



**5-HT7 RESEPTÖR AGONİST VE ANTAGONİSTLERİNİN
İNSAN NÖROBLASTOMA HÜCRE (SH-SY5Y) HATTINDA
GLUTAMAT İLE İNDÜKLENEN NÖROTOKSİSİTE VE
HÜCRE ÖLÜMÜNDEKİ ROLÜ**

Arş.Gör.Tuğba Nurcan YÜKSEL

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

**Tez Danışman
Prof. Dr. Zekai HALICI**

Doktora Tezi – 2016

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

**5-HT7 RESEPTÖR AGONİST VE
ANTAGONİSTLERİNİN İNSAN NÖROBLASTOMA
HÜCRE (SH-SY5Y) HATTINDA GLUTAMAT İLE
İNDÜKLENEN NÖROTOKSİSİTE VE HÜCRE
ÖLÜMÜNDEKİ ROLÜ**

Araş.Gör.Tuğba NurcanYÜKSEL

**Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Zekai HALICI**

**ERZURUM
2016**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**5-HT7 RESEPTÖR AGONİST VE ANTAGONİSTLERİNİN
İNSAN NÖROBLASTOMA HÜCRE (SH-SY5Y) HATTINDA
GLUTAMAT İLE İNDÜKLENEN NÖROTOKSİSİTE VE HÜCRE
ÖLÜMÜNDEKİ ROLÜ**

Araş.Gör.Tuğba Nurcan YÜKSEL

Tez Savunma Tarihi : 10.06.2016

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Zekai HALICI (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Yasin Bayır (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Elif ÇADIRCI (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ (Erzurum Teknik Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Damla ÇETİN (Kafkas Üniversitesi)

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM
Enstitü Müdürü

Doktora Tezi
ERZURUM – 2016

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
ÖZET	II
ABSTRACT.....	III
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Glutamat.....	3
2.1.1 Glutamat Reseptörleri	3
2.1.2 Glutamat Salınımı	5
2.1.3 Glutamat ve Oksidatif Stres	6
2.1.4 Glutamat ve Apoptoz	7
2.1.5 Nöron Kültüründe Glutamat	8
2.1.6 Glutamat ve Nörotoksisite	9
2.2 Serotonin.....	9
2.2.1 Serotonin Reseptörleri	10
2.2.2 5-HT7 Reseptörü.....	13
3. MATERYAL VE METOD	15
3.1 Materyal	15
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar ve Reaktifler	15
3.2 Metod	15
3.2.1. Hücre Kültürü ve Proliferasyon Analizi	15
3.2.2. Moleküler İncelemeler	16
3.2.2.1 Real-time PCR	16
3.2.3. Biyokimyasal İncelemeler	17

3.2.3.1 SOD, GSH ve MDA Analiz Prosedürü	17
3.2.3.2. TNF- α Analiz Prosedürü.....	18
3.2.3.3 Protein Tayini	18
3.3. İstatistiksel Analiz.....	18
4.BULGULAR.....	19
4.1 Hücre Proliferasyon Bulguları	19
4.2. Biyokimyasal Bulgular	21
4.3. Moleküler Bulgular.....	24
5.TARTIŞMA.....	27
6.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	31
KAYNAKLAR	32
EKLER	51
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	51

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bana yol gösteren, tez konumun seçilmesinde ve çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübeleri ile beni destekleyen ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Zekai HALICI'ya saygılarımı sunarım.

Doktora eğitimime katkıda bulunan başta Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof.Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU'na, laboratuvar çalışmalarında ve tez yazımında her türlü desteklerinden dolayı Doç. Dr. Elif ÇADIRCI, Doç. Dr. Emre KARAKUŞ, Doç. Dr. Yasin BAYIR, Doç. Dr. Beyzagül POLAT, Yrd. Doç. Dr. Muhammed YAYLA ve Araş. Gör. Duygu KÖSE'ye, akabinde tüm değerli hocalarıma ve Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda görev yapmakta olan, birlikte çalışmaktan onur duyduğum asistan arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmayı 112S627 TÜBİTAK proje numarası ile destekleyen TÜBİTAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Araş.Gör.Tuğba Nurcan YÜKSEL

ÖZET

5-HT Reseptör Agonist ve Antagonistlerinin İnsan Nöroblastoma Hücre (SH-SY5Y) Hattında Glutamat ile İndüklenen Nörotoksisite ve Hücre Ölümündeki Rolü

Amaç: Glutamat SSS’de ana uyarıcı nörotransmitter olmasına ek olarak aynı zamanda önemli bir nörotoksindir. Glutamat nörotoksisitesini aydınlatan fazla araştırma olmamakla beraber farklı mekanizmaların rolü düşünülmektedir. Serotonin, SSS’de rol alan ve etkilerini reseptörleri üzerinden gösteren önemli bir nörotransmitterdir. Bu çalışmanın amacı; glutamat ile indüklenen nörotoksisite modelinde 5-HT₇ reseptör agonist ve antagonistinin SH-SY5Y hücre hattında glutamat ile indüklenen nörotoksisite modelindeki rolünü incelemektir.

Materyal ve Metot: Glutamatın optimum toksisite konsantrasyonu olan 80 mM glutamat kullanıldı. Hücrelere glutamat uygulamasından 60 dakika önce artan konsantrasyonlarda LP44 ve SB269970 uygulandı. Hücre proliferasyonu xCelligence sistemi ile ölçüldü.

Bulgular: LP44 uygulaması, 24, 48, ve 72. saatlerde zamana bağlı olarak tüm konsantrasyonlarda hücre canlılığını önemli derecede artırdı. LP44 uygulaması GSH seviyesinde ve SOD aktivitesinde artışa sebep olurken, MDA düzeylerinde ise önemli bir azalmaya neden oldu. Ayrıca LP44 uygulaması kaspaz 3 ve kaspaz 9 mRNA ekspresyonları üzerine inhibitör etki meydana getirirken TNF- α seviyelerini düzeltmiştir. Ancak glutamat grubu ile karşılaştırıldığında SB269970 uygulaması oksidatif stres, enflamasyon ve apoptozise karşı önemli bir etki meydana getirmedi.

Sonuç: Bu bulgular, glutamatın sebep olduğu nörotoksisitede 5-HT₇ reseptörlerinin önemli bir rol oynayabileceğini ve 5-HT₇ reseptör agonistlerinin bu toksik etkiyi geriye dönderebileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Glutamat, Nörotoksisite, SH-SY5Y, 5-HT, 5-HT₇

ABSTRACT

Role of 5-HT₇ Receptor Agonist and Antagonist Against Glutamate induced Neurotoxicity and Apoptosis in Human Neuroblastoma Cell (SH-SY5Y) via

Aim: Glutamate is a major neurotoxin at the same time in addition to the major excitatory neurotransmitter in the central nervous system. Although research is completely not illuminating glutamate neurotoxicity, it is thought to be the role of different mechanisms. Serotonin is an important neurotransmitter showing its effects on receptors and has important roles in the central nervous system. The purpose of this study is to investigate the roles of 5-HT₇ receptor agonists and antagonists on glutamate-induced neurotoxicity models in SH-SY5Y cell line.

Material and Method: 80 mM glutamate the optimum concentration of glutamate toxicity were used in the subsequent study. Increasing concentrations of LP44 and SB269970 were added 60 min before the glutamate was added to cells. Cell proliferation was measured via the xCelligence system.

Result: LP44, at all concentrations after 24, 48, and 72 h, caused significant elevations in cell viability. LP44 significantly decreased the MDA levels and ameliorated in SOD activity and in the GSH levels. Also, LP44 administration significantly improved the TNF- α levels and inhibitory effect on caspase 3 and 9 mRNA expressions. However, SB269970 showed insignificant effect on oxidative stress, inflammation and apoptosis when compared to glutamate group.

Conclusion: These findings demonstrate that 5-HT₇ may play a critical role in neurotoxicity caused by glutamate and 5-HT₇ receptor agonists can reverse rotate this toxic effect.

Key Words: Glutamate, Neurotoxicity, SH-SY5Y, 5-HT, 5-HT₇

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AMPA: α -amino-3-hidroksi-5metil-4izoazolepropionik asit

ERK: ekstrasellüler sinyal düzenlenir kinaz

GSH: Glutasyon

GPCR: G proteinine bağlı membran proteinleri

5-HT: 5-hidroksitriptamin, serotonin

iGluR: İyonotropik glutamat reseptörleri

MDA: Malondialdehit

mGluR: Metabotropik glutamat reseptörleri

NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

NMDA: N-metil-d-aspartat

NO: Nitrik oksit

NOS: Nitrik oksit sentaz

ROT: Reaktif oksijen türleri

SOD: Süperoksitdismütaz

SSS: Santral sinir sistemi

TCA: Asetil Co-A tri-karboksilik asit

TNF: Tümör nekroz faktör

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 4.1. LP44 uygulanan hücrelerin canlılığı.	19
Şekil 4.2. SB269970 uygulanan hücrelerin canlılığı.	20
Şekil 4.3. Kontrol grubu ve glutamat uygulanan grupların mikroskopik proliferasyon görüntüleri.....	20
Şekil 4.4. SH-SY5Y hücrelerinde glutamat ile indüklenen nörotoksisite gruplarındaki ve kontrol grubundaki SOD aktivitesi üzerine 5-HT7 agonist ve antagonistinin etkisi	21
Şekil 4.5. SH-SY5Y hücrelerinde glutamat ile indüklenen nörotoksisite gruplarındaki ve kontrol grubundaki GSH seviyesi üzerine 5-HT7 agonist ve antagonistinin etkisi	22
Şekil 4.6. SH-SY5Y hücrelerinde glutamat ile indüklenen nörotoksisite gruplarındaki ve kontrol grubundaki MDA seviyesi üzerine 5-HT7 agonist ve antagonistinin etkisi	23
Şekil 4.7. SH-SY5Y hücrelerinde glutamat ile indüklenen nörotoksisite gruplarındaki ve kontrol grubundaki TNF- α seviyesi üzerine 5-HT7 agonist ve antagonistinin etkisi	24
Şekil 4.8. SH-SY5Y hücrelerinde glutamat ile indüklenen nörotoksisite gruplarındaki ve kontrol grubundaki kaspaz 3 mRNA ekspresyonu üzerine 5-HT7 agonist ve antagonistinin etkisi.....	25
Şekil 4.9. SH-SY5Y hücrelerinde glutamat ile indüklenen nörotoksisite gruplarındaki ve kontrol grubundaki kaspaz 9 mRNA ekspresyonu üzerine 5-HT7 agonist ve antagonistinin etkisi.....	26

1. GİRİŞ

Glutamat santral sinir sisteminde (SSS) ana uyarıcı nörotransmitter olmasına ek olarak aynı zamanda önemli bir nörotoksindir.^{1, 2} Epilepsi, alzheimer, parkinson, travma ve inme gibi beyin hastalıklarında hücre dışı ortama salınan glutamat ve aspartat gibi uyarıcı aminoasitler nöronal hasar ve dejenerasyondan sorumlu tutulmaktadır. Hücre dışı ortamda glutamatın artması astroglial hücrelerin şişmesine neden olur ve astrositlerin parçalanmasına öncülük eden bir dizi yıkıcı olayı başlatmaktadır. Nörodejeneratif hastalıklar sonrası, nöronların yaşamını sürdürmesi ve iyileşmesinde astrositlerin çok önemli yeri vardır.³ Astrositlerde meydana gelen hasar SSS'de daha ileri kayıplara neden olabilmektedir. Bu yüzden astrositlerin ölümünde sorumlu mekanizmaların belirlenmesi, bu mekanizlara karşı koruyucu stratejilerin geliştirilmesi son derece ilgi çekicidir. Yapılan çalışmalar glutamatın nöron hücre kültürlerinde NMDA reseptör situmülasyonlarını artırarak hücre içi kalsiyum dengesini bozduğunu ve oksidatif stresi artırarak nörotoksisite oluşturduğunu göstermiştir.⁴ Glutamat nörotoksisitesinin erken fazında salınan reaktif oksijen türlerini (ROT) yakalamak için sitokrom c salınmakta ve kısmi olarak glutamat nörotoksisitesi önlenmeye çalışılmaktadır.⁵ Glutamat nörotoksisitesinin ilerleyen fazında ROT salınımı arttığı için hücre bunu tolere edemez ve fonksiyonel bozukluklar meydana gelmeye başlar. Bunun sonucunda mitokondriyal hasar meydana gelir ve hücre apoptoza uğramaktadır.⁶ Hücrelerin glutamat nörotoksisitesinden korunmasına yönelik yeni stratejilerin geliştirilmesi nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için de yeni stratejiler olarak kullanılmasına olanak sağlamaktadır.

