



Mitokondri Fisyon-Füzyon Dengesinde Rol Oynayan Genlerin Nörotoksik Ortamda ifade Düzeyleri Değişimi

Lütfiye Özpak ¹

1 Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Kahramanmaraş, Türkiye

Geliş: 02.02.2024; Revizyon: 28.05.2024; Kabul Tarihi: 29.05.2024

Öz

Amaç: Alzheimer tipi demans, dünya çapında rastlanan demansın en yaygın görülen şekli olup, son çalışmalar, kronik hiperglisemi ve insülin direnci ile karakterize olan tip 2 diyabeti (T2D), Alzheimer hastalığı ve diğer bilişsel bozukluklar için bir risk faktörü olarak tanımlamaya başlamıştır. Alzheimer hastalığının, tip 3 diyabet (T3D) olarak önerildiği tabloda, bozulmuş insülin sinyalizasyonu, kronik hiperglisemi kaynaklı nöronal hasar, oksidatif stres, nöroinflamasyon gibi metabolik bozukluklar yer alır. Bu durum, nöronal insülin direncine yol açarak antioksidan kapasitede azalma, oksidatif hasar, mitokondriyal bozulmaya katkıda bulunarak sinirsel dejenerasyon ve bilişsel gerilemeye yol açar. Bu çalışmada, yüksek glikoz uygulayarak nörotoksisite geliştirdiğimiz nöroblastoma hücre hattında, mitokondri dinamiğinde rol oynayan DRP1, OPA1, MFN1, MFN2, FIS1 genlerinin ifade düzeylerini belirlemeyi hedefledik.

Yöntemler: İnsan nöroblastoma hücrelerine, 24 saat süre ile, 100 mM glikoz uygulayarak, nörotoksik ortam geliştirdik ve DRP1, OPA1, MFN1, MFN2, FIS1 ekspresyon seviyelerini qPCR tekniği ile belirledik.

Bulgular: Yüksek glikoz uyguladığımız grupta, kontrol grubuna oranla FIS1, DRP1 (sırasıyla 2,45-kat ve 4,61-kat) seviyelerinde artış ($p<0,05$), MFN1, MFN2, OPA1 (sırasıyla 0,69-kat, 0,58-kat ve 0,62-kat) seviyelerinde azalma ($p>0,05$) gözlemledik.

Sonuç: T2D belirtileri ile mitokondriyal fragmentasyon artışı arasında korelasyon olduğu bilinmekte olup, in-vitro nörotoksik ortamda, mitokondri dinamiğinde rol oynayan moleküllerin seviyesi, artan fragmentasyonu destekler niteliktedir. T3D mekanizmasında, nörodejenerasyona katkıda bulunan mitokondriyal bozulmada yer alan moleküllerin, transkripsiyonel düzeyde değişikliklerinin aydınlatılması noktasında literatüre katkıda bulunan çalışmamız, hastalığın erken teşhisi, seyrinin yavaşlatılması ve tedavi edilmesi yönünde ilerleme kaydedilmesini sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: Alzheimer hastalığı, Tip 2 diyabet Mellitus, Mitokondriyal fisyon ve füzyon.

DOI: 10.5798/dicletip.1501350

Yazışma Adresi / Correspondence: Lütfiye Özpak, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Kahramanmaraş, Türkiye e-mail: lutfiyeozpak@gmail.com

The Expression Levels of Genes Involved in Mitochondrial Fission-Fusion Balance in A Neurotoxic Environment

Abstract

Purpose: Alzheimer's disease, the most common form of dementia worldwide, has been increasingly linked to type 2 diabetes (T2D), characterized by chronic hyperglycemia and insulin resistance, in recent studies, identifying it as a risk factor for Alzheimer's disease and other cognitive impairments. In the proposed concept of Alzheimer's disease as type 3 diabetes (T3D), metabolic disorders such as impaired insulin signaling, neuronal damage due to chronic hyperglycemia, oxidative stress, and neuroinflammation, are implicated. This condition leads to neuronal insulin resistance, contributing to decreased antioxidant capacity, oxidative damage, mitochondrial dysfunction, neuronal degeneration, and cognitive decline. In this study, we aimed to determine the expression levels of genes involved in mitochondrial dynamics, including DRP1, OPA1, MFN1, MFN2, and FIS1, in the neuroblastoma cell line subjected to high glucose-induced neurotoxicity.

