munck, E., Arahuetes, R. M., Solas, M. T., Martínez, A. M., & Miguel, B. G. (2013). β-N-methylamino-L-alanine induces changes in both GSK3 and TDP-43 in human neuroblastoma. *The Journal of Toxicological Sciences*, *38*(3).

Myers, T. G., & Nelson, S. D. (1990). Neuroactive carbamate adducts of beta-N-methylamino-L-alanine and ethylenediamine. Detection and quantitation under physiological conditions by 13C NMR. *The Journal of Biological Chemistry*, *265*(18), 10193–10195.

Negri, A. P., Jones, G. J., Blackburn, S. I., Oshima, Y., & Onodera, H. (1997). Effect of culture and bloom development and of sample storage on paralytic shellfish poisons in the cyanobacterium *anabaena circınalis*. *Journal of Phycology*, *33*(1), 26–35.

Neilan, B. A., Pearson, L. A., Muenchhoff, J., Moffitt, M. C., & Dittmann, E. (2013). Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. *Environmental Microbiology*, *15*(5), 1239–1253.

Nicholls, D. G., & Budd, S. L. (2000). Mitochondria and neuronal survival. *Physiological Reviews*, *80*(1), 315–360.

Nugumanova, G., Ponomarev, E. D., Askarova, S., Fasler-Kan, E., & Barteneva, N. S. (2023). Freshwater Cyanobacterial Toxins, Cyanopeptides and Neurodegenerative Diseases. *Toxins*, *15*(3).

Okle, O., Stemmer, K., Deschl, U., & Dietrich, D. R. (2013). L-BMAA induced ER stress and enhanced caspase 12 cleavage in human neuroblastoma SH-SY5Y cells at

low nonexcitotoxic concentrations. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, *131*(1), 217–224.

Paerl, H. W. (1988). Nuisance phytoplankton blooms in coastal, estuarine, and inland waters. *Limnology and Oceanography*, *33*(4part2), 823–843.

Percival, S. L., & Williams, D. W. (2014). Cyanobacteria. In *Microbiology of Waterborne Diseases* (pp. 79–88). Elsevier.

Prasertsuksri, P., Kraokaew, P., Pranweerapaiboon, K., Sobhon, P., & Chaithirayanon, K. (2023). Neuroprotection of Andrographolide against Neurotoxin MPP^+-Induced Apoptosis in SH-SY5Y Cells via Activating Mitophagy, Autophagy, and Antioxidant Activities. *International journal of molecular sciences*, *24*(10), 8528.

Pravadali-Cekic, S., Vojvodic, A., Violi, J. P., Mitrovic, S. M., Rodgers, K. J., & Bishop, D. P. (2023). Simultaneous Analysis of Cyanotoxins β-N-methylamino-L-alanine (BMAA) and Microcystins-RR, -LR, and -YR Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). *Molecules*, *28*(18).

Rao, S. D., Banack, S. A., Cox, P. A., & Weiss, J. H. (2006). BMAA selectively injures motor neurons via AMPA/kainate receptor activation. *Experimental Neurology*, *201*(1), 244–252.

Rastogi, R. P., Madamwar, D., & Incharoensakdi, A. (2015). Bloom Dynamics of Cyanobacteria and Their Toxins: Environmental Health Impacts and Mitigation Strategies. *Frontiers in Microbiology*, *6*, 1254.

Rastogi, R. P., Sinha, R. P., & Incharoensakdi, A. (2014). The cyanotoxin-microcystins: current overview. *Re/views in Environmental Science and Bio/technology*, *13*(2), 215–249.

Richter, K. E., & Mena, E. E. (1989). L-beta-methylaminoalanine inhibits [3H]glutamate binding in the presence of bicarbonate ions. *Brain Research*, *492*(1-2), 385–388.

Salcedo-Tello, P., Ortiz-Matamoros, A., & Arias, C. (2011). GSK3 Function in the Brain during Development, Neuronal Plasticity, and Neurodegeneration. *International Journal of Alzheimer's Disease*, *2011*.

Schopf, J. W. (1993). Microfossils of the Early Archean Apex chert: new evidence of the antiquity of life. *Science*, *260*, 640–646.

Siesjö, B. K., Bengtsson, F., Grampp, W., & Theander, S. (1989). Calcium,

excitotoxins, and neuronal death in the brain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *568*, 234–251.

Singh, S. P., & Montgomery, B. L. (2011). Determining cell shape: adaptive regulation of cyanobacterial cellular differentiation and morphology. *Trends in Microbiology*, *19*(6), 278–285.

Smith, J., Boyer, G., Zimba, P. (2008). A review of cyanobacterial odorous and bioactive metabolites: Impacts and management alternatives in aquaculture. Aquaculture. 280. 5-20.

Smith, G. M., & Gallo, G. (2018). The role of mitochondria in axon development and regeneration. *Developmental Neurobiology*, *78*(3), 221–237.