Vazoaktif bir amin olan serotonin (5-HT) ağrı, iştah, duygu durum ve uyku gibi davranış ve psikolojik olaylarda rol alan önemli bir nörotransmitterdir.⁷ Ayrıca yapılan deneysel çalışmalar sonrasında 5-HT₇ reseptörlerinin bazı enflamatuar sitokinlerin

ekspresyonlarını modüle ettiği de gösterilmiştir.⁸ Anabilim dalımızda yapılmış olan daha önceki çalışmalarda sepsis gibi sistemik bir enflamatuvar hadisede ve pençe ödemi oluşturulmuş ratlarda gelişen akut enflamasyonda 5-HT7 reseptörlerinin çok önemli rollere sahip olduğu gösterilmiştir.^{9, 10} Bu alışmalarda 5-HT7 reseptörlerinin agonist ile uyarılması sonucunda enflamatuvar sitokinlerde ve oksidan parametrelerde düzelme gözlenmiştir. Bu alışmalar serotoninin 5-HT7 reseptörleri üzerinden antienflamatuvar ve antioksidan etki ortaya koyduğunu göstermektedir. Ayrıca serotoninin 5-HT7 reseptör yolu ile ekstrasellüler sinyal düzenlenir kinaz (ERK) fosforilasyonunu indüklediği ve nükleer faktör kappa  aktive ederek apoptozisi önlediği gösterilmiştir.¹¹ Yine yapılan bir çalışmada sevofluran ile indkelenen amnezide hipokampal nöronlarda meydana gelen apoptozisi 5-HT7 reseptör agonisti kullanarak önlendiği ve bu etkisinin caspase 3 inhibisyonu ile gerçekleştirdiği gösterilmiştir.¹² Bu alışmalar 5-HT7 reseptörlerinin antiapoptotik etkinliğe de sahip olduğunu göstermektedir.

Tüm bu bilgiler ışığında çalışmamızın amacı glutamat ile indüklenmiş nörotoksisite modelinde 5-HT7 reseptörlerinin rollerini ortaya koymaktır. Aynı zamanda 5-HT7 reseptörlerinin glutamata bağlı gelişen toksisite üzerindeki muhtemel etkilerini oksidatif stres, enflamasyon ve apoptoz ile ilişkili yolaklar üzerinden göstermektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Glutamat

Glutamat, beyindeki en önemli eksitatör nörotransmitter olmakla birlikte uyarı iletiminin önemli bir bölümünden sorumludur. Ayrıca memeli SSS'sinde öğrenme, bellek fonksiyonları, sinaptik plastisite gibi çeşitli fizyolojik olayları düzenlemede önemli bir role sahiptir.¹³⁻¹⁵

Glutamat, SSS'deki nöronlar ve glia hücrelerinde bulunmaktadır. Glutamat, Kreps döngüsü ara ürünlerinden α -keto glutaratın indirgeyici aminasyonu ile oluşmaktadır. Bu tepkime geri dönüşümlüdür ve daha sonraki metabolizma ise sitrik asit döngüsü ile meydana gelmektedir. Glutamaterjik nöronlar bilginin şifre edilmesi, bellek oluşumu ve kullanılması, uzaysal tanıma ve bilincin sürdürülebilmesi gibi önemli birçok hayati görevi taşımaktadır. Glutamat aynı zamanda önemli bir nörotoksindir. Hipoksik hasar, hipoglisemi, inme, epilepsi, depresyon ve parkinson ile ilişkili durumlarda glutamat reseptörlerinin aşırı uyarımı söz konusudur. Hasar ve glutamat reseptörlerinin aşırı uyarılması arasında oldukça güçlü ve önemli bir bağlantı vardır.¹⁶⁻²⁰

2.1.1 Glutamat Reseptörleri

Glutamat, etkisini glutamat reseptörlerini uyararak gösterir. Farmakolojik ve elektrofizyolojik özelliklerine göre iki farklı glutamat reseptör grubu vardır. Birincisi iyonotropik glutamat reseptörleri (iGluR), ikincisi ise metabotropik glutamat reseptörleridir (mGluR). Kompetitif agonist ve antagonistler, pozitif ve negatif modülatörler gibi selektif ligandlara sahip olmaları glutamat reseptörlerinin fonksiyonlarının araştırılmasında önemli bir role sahiptir.²¹

Plazma membranı üzerine yerleşmiş halde bulunan iGluR'ların N-terminali hücre dışında olup glutamat bağlarken, hücre içinde bulunan C-terminali ise protein bağlayan kısımları ve çoklu fosforilasyon bölgeleri ile nöronal iletiyi kontrol ederler. Ayrıca

iyonların hücre içi ile hücre dışı arasında giriş çıkışlarını sağlarlar. Bütün iGluR'lar katyonlara geçirgenlik gösterirken Na^+ ve Ca^{+2} 'a karşı geçirgenlikleri reseptör alt birimlerine göre farklılık gösterir. Glutamat aktif haldeki reseptörüne bağlandığında iyon akışı gerçekleşerek nöronal eksitasyona neden olur.²²

iGluR'ların kendi selektif uyaranlarının adlarını taşıyan N-metil-d-aspartat (NMDA), α -amino-3-hidroksi-5-metil-izoazolepropionik asit (AMPA) ve 2-karboksi-3-karboksimetil-4-izopropenilpirrolidin (Kainat) olmak üzere üç önemli tipi vardır.²¹

NMDA reseptörü, serebral iskemi sonrası hücre ölümü dahil nöronal patolojide²³ ve hipokampusda uzun süreli potansiyasyon içeren nöron modülasyonunda rol oynar.²⁴ NMDA reseptörü çeşitli endojen ligandlara sahiptir. Glutamatın yanısıra voltaja bağımlı kanalları bloklayan Mg^{+2} ve kanalların açılmasından sorumlu olan glisin içerir.²⁵ İki değerlikli antagonist ise Zn^{+2} 'dur ve bloklamada görevlidir.²⁵ Kanal aktivitesinin eksojen modülatörleri, pensiklidin²⁵ ve etanol gibi²⁶ psikoaktif ajanlar ve nörotoksinler içerir.²⁷

NMDA reseptörlerinin çeşitli alt birimleri klonlanmıştır: NMDAR1 (NR1), NMDAR2A, NMDAR2B, NMDAR2C ve NMDAR2D. NMDA reseptörleri yüksek Ca^{+2} geçirgenliğine ve yavaş kinetiğe sahiptirler.

AMPA reseptörleri; GluR1, GluR2, GluR3 ve GluR4 olmak üzere dört alt tipten oluşur. Bu reseptörler yavaş Ca^{+2} geçirgenliğine ve hızlı kinetiğe sahip olup hızlı sonlanan depolarizasyona neden olur.²⁸ Ayrıca Na^+ , K^+ ve H^+ için daha seçicidirler. Hızlı eksitator sinaptik geçişte rol oynarlar.²⁹⁻³¹

Kainat reseptörleri; GluR5, GluR6, GluR7, KA1 ve KA2 olmak üzere 5 alt birimden oluşur. Bu reseptörlerin uyarılması uzun süreli, desentize olmayan yanıtlara sebep olmaktadır.^{21, 32}

Metabotropik Glutamat Reseptörleri

Günümüzde metabotropik glutamat reseptörlerinin (mGluR) sekiz üyesi (mGluR1-8) belirlenmiştir. Farmakolojik özellikler, dizilim ve ikinci haberciye bağlanma özelliklerine göre mGluR'lar üç bölüme ayrılırlar.

1.grup: mGluR1 ve mGluR 5

2.grup: mGluR2 ve m GluR3

3.grup: mGluR 4, mGluR6, mGluR7, mGluR8

1.grup mGluR'lar; Gq yardımı ile fosfolipaz C'ye bağlanarak aktivasyona sebep olur. 2.ve 3.grup mGluR'lar ise Gi yardımıyla adenilat siklaz aktivitesini inhibe eder.³³

Heteromerik G proteini $\beta\gamma$ alt ünitelerinin uyarılması, iyon kanalı aktivitesi modülasyonu ve intraselüler ikinci haberci yolu ile mGluR'da uyarı meydana gelir.³⁴⁻³⁶ Retina yerleşimli mGluR6 dışında^{37, 38} tüm mGluR'lar memelilerin SSS'sinde hem glial hem de nöronal hücrelerde yerleşmiştir.³⁹ mGluR'lar ayrıca nosiseptif sistem ve periferik sinir sisteminde de lokalizedir.^{36, 39} Nöronlarca eksprese edilen 1.grup mGluR'lar ağırlıklı olarak postsinaptik somatodendritik alanlarda yerleşirken, 2. ve 3. grup mGluR'lar postsinaptik aksonal alanda ve aksonal terminallerde yerleşiktir.³⁹

2.1.2 Glutamat Salınımı

Beyinde, kandan ayırarak beyin hücre dışı ortamının içeriğini kontrol altında tutulmasını sağlayan kan-beyin bariyeri vardır. Beynin damar endotel hücreleri birçok maddeye geçirgen olmayıp aktif taşıma mekanizmaları oldukça sınırlıdır. Glikoz ise sistemik dolaşımda büyük oranda bulunan tek enerji kaynağıdır ve kolayca kan-beyin bariyerini geçebilmektedir. Serumda bulunan glutamat ise SSS'ye geçemediği için SSS'deki glutamat bu bölgede sentezlenmektedir. Nöron ve astrositlerin her ikisi de glukozu glikoliz olayı ile piruvata dönüştürebilmektedir. Sonra piruvattan asetil Co-A elde edilmektedir. Asetil Co-A tri-karboksilik asit (TCA) döngüsü ile CO₂ ve H₂O'ya

kadar indirgenebilir. TCA döngüsü sırasında oluşan α -keto glutarat alanin ile transamine edilerek glutamat elde edilmektedir.⁴⁰

2.1.3 Glutamat ve Oksidatif Stres

Oksidatif stres, çekirdek membranında ve endoplazmik retikulumda yer alan serbest radikaller aracılığı ile meydana gelmekte ve nörodejenerasyon oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır.