Method: We induced a neurotoxic environment in human neuroblastoma cells by applying 100 mM glucose for 24 hours and determined the expression levels of DRP1, OPA1, MFN1, MFN2, and FIS1 using the qPCR technique.

Results: In the group exposed to high glucose, we observed an increase in the levels of FIS1 and DRP1 (2,45-fold and 4,61-fold, respectively) compared to the control group ($p < 0,05$), while there was a decrease in the levels of MFN1, MFN2, and OPA1 (0,69-fold, 0,58-fold, and 0,62-fold, respectively), although statistically insignificant ($p > 0,05$).

Conclusion: There is a known correlation between mitochondrial fragmentation and symptoms of T2D, and our findings support increased fragmentation in an in vitro neurotoxic environment by showing alterations in the levels of molecules involved in mitochondrial dynamics. Our study contributes to the literature by shedding light on transcriptional changes of molecules involved in mitochondrial dysfunction, contributing to neurodegeneration in the mechanism of T3D. This will aid in early diagnosis, slowing the progression, and treating the disease.

Keywords: Alzheimer Disease's, Type 2 Diabetes Mellitus, Mitochondrial Fission and Fusion.

GİRİŞ

T2D, multiple organ bozulması ve çoklu kronik komplikasyonla ilişkili sistemik bir hastalıktır, bunlar arasında beyin ve sinir sistemi de bulunmaktadır. Diyabet ilişkili merkezi sinir sistemi komplikasyonları ve diyabeti olan kişilerin sık sık bellek ve dikkatlerinin kötüleştiği, araştırmacılar ve klinik uzmanlar tarafından 100 yıldan fazla bir süredir bilinmektedir¹. Literatür, T2DM'nin bilişsel fonksiyonun çeşitli alanlarında azalmış performansla ve beyinde yapısal anormalliklerle güçlü bir şekilde ilişkili olduğuna işaret etmektedir. Bu durumda bilişsel gerileme, nöropsikolojik testlerle ölçülen hafif bilişsel bozukluk (MCI), Alzheimer hastalığı (AH), vasküler demans (VD) ve diyabetik olmayan kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında başka demans türlerine yol

açabilir. T2D, demans riskinde %50 artışla ilişkilidir².

Şimdiye kadar yapılan epidemiyolojik çalışmalar, metabolik sendrom ve T2D'in, vasküler demans ve Alzheimer hastalığı görülme riskini önemli ölçüde arttırdığını göstermektedir³. Beyin fonksiyonu, glikozun oksidatif metabolizmasına bağlıdır. Diyabette sıklıkla gelişen hiperglisemi atakları, hem merkezi hem de periferik sinir sistemlerinde glukoz metabolizması ile ilişkili fonksiyonel ve yapısal bozukluklara neden olur ve bu da nöron hasarına yol açar⁴. Kronik hiperglisemi kaynaklı nöronal hasar, çoğunlukla oksidatif stres, ileri glikasyon son ürünlerinin oluşumu, nöroinflamasyon, nörotrofik faktörlerin eksikliği gibi birçok faktör nedeniyle meydana gelir⁵.

Mitokondriler sürekli olarak fisyon ve füzyon adlı iki zıt süreç sayesinde şekil ve sayı değişiklikleri geçirir. Füzyon-fisyon dengesinin ince ayarlanması, hücrel uyum açısından hücreye dış uyarılara ve çevresel streslere yanıt olarak önemlidir⁶. Bu nedenle, fisyon-füzyon dengesinin değişiklikleri oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon ve metabolik değişikliklere yol açar. Mitokondriyal morfolojideki değişiklikleri düzenleyen başlıca proteinler, fission protein 1 (Fis1), dynamin-related protein 1 (Drp1), mitofusin (Mfn) ve optic atrophy 1 (Opa1) gibi dinamik moleküllerdir. Drp1 mitokondriyal fisyonu düzenlerken, Mfn1, Mfn2 ve Opa1 sırasıyla dış ve iç mitokondriyal membranların füzyonunu düzenler^{7,8}. Mitokondri dinamiğinde bozulma, Alzheimer ve Parkinson gibi yaygın görülen nörodejeneratif hastalıkların yanı sıra kardiyovasküler hastalıklar, T2D ve kanserde moleküler ve hücrel patogeneze daha genel bir rol oynuyormuş gibi görünmektedir^{6,8}. T2D'in klinik komplikasyonları arasında yer alan dislipidemi, hiperglisemi, insülin direnci gibi komplikasyonların önemli bir nedeni, hiperglisemi tarafından artan mitokondriyal reaktif oksijen türleri (ROS) üretimidir. T2D'de mitokondriyal morfolojinin ortak bir özelliği, artan bir fragmentasyondur⁸. Hipotezimiz, kronik hipergliseminin tetiklediği oksidatif stres ve nörotoksite durumunda, mitokondriyal morfolojideki değişiklikleri düzenleyen genlerin, diyabetin tetiklediği, Alzheimer'ın neden olduğu komplikasyonların oluşumu ve hastalığın ilerlemesinin kontrol altına alınması noktasında moleküler terapötik hedef olabileceği üzerine kurulmuştur. Patolojik ve moleküler süreçleri ile ilgili çok fazla çalışma yapılmasına rağmen, T2D ve AH'nin birlikte ilerlediği, birinin diğerini tetiklediği, multiple faktörlü durum, çok bilinmeyenli bir denklemdir. Literatürde, T3D'e mitokondriyal disfonksiyonun katkısına dair yeterli çalışma bulunmamaktadır. Yaptığımız bu çalışmada,