Song, Y., Zhou, H., Vo, M.-N., Shi, Y., Nawaz, M. H., Vargas-Rodriguez, O., Diedrich, J. K., Yates, J. R., Kishi, S., Musier-Forsyth, K., & Schimmel, P. (2017). Double mimicry evades tRNA synthetase editing by toxic vegetable-sourced non-proteinogenic amino acid. *Nature Communications*, *8*(1), 2281.

Takser, L., Benachour, N., Husk, B., Cabana, H., & Gris, D. (2016). Cyanotoxins at low doses induce apoptosis and inflammatory effects in murine brain cells: Potential implications for neurodegenerative diseases. *Toxicology Reports*, *3*, 180–189.

Todorova, V., & Blokland, A. (2017). Mitochondria and Synaptic Plasticity in the Mature and Aging Nervous System. *Current Neuropharmacology*, *15*(1), 166–173.

Van Gassen, G., & Annaert, W. (2003). Amyloid, presenilins, and Alzheimer's disease. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, *9*(2), 117–126.

Vega, A. (1967). α-Amino-β-methylaminopropionic acid, a new amino acid from seeds of Cycas circinalis. *Phytochemistry*, *6*(5), 759–762.

Vidal L., Ballot A., Azevedo S.M.F.O., Padisák J., Welker M. (2021). Introduction to cyanobacteria. In: Chorus I., Welker M., editors. *Toxic Cyanobacteria in Water.* 2nd ed. CRC Press; Boca Raton, FL, USA, pp. 163–211.

Wang, J., Zhang, C., Zhu, J., Ding, J., Chen, Y., & Han, X. (2019). Blood-brain barrier disruption and inflammation reaction in mice after chronic exposure to Microcystin-LR. *The Science of the Total Environment*, *689*, 662–678.

Wang, X., Xu, L., Li, X., Chen, J., Zhou, W., Sun, J., & Wang, Y. (2018). The differential effects of microcystin-LR on mitochondrial DNA in the hippocampus and

cerebral cortex. *Environmental Pollution*, *240*, 68–76.

Wang, Y., Xu, E., Musich, P. R., & Lin, F. (2019). Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and the potential countermeasure. *CNS neuroscience & therapeutics*, *25*(7), 816–824.

Wiegand, C., & Pflugmacher, S. (2005). Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites: a short review. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *203*(3), 201–218.

Woodhouse, J. N., Ziegler, J., Grossart, H.-P., & Neilan, B. A. (2018). Cyanobacterial Community Composition and Bacteria-Bacteria Interactions Promote the Stable Occurrence of Particle-Associated Bacteria. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 777.

World Health Organization. (2020). *Cyanobacterial Toxins: Microcystins.* World Health Organization; Geneva, Switzerland.

Young, K. D. (2006). The selective value of bacterial shape. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, *70*(3), 660–703.

Young, K. D. (2007). Bacterial morphology: why have different shapes? *Current Opinion in Microbiology*, *10*(6), 596–600.

Zhang, C., Wang, J., Zhu, J., Chen, Y., & Han, X. (2020). Microcystin-leucine-arginine induced neurotoxicity by initiating mitochondrial fission in hippocampal neurons. *The Science of the Total Environment*, *703*, 134702.

Zhang, H. T., Mi, L., Wang, T., Yuan, L., Li, X. H., Dong, L. S., Zhao, P., Fu, J. L., Yao, B. Y., & Zhou, Z. C. (2016). PINK1/Parkin-mediated mitophagy play a protective role in manganese induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Toxicology in vitro:an international journal published in association with BIBRA*, *34*, 212–219.

Zhang, W., Liu, J., Xiao, Y., Zhang, Y., Yu, Y., Zheng, Z., Liu, Y., & Li, Q. (2022). The Impact of Cyanobacteria Blooms on the Aquatic Environment and Human Health. *Toxins*, *14*(10).

Zheng, L., Calvo-Garrido, J., Hallbeck, M., Hultenby, K., Marcusson, J., Cedazo-Minguez, A., & Terman, A. (2013). Intracellular localization of amyloid-β peptide in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, *37*(4), 713–733.

Zhu, X., Perry, G., Smith, M. A., & Wang, X. (2013). Abnormal mitochondrial dynamics in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, *33 Suppl 1*(01), S253–S262.

ÖZGEÇMİŞ

Selim Soydan, ilköğretimi Lüleburgaz Hürriyet Ortaokulu'nda, liseyi Lüleburgaz Kepirtepe Anadolu Öğretmen Lisesi'nde tamamladı. 2021 Yılında Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden mezun oldu. 2022 yılında Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında yüksek lisans eğitimine başladı. 2024 Yılında Gebze Barem Çevre Laboratuvarı'nda Biyolog-Analist olarak görevine hâlen devam etmektedir.