Reaktif oksijen türlerinden süperoksit radikal, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali mitokondrilerde oksidatif fosforilasyon ile moleküler oksijenin suya redüksiyonu sırasında meydana gelmektedir. Üretilen serbest radikaller; enzimlerde yaşa bağlı fonksiyon kaybı, nitrik oksit sentaz (NOS) aktivasyonu, beta amiloid birikimi ve kalsiyum akımının artışına neden olur.⁴¹ Kalsiyum ile fosfolipaz A₂'nin aktive olması sonucu araşidonik asitten lipooksijenaz ve siklooksijenazlar aracılığı ile eikonazoidler oluşurken süperoksit anyonu meydana gelir.⁴² Düşük konsantrasyonlarda bile bu anyon nöronlara toksik etki yapar.⁴³ Araşidonik asit metabolizması sırasında oluşan bu serbest oksijen radikalleri fosfolipaz A aktivasyonu ile pozitif geri bildirim yapar.⁴⁴⁻⁴⁶ Araşidonik asit metabolizması sırasında nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz stimülasyonu ile de serbest radikaller oluşur.⁴⁷ Kalsiyumun NOS'u aktive etmesi ile oluşan nitrik oksit (NO)⁴⁸, O⁻² anyonu ile reaksiyona girerek peroksinitrit anyonu oluşturur ve bunun ayrışması ile OH⁻ radikali oluşarak nöron ölümü meydana gelir.^{43, 49} Oksidatif fosforilasyon da NO tarafından inhibe edilir.⁴⁸ Enerji eksikliği ve yüksek hücre içi Ca⁺² durumlarında ksantin dehidrojenaz Ca⁺²'a bağımlı proteazlarca ksantin oksidaza çevrilir.⁵⁰

Hipoksantin ve ksantin ksantin oksidaz etkisi ile ürik asite dönüştürüldüğü reaksiyonlarda O⁻² anyonu oluşur. H₂O₂'den çok reaktif olan OH⁻ radikali oluşumu Fe⁺²

iyonları varlığında fenton reaksiyonu ile hızlandırılır. Laktik asit arttıkça Fe^{+2} hücre depolarından salınır ve fenton reaksiyonunu sağlar.⁵¹

Ayrıca serbest radikaller hücre zar yapısını bozarak hücre bütünlüğünün ve işlevlerinin kaybolmasına sebep olur.⁵²

Ek olarak yapılan in vitro çalışmalar, oksijen radikalleri oluşumunun glutamat stimülasyonu ile ilişkili olan nöronlarla etkileştiklerini göstermiştir. Oluşan serbest radikaller, hem glutamat salınımına hem de geri alınımının baskılanmasına yol açarlar.⁴¹

2.1.4 Glutamat ve Apoptoz

Ölmeye programlanmış hücrelerin kendi nükleer DNA'larını, nükleer ve sitoplazmik proteinlerini parçalayacak enzimleri aktive eden hücre ölümü yolağı apoptoz olarak tanımlanmaktadır. Hücrenin plazma membranı tomurcuklanmasına rağmen yapısal olarak bütünlüğü bozulmaz. Ölü hücre; içeriği dışarı sızmadan hızlıca temizlenir ve bu nedenle apoptotik hücre ölümü nekrozdan farklı olarak konakta enflamatuvar reaksiyona yol açmaz. Normal fizyolojik koşullarda organizmada apoptoz birçok durumda meydana gelmektedir. Apoptoz, istenmeyen ya da potansiyel olarak zararlı hücreleri ve kullanılır olma süresini aşmış hücreleri ortadan kaldırmaya hizmet eder. Aynı hasarın özellikle hücrenin DNA'sını etkilemesi gibi durumlarda hücreler onarılamayacak ölçüde zarar gördükleri için bu hücreler elimine edilir.⁵³ Fetal yaşam sırasında hücrelerin büyük kısmı embriyonal dönemdeki temel hücre ölüm şekli olan apoptoz ile ortadan kaldırılır. Hücre çekirdeğinde DNA hasarı tamir edilemeyecek boyuta geldiğinde apoptoz programları aktive olabilir.^{54, 55}

Apoptozu başlatan genler, ölüm sinyallerini hücre dışında bulunan ölüm reseptörleri aracılığı ile hücre içine iletirler. Ölüm reseptörleri, tümör nekroz faktör (TNF) reseptörünün üst ailesine aittir ve TNF reseptör-1, Fas molekülü ve nötroprotein

reseptör p75'i içerir. Ayrıca ölüm sinyalinin dışarıdan gelmesi şart değildir, hücre içerisinde hasarlanmış DNA, endoplazmik retikulum veya mitokondri de bu sinyalin kaynağı olabilir.^{56, 57}

Glutamatın da hem akut hem de kronik nörodejeneratif hasarlar meydana getirerek hücre ölümünü indüklediği bilinmektedir.⁵⁸⁻⁶⁰ Bu nedenle glutamat sinyal iletimi diseksiyonu nöroproteksiyonda önemli bir role sahiptir. Ayrıca birçok durumda, glutamat nörotoksitesi glutamat reseptörlerinin NMDA alt tipinin aşırı uyarılmasına dayandırılabilir.^{4, 61-64}

2.1.5 Nöron Kültüründe Glutamat

Günümüzde doku kültürü yapılan hücreler arasında en zor grubu SSS hücreleri oluşturmaktadır. Bu grupta yer alan nöroblastoma hücreleri de hücre kültürü ortamında üzerinde en fazla çalışılan hücre topluluklarından biridir. Primer hücre kültürleri 1900'lerin başında Harrison ve Carrel tarafından çalışılmaya başlanmıştır. Harrison'un kültür ortamında nöronal gelişimi göstermesinden sonra Peterson ve Muray tarafından sinaptogenez ve miyalinizasyon özellikleri gösterilmiştir.⁶⁵

Primer nöron kültürlerinin glutamata maruz bırakılması ile önce Na^+ 'un hücre içine girişi ile hücrede şişme meydana gelir.⁶⁶⁻⁶⁹ Daha sonra birkaç dakika içinde Ca^{+2} sitoplazma içinde birikir.⁷⁰⁻⁷² Sitoplazmadaki miktar iyice artınca mitokondri tarafından alınır ve orada tutulur. NMDA reseptörleri Na^+ 'a nazaran Ca^{+2} 'a daha geçirgendir. Ancak Na^+ konsantrasyonu Ca^{+2} 'dan yüz kat daha fazla olduğu için Na^+ girişi daha çok olur. Buna bağlı olarak glutamat nörotoksitesinde Na^+ 'u dışarı atmak için Na-K-ATPaz'ın daha çok çalışmasına ihtiyaç vardır. Yani nöronun enerji ihtiyacı artmıştır. Ca^{+2} girişi ile Ca^{+2} -ATPaz da aktive olur ve enerji ihtiyacı daha da artar. Ayrıca Ca^{+2} 'un mitokondriye taşınması nedeni ile mitokondrial ATP sentezi bir süre sonra durur.⁷³ Ca^{+2} 'un NMDA aracılı hücre içine girişi yanında bunu takiben meydana gelen reaktif

oksijen radikalleri glutamat nörotoksitesinde ana sorumlu olarak kabul edilmektedir.⁷⁴⁻

76

2.1.6 Glutamat ve Nörotoksisite

Olney ve Sharp tarafından 1969 yılında eksitatör aminoasit olan glutamatın nöronlar üzerine toksik etki oluşturabileceği öne sürülmüştür.⁷⁷ Glutamatın immatür farelere enjeksiyonu sonrası retinanın iç nöral tabakalarında harabiyet oluşturduğu ilk kez Lucas ve Newhouse tarafından gösterilmiştir.⁷⁸

Nörotoksisite; inme, hipoksi-iskemi, travma, epilepsi, nörodejeneratif hastalıklar gibi durumlarda hücre ölümünde önemli bir mekanizma olarak kabul edilmektedir. Bu hastalıklarda glutamat reseptörlerinin anormal aktivasyonu nöron ölümünde son ortak yoldur.⁷⁹

Nörotoksisite glutamatın aşırı salınımı veya sinaptik aralıktan yetersiz geri alınımı nedeni ile oluşur. Glutamat aktif transport mekanizmaları ile sinir hücresinin sitoplazması içinde veya sinaptik veziküller içinde tutulur. Hipoglisemi, iskemi gibi enerji yetersizliği durumlarında, glutamat bulunduğu yerde tutulamadığı için hücre dışına çıkar.⁷⁹ Patolojik durumlarda iyon taşıyıcılarının işlev yapamaması nedeni ile glutamat hücre içine sokulamaz ve hücre dışındaki miktarı aşırı miktarda artar.⁸⁰ Ekzositoz yolu ile glutamatın dışarı verilmesi de hücre dışı glutamatın artışına bir miktar katkıda bulunur.⁷⁹

2.2 Serotonin

Serotonin ilk olarak 1937’de Erspamer ve arkadaşları tarafından enterokromaffin hücrelerde bulunup, enteramine adı ile hayatımıza girmiştir.⁸¹ Ayrıca, 1948 yılında Page ve arkadaşları tarafından kandan saflaştırılmış ve bir yıl sonra kimyasal yapısı ortaya çıkarılmış bir indolamindir.

Serotonin çeşitli bitki ve hayvan dokularında, yılan zehrinde, arı ve akrebin iğnelerinde mevcuttur.^{82, 83} İlerleyen süreçte beyinde de tespit edilen 5-hidroksitriptamin (5-HT) ve serotoninin aynı madde olduğu anlaşılmıştır.^{84, 85}

Serotonin esansiyel bir amino asit olan L-triptofandan sentezlenen güçlü bir düz kas stimülanı ve vazokonstrüktördür. Serotonerjik nöronların aksonal terminalinde sentezlenir ve veziküller içerisinde depolanır. Uyarın geldiğinde bu veziküller içerisinden sinaptik aralığa salınır. Beyindeki serotonerjik nöronların büyük kısmı, raphe çekirdeği içerisine yerleşmiştir. Hücre stoplazmasına giren L-triptofan, triptofan hidroksilaz ile hidroksillenir ve 5-hidroksitriptofana dönüşür. 5-hidroksitriptofan, aromatik L-amino asit dekarboksilaz ile dekarboksillenir ve serotonin oluşur.⁸⁶

Çeşitli biyolojik sistemlerde önemli role sahip olduğu bilinen serotonin, intestinal mukozada enterokromafin hücrelerde lokalize olup buradaki düz kasları uyarak gastrointestinal hareketi artırır.⁸⁶

SSS serotonerjik hücre gövdelerinin büyük kısmı beyin sapındaki üç bölgeden biri olan ponsun üst bölümünde, özellikle orta beyinde dorsal rafe çekirdeğinde, kaudal lokus sruleus, postrema alanı ve interpedinküler alanda bulunmaktadır.⁸⁶ Geri kalan kısmı çeşitli fonksiyonlarda olan SSS'deki serotonerjik nöronlarda sentezlenir. Depresyon, sosyal fobi, şizofreni, obsesif kompulsif bozukluk, migren, hipertansiyon, yeme bozuklukları, bulantı ve kusma gibi birçok bozukluğun etiyolojisinde yer alır.⁸⁷

2.2.1 Serotonin Reseptörleri

Serotonin etkilerini kendine özgü reseptörleri üzerinden gösterir. Presinaptik ve postsinaptik hücre membranlarında bulunan farklı tipteki bu reseptörlerin uyarılması ile efektör hücre nöronları üzerinde çeşitli etkiler ortaya çıkmaktadır.⁸⁸