yüksek glikoz uygulayarak hiperglisemi modeli geliştirdiğimiz nörotoksik çevrede nöroblastoma hücre hattında (SH-SY5Y), mitokondri dinamiğinde rol oynayan DRP1, OPA1, MFN1, MFN2 ve FIS1 genlerinin ifade düzeylerini belirlemeyi amaçladık.

YÖNTEMLER

Hücre Kültürü

Çalışmamızda SH-SY5Y (insan nöroblastoma) hücre hattı kullanılmıştır. SH-SY5Y hücre hattı, Prof. Dr. Gizem Dönmez Yalçın' dan (Adnan Menderes Üniversitesi) temin edilmiştir ve hücrelerin pasaj sayısı 100'den azdır. %10 fetal bovine serum içeren Dulbecco'nun modifiye edilmiş Eagle ortamı ve Ham's F12 ortamında kültüre alındı. Normal koşullar altında (17,5 mmol/L glukoz içeren ortam, %10 fetal bovine serum, 100 U/mL penisilin ve 100µg/ml streptomisin, %5 CO₂, 37°C) 24 saat inkübasyon ve 12 saat hücre döngüsü senkronizasyonu sonrası, çalışma gruplarımız, normal glukoz (NG; 17,5 mmol/L glukoz) ve yüksek glikoz (HG; 100 mmol/L glukoz) olarak belirlendi. Fetal bovine serumu Gibco (Thermo Fisher Scientific, USA), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, 12-741F), Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS, 17-513), Penisilin-Streptomisin karışımı (17602) ve Tripsin-EDTA çözeltisi (17-161F) Lonza (Lonza Group, Switzerland) firmalarından temin edildi. İn vitro hiperglisemik model oluşturmak için, SH-SY5Y hücreleri üzerindeki farklı glikoz konsantrasyonları uygulaması yapıldı. D (+) glikoz, merck millipore' dan temin edildi (108337). Hiperglisemik model grup için, nihai konsantrasyonu 100 mM olan glikoz, önceki çalışmada tarif edildiği gibi altı kuyucuklu plakalara eklenmiştir^{9,10}. Literatür taraması sonucu, 24 saat ve 100 mM dozunda yaklaşık %50 hücre ölümü gözlemlendiği için, bu doz seçilmiştir. SH-SY5Y hücreleri (1x10⁵ hücre/3 ml medyum) altı kuyulu petrilere ekildi. Hücreler 24 saat 37°C sıcaklık, %95 nem ve %5 CO₂ ortamında inkübasyona bırakıldı. Hücreler

konfluent faza ulaştıktan sonra, 24 saat ve 100 mM dozda glikoz uygulanarak, hiperglisemik ortam oluşturuldu.