Serotonin reseptörleri 7 alt aileden (5-HT1-7) oluşur⁸⁹. Ligand-kapılı iyon kanalı olan 5-HT3 reseptörü⁹⁰ dışındaki 5-HT1, 5-HT2, 5-HT4, 5-HT5, 5-HT6, 5-HT7

reseptörleri G proteinine bağılı membran proteinleri (GPCR) süperfamilyasına aittir.⁹¹ GPCR'ler membranı geçen 7 hidrofobik bölge, 3 intraselüler, 3 ekstraselüler halkadan oluşan, amino terminali hücre dışında, karboksi terminali hücre içinde bulunan integral membran proteinleridir.⁹² Ekstraselüler alanlar, tipik olarak glikozillenir ve disülfid bağları oluşturarak konformasyonel yapıyı değıştiren sistein kalıntıları içerir. İntraselüler alanlar, G-proteinleri ve diğere regülatör proteinler ile etkileşen ve ayrıca farklı serin-treonin kinazlar tarafından fosforillenen bölgeler taşıır.⁹³

5-HT1 reseptörlerinin 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT1D, 5-HT1E ve 5-HT1F olmak üzere 5 alt tipi mevcuttur.⁸⁹

5-HT1A reseptörleri SSS'de yoğun bir şekilde dağılmıştır. Rafe nükleusunda hücre uyarılmasını inhibe ederek etki göstermeleri ile birlikte aynı zamanda postsinaptik reseptörlerin limbik sistemlerde de varlığı gösterilmiştir.⁹⁴

5-HT1B ve 5-HT1D reseptörleri birbirlerine benzer olmakla birlikte tartışmalı bir konudur. Hem fonksiyonel özellikler hem de beyindeki lokalizasyonlarından dolayı 5-HT1B ile 5-HT1D'nin tür homologu olduğı düşünölmektedir.⁹⁵

5-HT1B reseptörleri, 6q13 insan kromozomu üzerinde bulunur ve bazal ganglia, striatum ve frontal korteks gibi SSS'de yer almaktadır. Bu nedenle de terminal otoreseptör görevi üstlendiğı düşünölmektedir. Ayrıca glutamat, g-aminobütirik asid, nöradrenalin gibi nörotransmitterlerin salınımını kontrol eden terminal heteroreseptör olarak davranabilmektedir.⁹⁶

5-HT1D reseptörleri, 1p34.3-p36.3 kromozomu üzerinde lokalizedir. Ekspresyon seviyeleri 5-HT1B reseptörlerine göre daha düşüktür.⁹⁷⁻¹⁰¹ Bu reseptörler özellikle insan kalbinde bulunur.⁹⁶ Ek olarak yapılan bazı immünositokimyasal analizler insandaki trigeminal gangliyonlarda 5-HT1B ve 5-HT1D reseptör immünoreaktivitesini göstermiştir.¹⁰²

5-HT1E reseptörü 6q14-q15 insan kromozomu üzerinde bulunan 365 aminoasitli bir reseptördür. İlk olarak insan frontal korteksi homojenatlarında tanımlanmıştır ve rekombinant hücre sisteminde adenilat siklaza negatif olarak bağlanır.¹⁰³

5-HT1F reseptörü 366 aminoasit içerir ve 3p11 kromozomlarında lokalizedir. Ayrıca rekombinant hücre sisteminde adenilat siklaza negatif olarak bağlanır.¹⁰⁴

5-HT2 reseptörleri 5-HT2A, 5-HT2B ve 5-HT2C şeklinde 3 alttürden oluşur. Bu üç 5-HT reseptör alt türü Gq proteiniyle pozitif olarak kenetlenerek fosfolipaz-C ve fosfolipaz-A₂ ile etkileşmektedir. Bu enzimlerin aktivasyonu ile inozitol fosfat ve hücre içi Ca⁺² konsantrasyonu artar. Bu reseptörlerin stimülasyonu ise hücrede eksitasyona neden olur.¹⁰⁵

5-HT2A reseptörleri, 13q14-q21 insan kromozomu üzerinde bulunur. Sıçan, fare ve insanlarda 471 amino asit ihtiva eder. Bu reseptörler yoğun olarak periferik ve santral dokularda,²⁷ özellikle de korteks, klavstrum ve bazal ganglionlarda yer almaktadır. 5-HT2A reseptör aktivasyonu ayrıca, kortikosteron, oksitosin, renin ve prolaktin gibi hormon salgısını stimüle eder.¹⁰⁶ 5-HT2A reseptörleri yüksek afiniteli durum ve düşük afiniteli durumda bulunabilirler. Normal şartlar altında bu denge düşük afiniteli durum yönündedir.¹⁰⁷

5-HT2B reseptörleri, 2q36.3-2q37.1 insan kromozomu üzerinde bulunur. 5-HT2B reseptör mRNA'sı kalp, böbrek, akciğer ve beyinde lokalizedir.⁹⁶ Özellikle beyincik, lateral septum ve hipotalamus gibi bölgelerde 5-HT2B reseptör benzeri immünoreaktivitenin olduğu bilinmektedir.¹⁰⁸

5-HT2C reseptörleri Xq24 insan kromozomunda lokalizedir.¹⁰⁹ Bu reseptörler frontokortikal dopaminerjik ve adrenerjikler üzerine inhibitör bir etkiye sahiptir. Özellikle nöroendokrin fonksiyonlarda önemli derecede rol alırlar.¹¹⁰⁻¹¹²

5-HT3 reseptörleri fizyolojik özelliklerinden dolayı ligand-bağılı iyon kanalı reseptörleri süperfamilyası içinde sayılmaktadır.¹¹³ Bu reseptörler hem santral hem de periferik nöronlarda bulunur. Bu reseptörün insan homologu 11q23.1-q23.2 kromozomlarında lokalizedir.¹¹⁴

5-HT4 reseptörü 5q31-33 insan kromozomunda lokalizedir.¹¹⁵ SSS'deki reseptörlerin gamma-aminobutirik asit, asetilkolin, serotonin gibi nörotransmitter salınımını modüle ettiği ve sinaptik transmisyonu geliştirdiği bilinmektedir.¹¹⁶

5-HT5 reseptörlerinin 5-HT5A ve 5-HT5B olmak üzere iki alt tipi vardır. 5-HT5A reseptörü 7q36.1 insan kromozomunda bulunurken,^{86, 117-119} 5-HT5B reseptörü ise 2q11-q13 insan kromozomunda bulunur.^{86,119}

5-HT6 reseptörü sıçan cDNA'sından klonlandıktan sonra insan geninde klonlanmıştır. İnsanda 1p35-p36 kromozom bölgesindedir.¹²⁰ Ayrıca sıçan ve insanda hipokampus, amigdala ve striatumda lokalizedir.⁹⁶

2.2.2 5-HT7 Reseptörü

5-HT7 reseptörü sıçan, fare, guinea pig ve insan cDNA'sından klonlanmıştır. 10q23.3-q24.4 insan kromozomunda lokalizedir. 5-HT7 reseptörünün insandaki formu 445 aminoasid bulundurur.

5-HT7 reseptörlerinin talamus, hipotalamus, serebral korteks, amigdala ve dorsal rafe de bulunduğu gösterilmiştir.^{121, 122} Serebellumda özellikle purkinje nöronlarında lokalizedir.¹²³ Limbik sistem ve talamokortikal bölgelerde 5-HT7 bağlanma yerlerinin dağılımı duygusal rahatsızlıkların patofizyolojisinde olası bir rolü olduğu izlenimini uyandırmaktadır. Klozapin, risperidon gibi atipik antidepresanların 5-HT7 reseptörüne karşı yüksek afiniteye sahip olduğunun gözlemlendiği çalışmalar da bu hipotezi desteklemektedir.¹²⁴ Ayrıca kronik antidepresan tedavisinden sonra 5-HT7 reseptör

regölasyonunda azalma meydana gelirken^{125, 126} akut fazdaki stres durumunda 5-HT7 mRNA ekspresyonunun regölle olduğu gözlemlenmiştir.¹²⁷

Periferde ise kan damarlarının özellikle pulmoner, koroner ve aort gibi^{128, 129} düz kas hücrelerinde bulunurken, gastrointestinal sistemde peristaltizm ile ilgili oldukları bulunmuştur.¹³⁰ Yapılan çalışmalar 5-HT7 reseptörünün geniş bir damar dağılımına sahip olduğunu ve anestezi altındaki hayvanlarda önemli derecede kalıcı vazodilatör tepkilerden sorumlu olduğunu doğrulamıştır.¹³¹

Bütün bu özelliklerinin yanısıra 5-HT7 reseptörlerinin Gs-proteinler aracılığı ile siklik adenosin monofosfat oluşumunu pozitif olarak modüle ettiği gösterilmekle birlikte,¹³²⁻¹³⁴ bu yolağın kalmodulin ile uyarılmış adenilat siklaz aracılı aktivite ile olduğu düşünülmektedir.¹³⁵ Ayrıca primer nöronal kültürlerde mitojen aktive protein kinaz ve ERK'yı aktive etme özelliğine sahiptir.¹³⁶

3. MATERYAL VE METOD

3.1 Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar ve Reaktifler

Bu çalışmada SB269970 (CN:1612, Tocris Bioscience, United Kingdom); LP44 (CN:2544, Tocris Bioscience, United Kingdom) ve glutamat (L-glutamic acid monosodium salt hydrate, G5889 Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) kullanıldı. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), hücre kültürü medyumunu , fetal bovin serum, penisilin/streptomisin ve tripsin gibi reaktifler Gibco (Invitrogen Inc., Grand Island, New York, USA)'dan satın alındı.

3.2 Metod

3.2.1. Hücre Kültürü ve Proliferasyon Analizi

Hücre proliferasyonu:

Çalışmamızda SH-SY5Y hücre hattı kullanılmıştır. SH-SY5Y hücreleri American Type Culture Collection (ATCC, USA)'dan satın alındı ve daha önceden laboratuvarımızda mevcut stoklardan çoğaltılarak kullanıldı. SH-SY5Y hücreleri % 88 DMEM, %10 FBS ve % 2 penisilin/streptomisin (100 U penisillin/mL, 100 mg streptomisin/ mL) içeren medyumda % 95 nem, % 5 CO₂ ve 37°C'li inkübatörde kültüre edildi. Tüm maddeler hücre kültürü medyumunda çözüldü. İlgili agonist ve antagonistlerin glutamat toksisitesine karşın hücre proliferasyonlarına olan etkileri label-free bir teknik olan XCelligence system (Roche Diagnostics, Indianapolis, Indiana, USA) ile ölçüldü.

Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA DP) ile Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi

Gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde (RTCA DP) glutamatın SH-SY5Y hücrelerindeki toksik etkisine karşın 5-HT₇ resptör agonist ve antagonisti olan LP44 ve

SB269970'in artan dozlarda koruyucu etkinliği proliferasyon yönünden incelendi.

RTCA DP, elektriksel empedans ölçerek hücre canlılığını tespit eden ve her 15 dakikada bir hücrelerin proliferasyonundaki değışikliği takip edebilen gerçek zamanlı veriler oluşturur. Ölçüm için kullanılan plakların yüzey alanları 96 kuyucuklu plaklara benzemekle birlikte burada kullanılan plaklar 16 kuyucuklu olup tabanında altın kaplı empedans ölçebilen teknoloji ile donatılmıştır ve bu plaklara E-plak denilmektedir. E-plaktan sistem tarafından alınan değerler, literatürde kabul edilen birimsiz “cell index (CI, hücre indeksi)” değeri olarak hesaplanır. Bu değeri, hücreler E-plağın tabanını kaplayıp çoğaldıkça verilen elektriksel yanıtla paralel olarak artar.

Çalışmamızda ilk olarak her kuyucukta 5.000 hücre olacak şekilde hücreler ekildi. Glutamat uygulamasından 60 dakika önce 10^{-10} M ile 10^{-5} M aralığında artan konsantrasyonlarda hücrelere LP44 ve SB269970 uygulandı. Bu uygulamadan 60 dakika sonra kuyucuklara hücre canlılığını değerlendirmek için glutamatın optimum toksisite konsantrasyonu olan 80 mM glutamat eklendi¹³⁷ ve hücre proliferasyonları 72. saate kadar izlenip sonuçlar normalize hücre indeksi olarak sunuldu. Protein ekstraksiyonu ve mRNA ekspresyon seviyelerinin ölçümü için hücreler, 6 kuyucuklu plaklarda çoğaltıldı.

3.2.2. Moleküler İncelemeler

3.2.2.1 Real-time PCR

Total RNA ekstraksiyonu ve cDNA sentezi

Total RNA, QIAcube (Qiagen)'de üreticinin tanımlarına göre RNeasy Mini Qiagen Kit ile elde edildi. RNA örnekleri yüksek kapasiteli cDNA Ters-Transkripsiyon (RT) kit (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) ile komplementer DNA (cDNA) ters transkripte edildi. Daha sonra total 10 mL RNA; 2 mL 10X RT buffer, 0,8 mL 25X deoksinükleotid mix, 2 mL 10X RT randomize primer, 1 mL MultiScribe ters

transkriptaz ve 4,2 mL dietilpirokarbonatlı su ile işleme tabi tutuldu. RT 120 dakika boyunca 37°C’de, 10 dakika boyunca 25°C’de tutulduktan sonra Veriti 96 kuyucuklu termal döngü (Applied Biosystems) kullanılarak 5 dakika boyunca 85°C’de tutuldu. cDNA konsantrasyon ve özellikleri Epoch Spektrofotometre Sistemi ve Take3 Plate (Biotek, Winooski, Vermont, USA) kullanılarak sayıldı ve değerlendirildi.

Gen ekspresyonunun relatif ölçümü

Relatif kaspaz 3 ve kaspaz 9 mRNA ekspresyon analizi SH-SY5Y RNA’sından sentezlenen cDNA kullanılarak StepOne Plus Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) sistem (Applied Biosystems) ile yapıldı.

Sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırıldı ve relatif kat olarak açıklandı. Her bir hücre grubundaki β -actin ekspresyon dataları endojen kontrol olarak kullanıldı. Her hücre grubu için her biri 20 ml reaksiyonda 9 mL cDNA (100 ng), 1 mL Primer Perfect Probe mix ve 10 mL QuantiTect Probe PCR master mix (Qiagen) kullanılarak 96 kuyucuklu optik plakta her iki hedef için uygulandı. Plaklar 50°C’de 2 dakika, 95°C’de 10 dakika ısıtıldı ve daha sonra 94°C’de 15 saniye, 60°C’de 60 saniye 40 siklus boyunca ısıtıldı. Tüm veriler $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu kullanılarak hücre gruplarının karşılaştırılan ekspresyonlarında kat değişimler olarak ifade edildi.¹³⁸

3.2.3. Biyokimyasal İncelemeler

3.2.3.1 SOD, GSH ve MDA Analiz Prosedürü

Her hücre lizatından alınan süperoksitdismütaz (SOD) aktivitesi, glutatyon (GSH) ve malondialdehit (MDA) seviyeleri modifiye metodlara göre enzime bağlı immunosorbent test okuyucu ile oda sıcaklığında iki defa ölçüldü. Her örnek ve standartın ortalama absorbanları hesaplandı, standart bir eğri ile çizildi ve standartların absorbanları için bir denklem elde edildi. Lineer SOD, GSH ve MDA

konsantrasyonları bu denkleme göre hesaplandı ve tüm veriler ortalama±standart sapma miligram protein başına olarak sunuldu.

3.2.3.2. TNF- α Analiz Prosedürü

Her hücre süpernatant ve standartından alınan TNF- α seviyeleri enzime bağlı immunosorbent test okuyucu ile yüksek spesifik insan TNF- α ELISA (Invitrogen) kit kullanılarak iki defa ölçüldü.

3.2.3.3 Protein Tayini

Protein konsantrasyonları ticari protein standartları (Sigma Aldrich, Total protein kit-TP0300-1KT) kullanılarak Lowry metodu ile belirlendi.

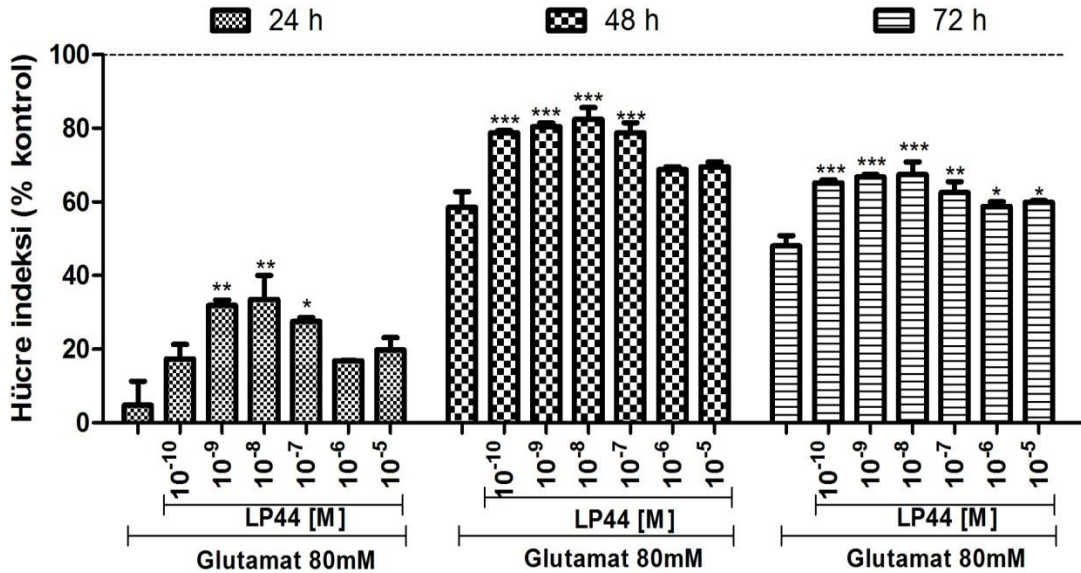
3.3. İstatistiksel Analiz

Tüm verilerin istatistiksel analizi IBM SPSS 20.0 software programı (SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA) kullanılarak One-Way ANOVA testine göre yapıldı. Gruplar arasındaki farklılıklar Tukey'in çoklu karşılaştırma testi kullanılarak belirlendi. Tüm sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verildi ve 95% güven aralığında 0.05'in altındaki p değerleri, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

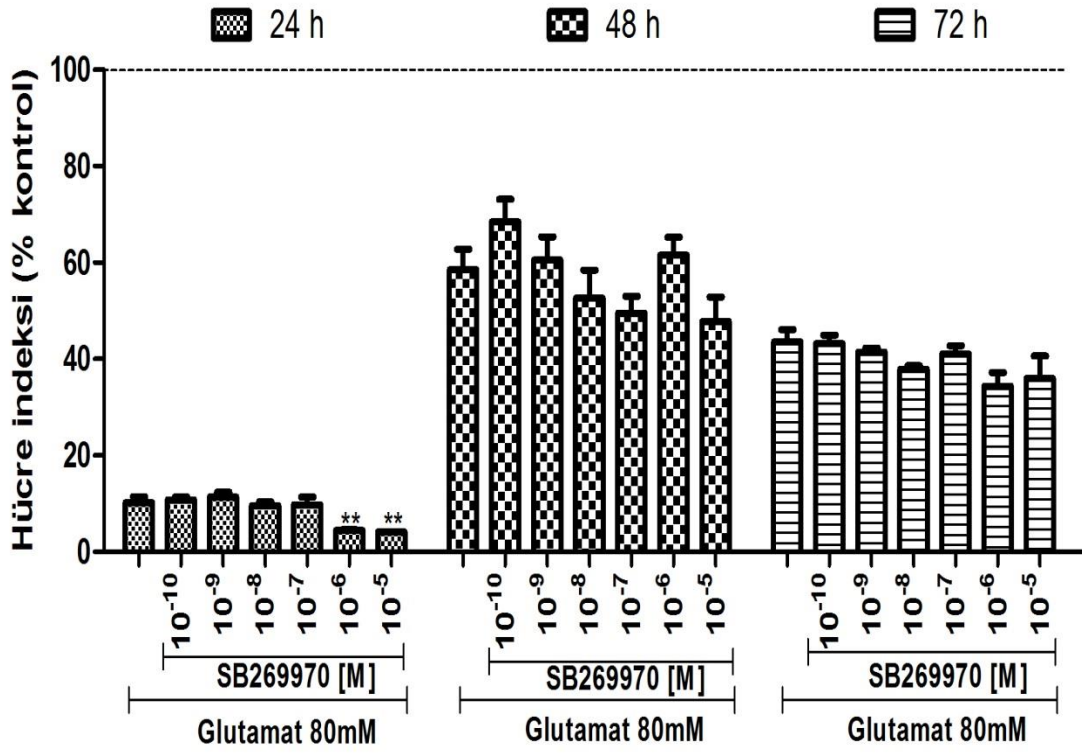
4.BULGULAR

4.1 Hücre Proliferasyon Bulguları

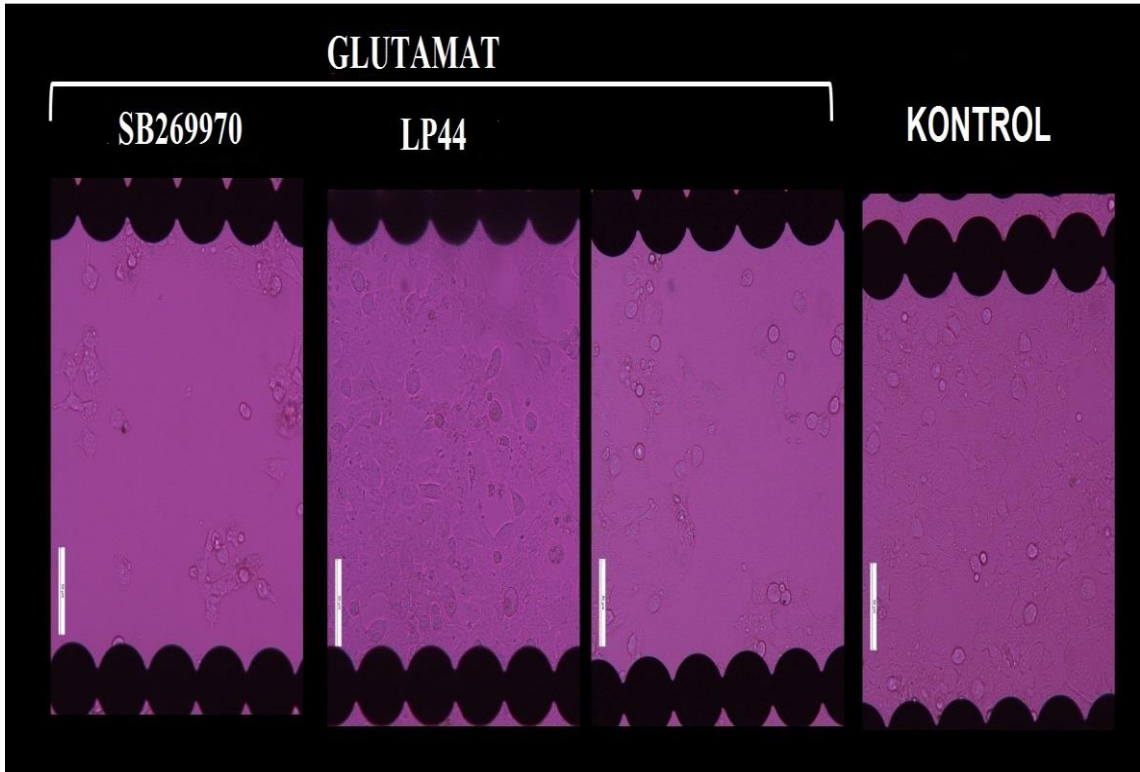
SH-SY5Y hücre hattında glutamat ile indüklenen nörotoksositeye karşı 5-HT7 agonist ve antagonistinin etkilerini değerlendirdik. (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2). Hücre canlılığını değerlendirmek için glutamatın optimum toksisite konsantrasyonu olan 80 mM glutamat eklenmesi hücrelerde 24, 48 ve 72 saat için hücre canlılık oranlarını kontrol grubuna göre önemli derecede azalttı. Buna karşılık glutamat toksisitesinin 24, 48 ve 72 saat sonra neden olduğu hücre canlılığındaki düşüşü 5-HT agonisti LP44'ün özellikle 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} mM dozları başta olmak üzere tüm konsantrasyonlarında doza bağımlı olarak yükselttiği belirlendi. Ayrıca 5-HT agonisti LP44'ün hücre canlılığını artırıcı etkinliği hücre proliferasyonu çalışmasının 72. saatinde hücrelerden mikroskopik görüntü alınarak Şekil 4.3'te sunulmuştur. Fakat glutamat grubu ile karşılaştırıldığında 5-HT antagonisti SB269970 uygulaması hücre canlılığında anlamlı ya da önemli bir farklılık göstermemiştir.