Mitokondriyal Genlerin mRNA Düzeylerinin Belirlenmesi

Nörotoksik ortamda SH-SY5Y hücrelerinde, mitokondri dinamiğinde rol oynayan DRP1, OPA1, MFN1, MFN2 ve FIS1 genlerinin ifade düzeylerini belirlemek amacı ile Real time PCR (RT-PCR) yöntemi uygulandı. İn-vitro deney sonrasında, hem normal glikoz düzeyi olan gruptaki hücrelerden, hem de yüksek glikoz uygulanan gruptaki hücrelerden, trizol (Invitrogen, USA) yöntemi ile RNA izole edildi ve elde edilen RNA miktarı ve saflıkları NanoDrop 8000 (Thermo Fisher, USA) cihazı ile 260/280 nm absorbans aralığında belirlendi. Total RNA saflığı 1.8-2.0 civarında olan örnekler çalışmaya dahil edildi. Elde edilen total RNA'lardan TaqMan™ Revers Transkripsiyon kiti (Applied Biosystems, 4304134) ile, kit protokolüne uygun olarak, RNA'dan komplementer DNA (cDNA) sentezi Thermal Cycler (BioRad T100) cihazında gerçekleştirilmiştir. Gene özgü olacak şekilde 20-25 baz uzunluğunda, bağlanma sıcaklığı 60-61°C ve GC baz oranının %50-55 olacak şekilde dizayn edilen, DRP1, OPA1, MFN1, MFN2 ve FIS1 primerleri kullanarak RT-PCR reaksiyonu gerçekleştirildi¹¹. Kullanılan primer dizileri Tablo 1' de verilmiştir. RT PCR, SYBR® (Qiagen, Almanya) kiti ve Thermo Fischer Step One Plus cihazı ile yapıldı. SYBR Green PCR Master Mix (1x) 12,5 µl, cDNA 500 ng, forward primer 0.5 µM ve reverse primer 0.5 µM içeren PCR karışımına, toplam reaksiyon hacmi 25 µl olacak şekilde nükleaz içermeyen su eklendi. Hazırlanan reaksiyon karışımı, 95 °C'de 5 dk, 95°C'de 15 sn 60 °C'de 20 sn, 72 °C'de 30 sn (40 döngü) ve 72 °C'de 10 dk sıcaklığa maruz bırakıldı. Reaksiyon sonrasında, eşik değeri belirlenerek Ct değerleri belirlendi. mRNA'lar için referans gen olarak ACTB (β-actin) kullanıldı. Her bir numune 3' lü set olarak

çalışıldı. Real time PCR sonucunda elde edilen ekspresyon verilerini değerlendirmek için, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü kullanılarak glisemik ve hiperglisemik gruplar karşılaştırıldı.

Tablo 1: QPCR' da kullanılan primer dizileri¹¹.

Gen	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')
FIS1	CTTGCTGTGTCCAAGT CCAA	GCTGAAGGACGAATCTC AGG
MF N2	ACACATGGCTGAGGTG AATG	CGTCCAGAACCTGTTCT TCTG
OP A1	GGATTGTGCCTGACAT TG TG	AAGGCTTTCAACAATCT TG TCA
DRP 1	CAGTGTGCCAAAGGCA GTAA	GATGAGTCTCCCGGATT TCA
MF N1	CCTGTTTCTCCACTGA AGCAC	CCTCACCAATGATGGAA AGC
ACT B	AACTGGGACGACATG GAGAA	GAAGGTCTCAAACATGA TCTGG

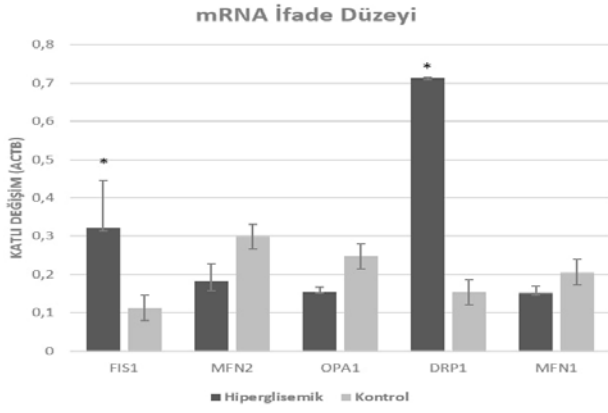
İstatistiksel Analiz

Sonuçların istatistiksel olarak karşılaştırılması "GraphPad Prism 8.0" programı ile gerçekleştirildi. Gruplar arasındaki farklılıklar tek yönlü ANOVA varyans analizi yapılarak belirlendi. Anlamlılık değeri $p < 0,05$ olarak alındı.