Şekil 4.1. LP44 uygulanan hücrelerin canlılığı. Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak sunuldu. *p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.



Şekil 4.2. SB269970 uygulanan hücrelerin canlılığı. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunuldu. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

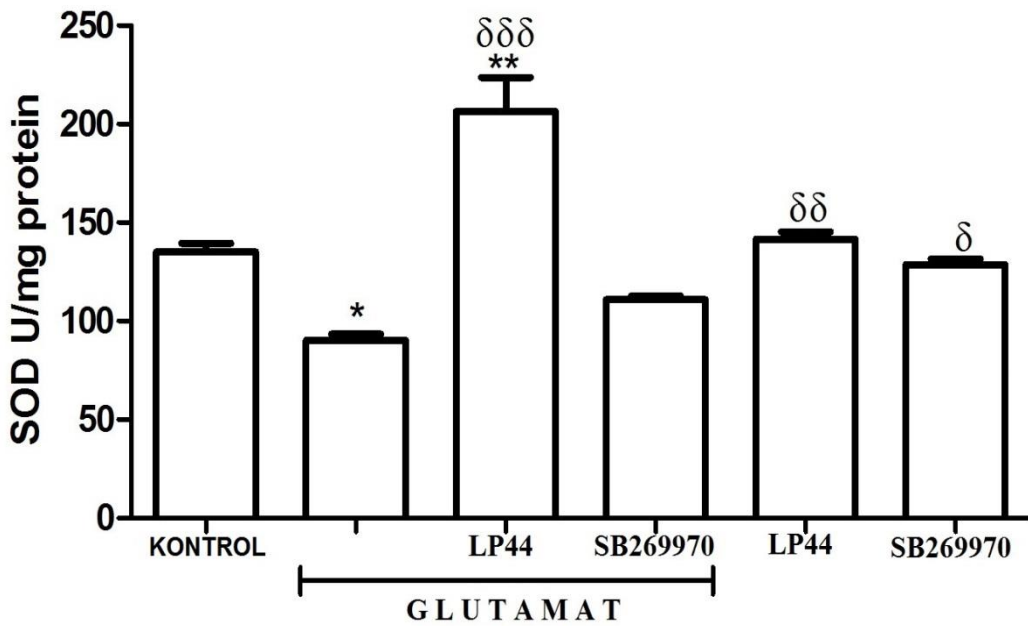


Şekil 4.3. Kontrol grubu ve glutamat uygulanan grupların mikroskopik proliferasyon görüntüleri

4.2. Biyokimyasal Bulgular

Oksidatif stres parametreleri: SOD aktivitesi, GSH ve MDA seviyeleri değerlendirildi.

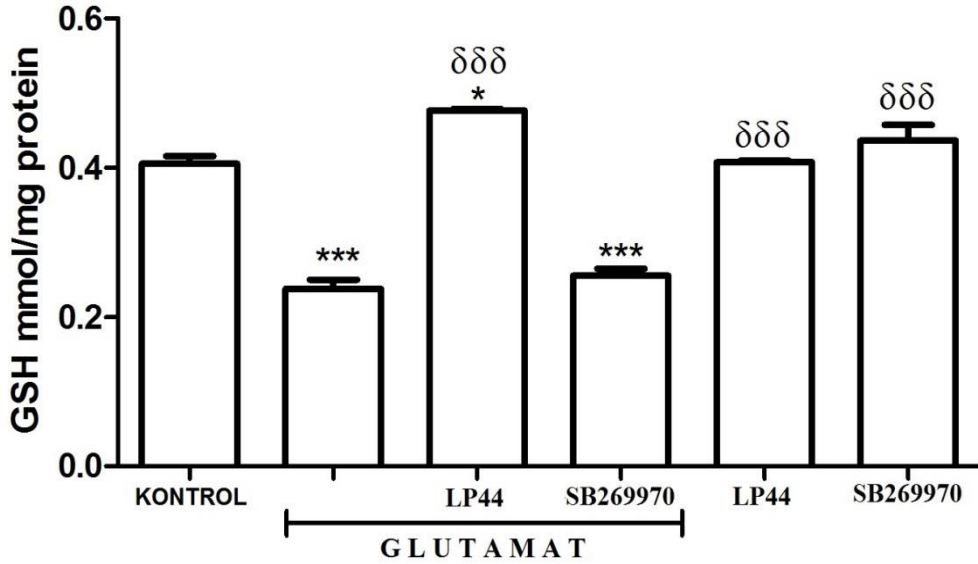
Hücre kültürü medyumunda yapılan çalışmalara göre SOD aktivasyonu glutamat grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldı. Ayrıca glutamat grubu ile karşılaştırıldığında 5-HT agonisti LP44 uygulaması azalan SOD aktivasyonunu istatistiksel olarak anlamlı derecede artırırken 5-HT antagonisti SB269970 uygulaması SOD aktivasyonu üzerine anlamlı bir fark meydana getirmedi. (Şekil 4.4, $p<0,05$)



Şekil 4.4. SH-SY5Y hücrelerinde glutamat ile indüklenen nörotoksisite gruplarındaki ve kontrol grubundaki SOD aktivitesi üzerine 5-HT7 agonist ve antagonisinin etkisi. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak sunuldu. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, $^{\delta}$ $p<0,05$, $^{\delta\delta}$ $p<0,01$, $^{\delta\delta\delta}$ $p<0,001$. (*: kontrol grubuna göre, $^{\delta}$: glutamat uygulanan gruba göre karşılaştırma)

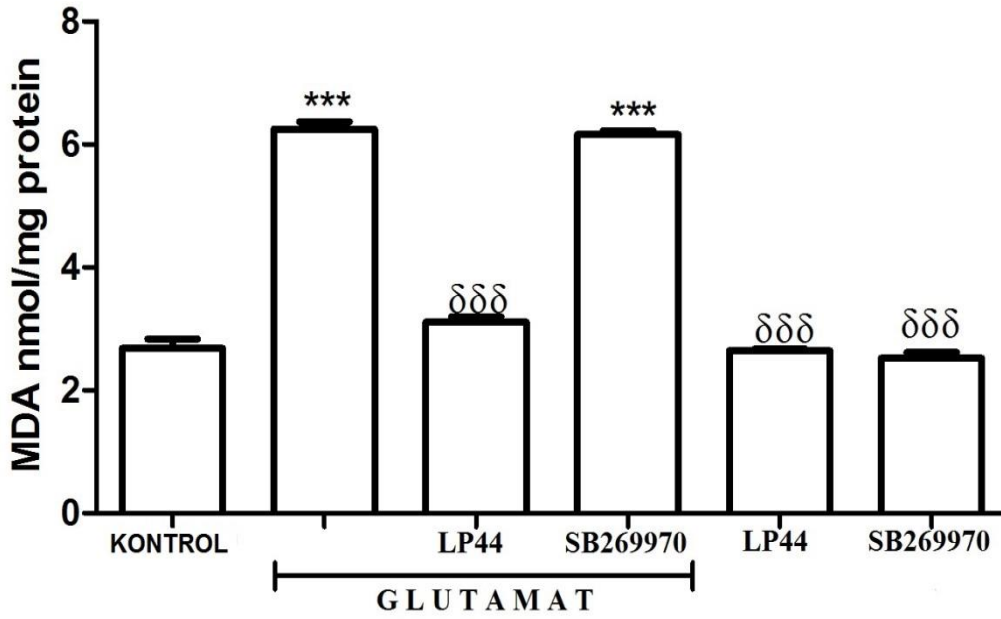
Şekil 4.5'te sunulduğu gibi hücre kültürü medyumunda yapılan çalışmalara göre kontrol grubu ile karşılaştırıldığında glutamat uygulanan grupta GSH seviyesi önemli derecede azaldı. Glutamat uygulanan grup ile karşılaştırıldığında LP44 uygulaması azalan GSH seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı derecede artırdı. Ancak SB269970

uygulanan grup ile glutamat uygulanan grubun sonuçları benzer ölçülerdeydi. Glutamat ile oluşan oksidatif stres düzeltilememişti. ($p<0,05$)



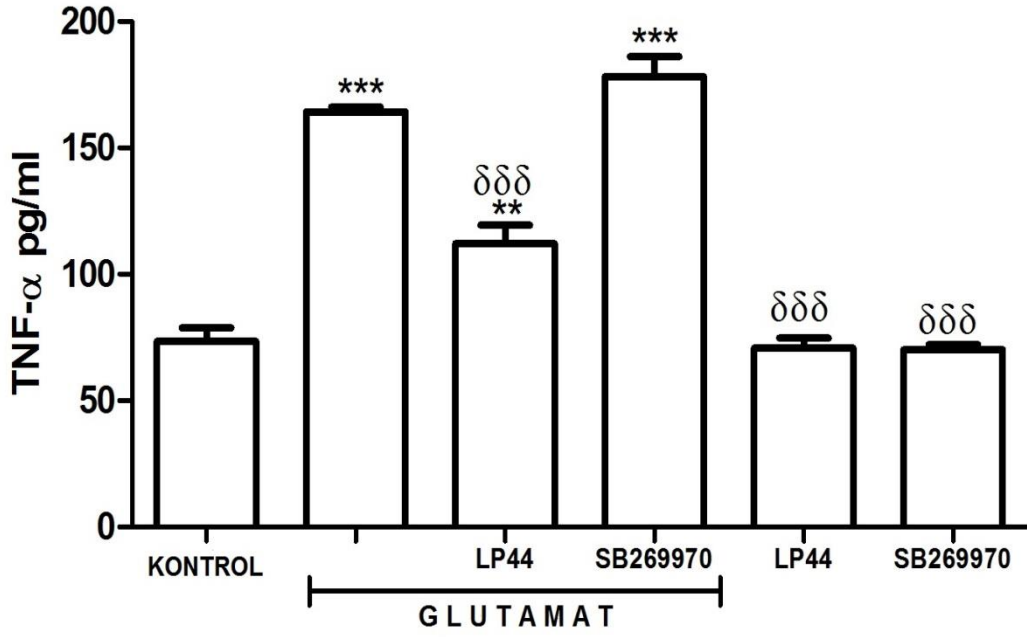
Şekil 4.5. SH-SY5Y hücrelerinde glutamat ile indüklenen nörotoksisite gruplarındaki ve kontrol grubundaki GSH seviyesi üzerine 5-HT7 agonist ve antagonistinin etkisi. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunuldu. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, δ $p<0,05$, $\delta\delta$ $p<0,01$, $\delta\delta\delta$ $p<0,001$. (*: kontrol grubuna göre, δ : glutamat grubuna göre karşılaştırma)