BULGULAR

Hiperglisemik ortamda nörotoksisite geliştirdiğimiz insan nöroblastoma hücre hattında, mitokondriyal morfoloji ve fragmentasyonda görevli genlerin mRNA ekspresyonunu inceledik. 100 mM glikoz uygulayarak, nörotoksik ortam geliştirdiğimiz hücrelerde, RT-PCR tekniği ile belirlediğimiz DRP1, OPA1, MFN1, MFN2 ve FIS1 ekspresyon seviyelerine ait değişimler Şekil 1' de gösterilmiştir. Çalışma sonuçlarımıza göre, hipotezimiz ile uyumlu olarak, hiperglisemik grupta, kontrol grubuna oranla FIS1, DRP1 seviyelerinde artış, MFN1, MFN2, OPA1

seviyelerinde azalma gözlemledik. OPA1, DRP1 ve MFN1 genlerine ait değişimler istatistiksel olarak anlamlı olup ($p<0,05$), FIS1, MFN2 genlerine ait değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$). Yüksek glikoz uyguladığımız grupta, kontrol grubuna oranla FIS1, DRP1 (sırasıyla 2,45-kat ve 4,61-kat) seviyelerinde artış ($p<0,05$), MFN1, MFN2, OPA1 (sırasıyla 0,69-kat, 0,58-kat ve 0,62-kat) seviyelerinde azalma ($p>0,05$) gözlemledik. Sonuçlar Şekil 1’de verilmiştir.



Şekil 1. DRP1, OPA1, MFN1, MFN2, FIS1 genlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri verileri (* $p<0,05$).

TARTIŞMA

T2D görülen metabolik değişiklikler ve mitokondriyal değişiklikler birebir ilişkilidir. Yapılan son çalışmalarda, mitokondrilerin sabit ve yalnız bir organel olmadığı, metabolik ihtiyaçları karşılamak için sürekli olarak morfoloji ve hücre altı dağılımda değişiklikler geçirdikleri belirlendi⁶. Mitokondri dinamiğinde meydana gelen bozukluklar, diyabet ve ilişkili nörodejeneratif hastalıkların patolojisinde, hüresel ve moleküler düzeyde önemli bir rol oynar^{6,8}. Biz de yaptığımız bu çalışmada, yüksek glikoz uygulaması ile nörotoksik model geliştirdiğimiz hücre hattında, mitokondriyal düzlemde, moleküler düzeyde rol oynayan önemli genlerin ifade düzeyi farklılıklar belirledik. Bu konu ile ilgili literatür taramalarımız sonucunda, fare ve insanda yapılan çalışmalarda, hiperglisemi ile indüklenen ROS üretimi artışı ile, artan

mitokondriyal fragmentasyon ve fisyon ilişkilendirilmiştir. T2D’de ki mitokondriyal morfolojik tabloda, DRP1 düzeyinde artış, MFN2’de azalma gözlemlenmiştir⁶. Bu çalışmanın bulguları, bizim çalışmamız ile benzer bulgular içermektedir.

Yapılan başka bir çalışmada, hiperglisemi ile indüklenen ROS, hem de insülin salgısı, DRP1 tarafından indüklenen fisyonun engellenmesiyle bloke edildi¹². Ayrıca, bozulmuş mitokondriyal füzyon, iskelet kasında insülin direnci ve karaciğere özgü MFN2 knock out farelerde, glukoz intoleransı ve artmış hepatik glukoneojenez ile ilişkilendirilmiştir^{13,14}. Rat model çalışmalarında, MFN2’nin aşırı ifade edilmesinin insülin duyarlılığını artırdığı, kas ve karaciğerde lipid ara ürünlerini azalttığı belirlenmiştir¹⁵. Moleküler düzeyde, karaciğerdeki MFN2 ifadesi, insülin reseptörü ve glukoz taşıyıcısı GLUT2’nin artan ifadesi ve insülin yolağının aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir^{15,16}. Bu yapılan in-vivo çalışmalar ile uyumlu olarak, bizim yaptığımız in-vitro çalışmamızda hiperglisemi durumunda DRP1 düzeyinde belirgin bir artış, MFN2 düzeyinde azalma gözlemledik.

Mitokondri biyogenezi, bir dizi transkripsiyon faktörü ile düzenlenen, mitokondri füzyon ve fisyonunun normal sağlıklı bir hücrede uyum içinde gerçekleştiği bir süreçtir¹⁷. T2D’de, gerçekleşen hiperglisemik tablo, farklı hücre tiplerinde normalden fazla mitokondri bölünmesine ve parçalanmasına neden olur; bu durumda aşırı ROS üretimi, azalmış mitokondriyal birleşme ve artmış mitokondriyal bölünme ile sonuçlanarak mitokondriyal işlev bozukluğuna yol açar¹⁷. Anormal mitokondriyal biyogenez, enerji düzenlenmesinde aksamalar ve nihayetinde ROS üretimini hızlandırarak diyabet patolojisine sebep olur. Bu nedenle, hiperglisemi ile tetiklenen anormal mitokondriyal dinamikler, T2D kronik komplikasyonlarının temel nedeni

olabilir¹⁸. Diyabetik kardiyomiyopati araştırmalarında, yağ asidi artışının kalpte, mitokondriyal yapısal yeniden şekillenmeye neden olduğu tespit edilmiştir. OPA1 ve DRP1'in post-translasyonel modifikasyonlarını düzenleyerek, mitokondriyal bölünmeyi teşvik edebileceği rapor edilmiştir¹⁹.

T2D hastalarında vasküler endotelial disfonksiyon ve önlenmesine yönelik yapılan bir çalışmada, mitokondriyal fragmentasyon son derece yüksek olup, FIS1 ifadesi artmıştır. FIS1 inhibisyonu ile, T2D' li hastalardan alınan damar örneklerinde, bozulmuş endotel bağımlı vazodilatasyonda iyileşme gözlemlenmiştir. Aynı çalışmada, 33 mM ve 2,5 mM olmak üzere yüksek ve düşük glukoza maruz bırakılan sağlıklı insan damarlarında nitrik oksit biyoyararlanımını korumuş ve endotel hücre tabakası bütünlüğünü iyileştirmiştir. Tam tersine, sağlıklı damarlarda FIS1' de ki ifade artışının vazodilatasyonu bozduğu ve mitokondriyal süperoksit üretimini arttırdığı tespit edilmiştir²⁰.

Metforminin T2D hastalarındaki, mitokondriyal fonksiyon üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada, lökositlerde yapılan analizlerde, mitokondriyal füzyon proteinleri MFN1, MFN2 ve OPA1 mRNA ve protein düzeylerinde daha düşük, FIS1 ve DRP1 protein ve gen ifade düzeylerinde daha yüksek ifadeye sahip olduğu belirlendi²¹. Tip 2 diyabette tedavi ajanı olarak kullanılan metforminin, bu etkilerin çoğunu tersine çevirerek T2D hastalarında gözlenen mitokondriyal fonksiyon ve dinamiklerini düzelttiği tespit edildi²¹. Çalışma verilerimiz, bu çalışma ile uyumludur.

Sakkaroz uygulanarak T2D modeli geliştirilen farelerin beyin mitokondriyal fonksiyonları, sağlıklı kontrol grubu farelerle karşılaştırıldığında, solunum kontrolünde, membran potansiyeli ve ATP/ADP oranlarında azalma belirlenmiştir²². Diyabetik Goto Kakizaki sıçanlarının beyin mitokondrilerinde yaşlanmave amiloid- β (A β) maruziyetinin

etkileri incelenmiş ve T2D' de yaşlanma ve A β maruziyeti eş zamanlılığında, mitokondriyal fonksiyonun en çok bozulduğu durum olduğu rapor edilmiştir²³. Goto Kakizaki diyabetik modeli sıçanlarla yapılan bir diğer çalışmada, A β 1-40 uygulaması ile geliştirilen nörotoksisite durumunda, beyin mitokondrilerinde artan H₂O₂ üretimi, ardından solunum kontrol oranında ve ATP içeriğinde azalmayı indüklediği belirlenmiştir¹⁹. Antioksidan özelliğe sahip, CoQ10 tedavisinin bu negatif etkileri hafiflettiği gözlenmiştir²⁴. T2D fenotipiyle sinir sisteminde mitokondriyal disfonksiyonu tetikleyen diğer patolojik süreçlerin özellikle belirlenmesi gerekmektedir²⁵.