Yine hücre kültürü medyumunda yapılan çalışmalara göre kontrol grubu ile karşılaştırıldığında glutamat uygulanan grupta SB269970 uygulanan grupta MDA seviyelerinin anlamlı derecede arttığı belirlendi. Ayrıca glutamat uygulanan grup ile karşılaştırıldığında; SB269970 uygulaması benzer sonuçları verirken, LP44 uygulaması artan MDA seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttı. (Şekil 4.6, $p<0,05$)



Şekil 4.6. SH-SY5Y hücrelerinde glutamat ile indüklenen nörotoksisite gruplarındaki ve kontrol grubundaki MDA seviyesi üzerine 5-HT7 agonist ve antagonistinin etkisi. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunuldu. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, δ $p < 0,05$, $\delta\delta$ $p < 0,01$, $\delta\delta\delta$ $p < 0,001$. (*: kontrol grubuna göre, δ : glutamat grubuna göre karşılaştırma)

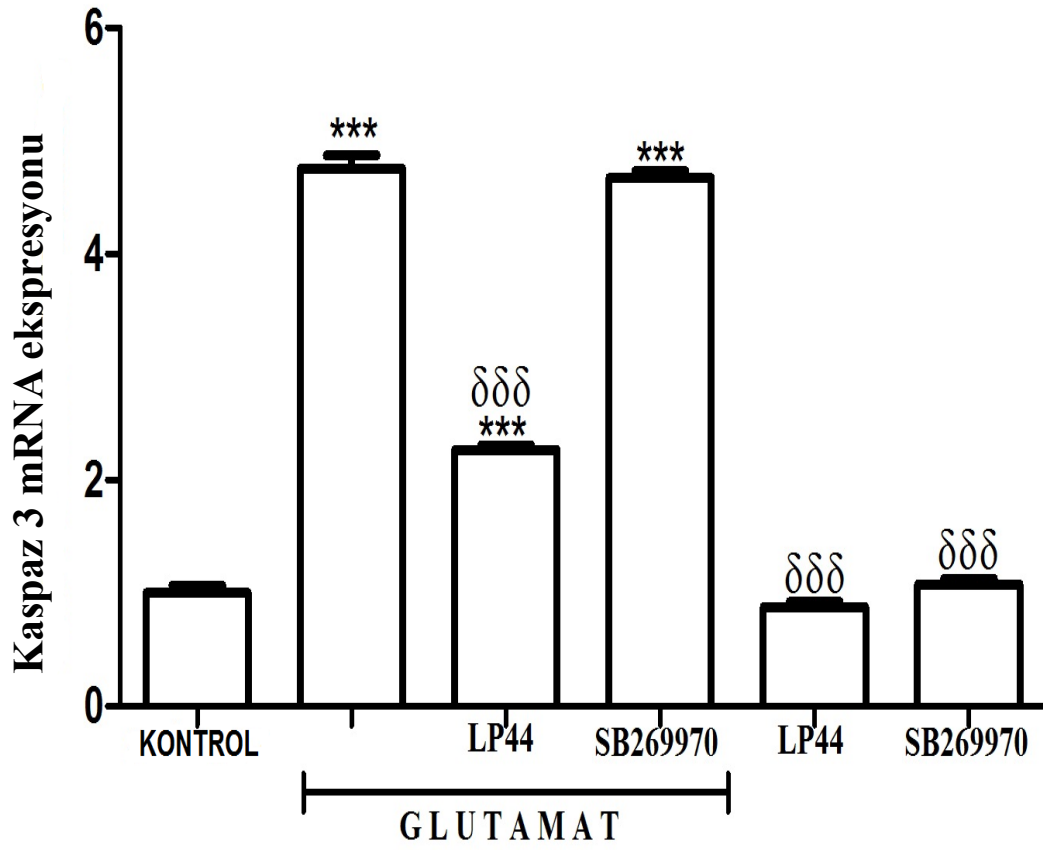
İnflamatuvar parametreler: Tüm gruplardaki SH-SY5Y hücrelerinin TNF- α seviyeleri analiz edildi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında glutamat uygulanan gruptaki hücrelerin TNF- α seviyelerinde istatistiksel olarak önemli bir artış vardı. Ayrıca glutamat uygulanan grup ile karşılaştırıldığında; 5-HT7 antagonisti SB269770 uygulanan grup hücrelerinin TNF- α seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmezken 5-HT7 agonisti LP44 uygulaması artan TNF- α seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı derecede düşürdü. (Şekil 4.7, $p < 0,05$)



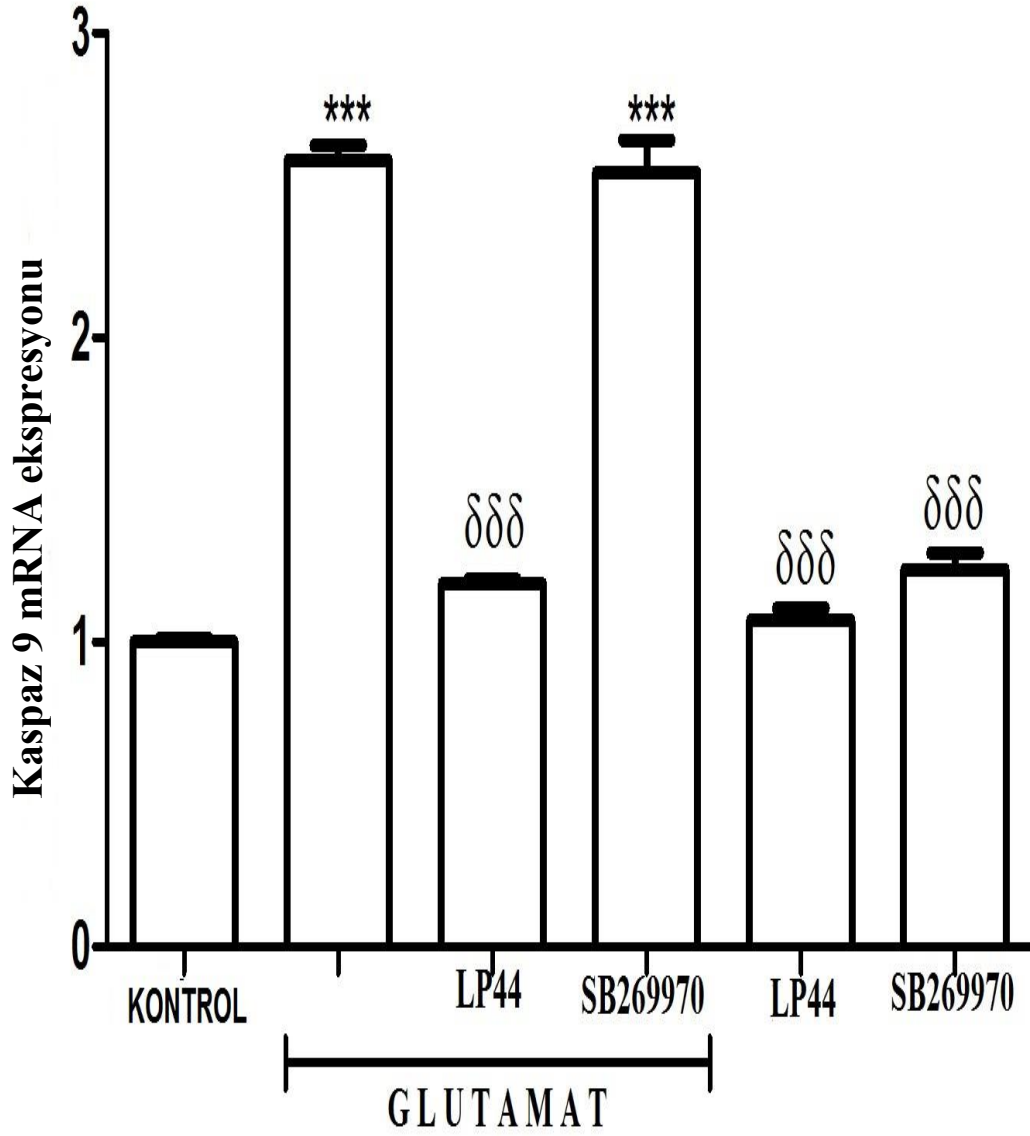
Şekil 4.7. SH-SY5Y hücrelerinde glutamat ile indüklenen nörotoksisite gruplarındaki ve kontrol grubundaki TNF- α seviyesi üzerine 5-HT7 agonist ve antagonistinin etkisi. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunuldu. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, δ $p < 0,05$, $\delta\delta$ $p < 0,01$, $\delta\delta\delta$ $p < 0,001$. (*: kontrol grubuna göre, δ : glutamat grubuna göre karşılaştırma)

4.3. Moleküler Bulgular

Apoptotik parametreler: Tüm gruplardaki SH-SY5Y hücrelerinin kaspaz 3 ve kaspaz 9 gen ekspresyon seviyeleri Real-time PCR ile analiz edildi. Kaspaz 3 ve kaspaz 9 mRNA ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna göre glutamat uygulanan grupta önemli derecede daha yüksekti. Ayrıca glutamat grubu ile karşılaştırıldığında; 5-HT7 agonisti LP44 uygulaması artan kaspaz 3 ve kaspaz 9 mRNA ekspresyon seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı derecede azaltırken 5-HT7 antagonisti SB269970 uygulaması önemli bir fark meydana getirmedi. (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9, $p < 0,05$)



Şekil 4.8 SH-SY5Y hücrelerinde glutamat ile indüklenen nörotoksisite gruplarındaki ve kontrol grubundaki kaspaz 3 mRNA ekspresyonu üzerine 5-HT7 agonist ve antagonistinin etkisi. Sonuçlar ortalama±standart sapma *p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, δ p<0,05, δδ p<0,01, δδδ p<0,001. (*: kontrol grubuna göre, δ : glutamat grubuna göre karşılaştırma)



Şekil 4.9 SH-SY5Y hücrelerinde glutamat ile indüklenen nörotoksisite gruplarındaki ve kontrol grubundaki kaspaz 9 mRNA ekspresyonu üzerine 5-HT7 agonist ve antagonistinin etkisi. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunuldu. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, δ $p < 0,05$, $\delta\delta$ $p < 0,01$, $\delta\delta\delta$ $p < 0,001$. (*: kontrol grubuna göre, δ : glutamat grubuna göre karşılaştırma)

5.TARTIŞMA

Çalışmamızda SH-SY5Y hücre hattında glutamat ile indüklenen nörotoksisiteye karşı 5-HT7 reseptörlerinin rollerini ve agonist/antagonist uygulamasının muhtemel etkilerini inceledik.

Çalışmamızın sonuçlarına baktığımızda ise glutamat ile indüklenen nörotoksisite’de 5-HT7 reseptörlerinin ekspresyonlarında anlamlı değişiklikler olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızın ikinci aşamasında ise aynı modelde uyguladığımız 5-HT7 reseptör agonisti LP44, glutamat toksisitesine karşı güçlü nöroprotektif etki göstermiştir. Bu nöroprotektif etkileri; a) antioksidant aktivasyon ve oksidatif stres inhibisyonu, b) 5-HT7 reseptörlerinin nöroprotektifliği ve TNF- α aktivasyonunun glutamat indüksiyonunu engellemesi, c) kaspaz 3 ve kaspaz 9 inhibisyonu ile ilişkili olabileceği moleküler çalışmalar ile gösterilmiştir.