T2D' de mitokondriyal stres faktörlerinin araştırıldığı bir çalışmada, streptozotosin (STZ) ile apoptoz ve metabolik stresin uyarıldığı fare ve insan adacık hücrelerinde, tedavi edici ajan olarak kısa zincirli yağ asitleri kullanılmış. Bu çalışmada kısa zincirli yağ asitlerinin mitokondriyal füzyon genlerinin MFN, MFN2 ve OPA1' in azalmasını önlediği, STZ maruziyeti sırasında füzyon genlerinin DRP1 ve FIS1'in artırılması engellendiği belirlenmiştir. Çalışmamızda da yüksek glikoz ile nörotoksisite geliştirilen grupta benzer sonuçlara ulaşılmıştır²⁶. Arnt-benzeri protein-1'in (Bmal1)' in T2D ilişkili pankreatik B hücre yetmezliğinde araştırıldığı insülinoma (INS-1) hücre hattında, Bmal1'in azaltılmasının mitokondriyal membran potansiyelinde ve mitokondriyal mimaride olumsuz bir değişikliğe neden olduğu tespit edilmiştir. Bmal1'in silinmesi, Mfn1 ve Mfn2 mRNA ve protein ekspresyonunu azaltırken Fis1 ekspresyonunu arttırdığı belirlenmiştir²⁷. Yüksek glikoz ile nörotoksisite oluşturulan, bir diyabet türü olarak kabul edilen Alzheimer'da karşılaşılan tabloya benzer bir durumun, in-vitro ortamda geliştirilmeye çalışıldığı ve mitokondri disfonksiyonunun incelendiği çalışmamıza literatürde rastlanmamıştır. Ancak

çalışmamıza ait bazı sınırlamalar mevcuttur. Mitokondri dinamiğinde rol oynayan sadece 5 gen transkripsiyonel olarak değerlendirilmiştir. Çalışma bulgularını destekler nitelikte, bu genlerin translasyonel ve biyokimyasal seviyede incelendiği, yeni çalışmalar yapılması gerekmektedir. İn-vitro hiperglisemi gibi kompleks hastalık modeli, in-vivoda ki sistemik gerçek durumu tam olarak yansıtmayabilir. İn-vivo hiperglisemik modelde, daha fazla biyobelirticinin transkripsiyonel ve translasyonel seviyede incelendiği, yeni çalışmalar planlanmaktadır.

SONUÇ

Çalışma sonuçlarımıza göre, T2D patofizyolojisinin yol açtığı durumlardan birisi olan, T3D mekanizmasında nörodejenerasyona katkıda bulunan, mitokondri dinamiğinde önemli rol oynayan moleküllerin değişimi, hastalık tablosunda artan fragmentasyonu destekler niteliktedir. Hücrenin enerji üretim fabrikası olan mitokondri biyogenezinde bozulmalar olduğunu destekleyen çalışmamız, bu yönüyle gelecekte planlanacak çalışmalara ışık tutmaktadır. Çalışma bulgularımız literatürü destekler nitelikte olup, mitokondri biyogenezinden sorumlu daha fazla molekülün incelendiği in-vitro ve in-vivo çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Etik Kurul Onayı: Çalışma, in-vitro hücre kültürü çalışması olduğu için ve ticari olarak satılan biyolojik materyal kullanılıp, insan ve insana ait veriler kullanılmadığı için etik kurul onayı alınmamıştır.

Çıkar Çatışması Beyanı: Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Çalışma için herhangi bir kurumdan finansal destek alınmamıştır.

Declaration of Conflicting Interests: No conflict of interest was declared by the authors.

Financial Disclosure: No financial support was received from any institution for the study.

KAYNAKLAR

1. Damanik J, Yunir E. Type 2 Diabetes Mellitus and Cognitive Impairment. *Acta Med Indones.* 2021; 53(2):213-20.
2. Moheet A, Mangia S, Seaquist ER. Impact of diabetes on cognitive function and brain structure. *Ann N Y Acad Sci.* 2015;1353:60-71.
3. Barone E, Domenico FD, Perluigi M, Butterfield DA. The interplay among oxidative stress, brain insulin resistance and AMPK dysfunction contribute to neurodegeneration in type 2 diabetes and Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med.* 2021;176:16-33.
4. Dai SH, Li YW, Hong QX, Su T, Xu SY. Exaggerated activities of TRPM7 underlie bupivacaine-induced neurotoxicity in the SH-SY5Y cells preconditioned with high glucose. *J Biochem Mol Toxicol.* 2021; 35(8):e22826.
5. Kong L, Gu PP, Tang ZZ, Gou LS, Liu YW. High glucose upregulates PAR-1 in SH-SY5Y cells via deficiency of miR-20a and miR-190a. *Fundam Clin Pharmacol.* 2022;36(3):509-517.
6. Ranieri M, Brajkovic S, Riboldi G, et al. Mitochondrial fusion proteins and human diseases. *Neurol Res Int.* 2013; 2013:293893.
7. Wu QR, Zheng DL, Liu PM, et al. High glucose induces Drp1-mediated mitochondrial fission via the Orai1 calcium channel to participate in diabetic cardiomyocyte hypertrophy. *Cell Death Dis.* 2021; 12(2): 216.
8. Williams M, Caino C. Mitochondrial Dynamics in Type 2 Diabetes and Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018; 9: 211.
9. Sasaki-Hamada S, Sanai E, Kanemaru M, Kamanaka G, Oka JI. Long-term exposure to high glucose induces changes in the expression of AMPA receptor subunits and glutamate transmission in primary cultured cortical neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* 2022;589:48-54.
10. Yang Y, Fan C, Wang B, et al. Pterostilbene attenuates high glucose-induced oxidative injury in hippocampal neuronal cells by activating nuclear factor erythroid 2-related factor 2. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2017;1863(4):827-37.

11. Kolac UK, Eken MK, Ünübol M, Yalcin GD, Yalcin A. The effect of gestational diabetes on the expression of mitochondrial fusion proteins in placental tissue. *Placenta*. 2021;115:106-14.
12. Kabra UD, Pfuhlmann K, Migliorini A, et al. Direct substrate delivery into mitochondrial fission-deficient pancreatic islets rescues insulin secretion. *Diabetes*. 2017; 66(5):1247–57.
13. Zhang Y, Yang L, Gao YF, et al. MicroRNA-106b induces mitochondrial dysfunction and insulin resistance in C2C12 myotubes by targeting mitofusin-2. *Mol Cell Endocrinol*. 2013;381(1–2):230–40.
14. Sebastian D, Hernandez-Alvarez MI, Segales J, et al. Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(14):5523–8.
15. Zhang X, Wang C, Song G, et al. Mitofusion-2-mediated alleviation of insulin resistance in rats through reduction in lipid intermediate accumulation in skeletal muscle. *J Biomed Sci*. 2013; 20: 45.
16. Gan KX, Wang C, Chen JH, et al. Mitofusin-2 ameliorates high fat diet-induced insulin resistance in liver of rats. *World J Gastroenterol*. 2013; 19(10): 1572–81.
17. Yu T, Robotham JL, Yoon Y. Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103: 2653–8.
18. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414:813–20.
19. Wang S, Zhao H, Lin S. New therapeutic directions in type II diabetes and its complications: mitochondrial dynamics. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023; 21(14): 1230168.
20. Nolden KA, Kakarla M, Egner JM, et al. A novel Fis1 inhibiting peptide reverses diabetic endothelial dysfunction in human resistance arteries. *BioRxiv*. 2023. doi.org/10.1101/2020.11.16.385054.
21. Marañón AM, Canet F, Zaida AJ, et al. Does Metformin Modulate Mitochondrial Dynamics and Function in Type 2 Diabetic Patients? *Antioxid Redox Signal*. 2021; 35(5): 377-85.
22. Carvalho C, Santos MS, Oliveira CR, et al. Alzheimer's disease and type 2 diabetes-related alterations in brain mitochondria, autophagy and synaptic markers. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1852:1665–1675, 2015.
23. Moreira PI, Santos MS, Moreno AM, et al. Increased vulnerability of brain mitochondria in diabetic (Goto-Kakizaki) rats with aging and amyloid-beta exposure. *Diabetes*. 2003; 52: 1449–56.
24. Moreira PI, Santos MS, Sena C, et al. CoQ10 therapy attenuates amyloid beta-peptide toxicity in brain mitochondria isolated from aged diabetic rats. *Exp Neurol*. 2005;196:112–9.
25. Pinti MV, Fink GK, Hathaway QA, et al. Mitochondrial dysfunction in type 2 diabetes mellitus: an organ-based analysis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2019; 316(2): E268–E285.
26. Hu S, Kuwabara R, Haan BJ, et al. Acetate and Butyrate Improve β -cell Metabolism and Mitochondrial Respiration under Oxidative Stress. *Int J Mol Sci*. 2020;21(4):1542.
27. Ye L, Wu H, Xu W. Deletion of Bmal1 Impairs Pancreatic β -Cell Function via Mitochondrial Signaling Pathway. *Biomed Res Int*. 2020; 2020: 9803024.