Çalışmamızda ilk olarak in vitro hücre proliferasyon analizleri ile hücre canlılığını gösterdik. Sonuçlarımıza göre; 5-HT7 agonisti LP44 neredeyse uygulanan tüm dozlarda glutamata karşı hücre canlılığını korumuştur. Fakat 5-HT7 antagonisti SB269970 uygulaması ise glutamat nörotoksisitesine karşı koruyucu bir etki meydana getirmemiştir.

5-HT7 reseptörlerinin nöroprotektif etkisini hücre canlılık testinde ispatladıktan sonra muhtemel etki mekanizmalarını; GSH, SOD, MDA, TNF- α , kaspaz 3 ve kaspaz 9 gibi alt proteinlerinin yanı sıra oksidatif stres, enflamasyon ve apoptoz üzerinden incelemeye odaklandık.

Önceki çalışmalarımızda 5-HT7 reseptörlerinin pençe ödemi olan sıçanlarda gelişen akut enflamasyon ve sepsis gibi sistemik enflamatuar olaylarda çok önemli rollerinin olduğunu göstermiştik.^{9, 10} Bu çalışmamızda 5-HT7 reseptörlerinin agonist ile stimülasyonunun bir sonucu olarak enflamatuar sitokinlerde ve oksidan parametrelerde

düzelme gözlenmiştir. Ayrıca deneysel çalışmalarda 5-HT7 reseptörlerinin bazı enflamatuar sitokinlerin ekspresyonunu modüle ettiği gösterilmiştir.⁸ Bu çalışmalar da serotoninin 5-HT7 reseptörleri aracılığı ile antioksidant ve antienflamatuar etkilerinin varlığını desteklemektedir.

Glutamat ile indüklenen nörotoksisite oksidatif stres kaynaklı nörotoksisitenin önemli bir mekanizmasıdır.¹³⁹⁻¹⁴¹ Hücre dışı glutamat seviyesinin fazlalığı antiport sistemin inhibe edilmesi ile sistin geri alınımını engeller. GSH prekürsörü olan sistin alınımının inhibisyonu intrasellüler GSH seviyelerinde önemli derecede azalışa sebep olur ve buna bağlı olarak hücrelerde oksidatif stres indüklenir.^{142, 143} Hücre sel savunmada oksidatif strese karşı antioksidan enzimler yararlı olduğu için antioksidan kullanımı, oksidatif hasar durumunda etkili bir tedavi yöntemi sunabilir.¹⁴⁴ SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz (GSH-px) ve glutatyon redüktaz (GR) oksidatif stresin önemli göstergeleridir. Çalışmamıza geri dönersek glutamat uygulanan grup ile karşılaştırıldığında, 5-HT7 agonisti LP44 uygulaması glutamat ile indüklenen MDA seviyesini azaltırken, SOD aktivitesini ve GSH düzeyini önemli ölçüde artırmıştır. Ancak 5-HT7 antagonisti SB269970 uygulaması ile bu olumlu etki gösterilememiştir. Bu sonuçlar bize 5-HT7 agonisti LP44 uygulamasının glutamat uygulanması sonucu oluşan nörotoksisite ve artmış oksidatif stresi azalttığını göstermektedir.

Oksidatif stres ve sitokinler, özellikle de TNF- α arasında güçlü bir ilişki vardır.¹⁴⁵ Artan TNF- α seviyesi oksidatif strese yol açar. Önceki çalışmalar TNF- α ile oksidatif stresin azalması arasında iyileşme sürecinde birbirlerine paralel bir ilişkinin varlığını göstermiştir.¹⁴⁶ Bu nedenle, 5-HT7 reseptörü ve TNF- α aracılığı ile oksidatif stresin azalması arasındaki ilişkiyi inceledik. Proenflamatuar sitokinler nöroenflamasyonun hem kilit medyatörleri hem de anahtar araçlardır^{147, 148} ve nöronal hasara yanıt vermede önemli bir role sahiptirler.¹⁴⁹ Güçlü kanıtlar glutamat tarafından

uyarılan proenflamatuar sitokinlerin nöronal hastalıkların ilerlemesi ve patofizyolojisi ile ilgili olduğunu göstermektedir.¹⁵⁰ SH-SY5Y hücrelerine glutamat uygulanmasından sonra TNF- α ekspresyonunun önemli derecede arttığını ve 5-HT7 agonisti LP44 uygulamasının bu nöroenflamatuar olayları önlediğini gözlemledik. Bu bağlamda, 5-HT7 reseptörleri antioksidan ve antienflamatuar özellikler sergilemektedirler. Ayrıca glutamat ile indüklenen nörotoksositeye karşı koruyucu bir etkiye sahip olduklarını da söyleyebiliriz.

Son olarak, glutamat toksisitesi sonucu nöronal hücre ölümüne neden olan apoptotik proteinlerin ekspresyon seviyesini değerlendirdik. Yapılan bir çalışmada 5-HT7 ile indüklenen ERK fosforilasyonu ve nükleer faktör kappa- β aktivasyonunun 5-HT7 reseptörünün stimülasyonu aracılığı ile meydana geldiği gösterilmiştir.¹¹ Bu sinyal yolağının aktivasyonu 5-HT'nin antiapoptotik etkisi ile ilişkili olabilir.

Ayrıca Zhang ve ark. 5-HT7 agonistlerinin kaspaz 3 inhibisyonu ile hipokampal nöronlarda sevofluran ile indüklenen amneziye karşı antiapoptotik bir etkiye sahip olduklarını göstermişlerdir.¹²

Glutamat uygulaması apoptoz ile nöronal hücre ölümüne sebep olan kaspaz protein kaskadlarını aktive eder. Kaspazlar apoptotik yolları düzenleyen temel proteinlerdir. Bu apoptotik yollar ise başlatıcı ve efektör kaspazların (kaspaz 3 ve kaspaz 9) aktivasyonuna sebep olan sitokrom c salınımını ve mitokondriyal geçirgenliği tetikleyebilmektedir.¹⁵¹ Ayrıca ROT, kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivasyonu ile apoptoza öncülük edebilir. Kaspaz 9, apoptozu başlatır ve pro-kaspaz 3'ü bölerek aktif kaspaz-3'ü meydana getirir. Kaspaz 3, hücre ölümüne sebep olan apoptozun sonraki aşamasında apoptotik sonlandırıcı olarak rol alır.

Bütün bu bilgiler ışığında sonuçlarımız; kontrol grup ile karşılaştırıldığında glutamat uygulanan grubun kaspaz 3 ve kaspaz 9'un ekspresyonunu artırdığını gösterdi.

Ayrıca glutamat uygulanan grup ile karşılaştırıldığında 5-HT7 agonisti LP44 uygulamasının kaspaz 3 ve kaspaz 9 ekspresyonunu anlamlı derecede azalttığı ve normale yaklaştırdığı görülmüştür. Yalnız yine glutamat uygulanan grup ile karşılaştırıldığında antagonist SB269970 uygulanan grupta kaspaz 3 ve kaspaz 9'un ekspresyonu değişmemiştir. Bu sonucalar da bize glutamat ile indüklenen hücre ölümünün 5-HT7 agonisti ile geri döndürüldüğünü gösterirken sitoprotektif etki oluşmuştur. Artan oksidatif yük kaspaz sistemini aktif hale getirirken 5-HT7 agonisti LP44 uygulaması ile hücre hasarı azalmış, oksidan/antioksidan denge düzelmiş, bu düzelme ise doğrudan kaspaz sistemini inhibe ederek nöron hücrelerini korumuş olabilir.

Aynı zamanda yukarıda belirtildiği gibi, artan TNF- α seviyeleri ile kaspaz 3 ve kaspaz 9 arasında güçlü bir bağlantı vardır. Kaspaz proteinlerinin seviyesinin azalması TNF- α 'nın inhibitör etkilerine ve buna bağlı olarak da oksidatif stresin iyileşmesine sebep olur.

Bu bulgularımızı bir araya getirdiğimizde 5-HT7 reseptörlerinin glutamat ile indüklenen nörotoksisite üzerine önemli bir role sahip olabileceğini akla getirmektedir. Selektif agonistler aracılığı ile 5-HT7 reseptörlerinin aktivasyonu oksidatif stresi engellemiş, proenflamatuar sitokinleri inhibe etmiş ve kaspaz 3 ve kaspaz 9 gen ekspresyonunun düzenliliğini azaltarak antiapoptotik etki meydana getirmiştir.

Glutamat toksisitesi üzerinden baktığımızda ise 5-HT7 reseptörlerinin nörodejeneratif hastalıkları engellemek için faydalı olabileceğini yalnız bu çalışmaların daha detaylı deneysel ve klinik çalışmalar ile desteklenmesi gerektiğini söyleyebiliriz.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız, 5-HT7 reseptörlerinin SH-SY5Y hücrelerindeki nörotoksisite hasarını önlemede bir savunma mekanizması gibi çalıştığını ve toksisite durumunda aktive olduğunu ortaya koymaktadır. Hem biyokimyasal hem de moleküler bulgular da bu durumu desteklemektedir.

Bu çalışma sonucunda 5-HT7 reseptörleri, glutamat ve/veya diğer maddeler ile indüklenen nörotoksisitenin hem mekanistik çalışmaları, hem de tedavi süreci için yeni hedefler olarak ortaya konulacaktır. Böylece sadece bizim çalıştığımız agonist değil yeni geliştirilecek birçok 5-HT7 reseptör agonisti madde potansiyel nöroprotektif ilaç ham maddesi olarak araştırılabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Chen J, Chua K-W, Chua CC, Yu H, Pei A, Chua BH, Hamdy RC, Xu X, Liu C-F. Antioxidant activity of 7, 8-dihydroxyflavone provides neuroprotection against glutamate-induced toxicity. *Neuroscience letters*, 2011, 499: 181-185.
2. Qian Y, Guan T, Tang X, Huang L, Huang M, Li Y, Sun H, Yu R, Zhang F. Astrocytic glutamate transporter-dependent neuroprotection against glutamate toxicity: an in vitro study of maslinic acid. *European journal of pharmacology*, 2011, 651: 59-65.
3. Vanzulli I, Butt AM. mGluR5 protect astrocytes from ischemic damage in postnatal CNS white matter. *Cell Calcium*, 2015, 58: 423-430.
4. Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron*, 1995, 15: 961-973.
5. Butterfield DA. Amyloid beta-peptide [1-42]-associated free radical-induced oxidative stress and neurodegeneration in Alzheimer's disease brain: mechanisms and consequences. *Curr Med Chem*, 2003, 10: 2651-2659.
6. Liu Y, Wong TP, Aarts M, Rooyakkers A, Liu L, Lai TW, Wu DC, Lu J, Tymianski M, Craig AM, Wang YT. NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *J Neurosci*, 2007, 27: 2846-2857.
7. Mossner R, Lesch KP. Role of serotonin in the immune system and in neuroimmune interactions. *Brain Behav Immun*, 1998, 12: 249-271.
8. Muller T, Durk T, Blumenthal B, Grimm M, Cicko S, Panther E, Sorichter S, Herouy Y, Di Virgilio F, Ferrari D, Norgauer J, Idzko M. 5-hydroxytryptamine

modulates migration, cytokine and chemokine release and T-cell priming capacity of dendritic cells in vitro and in vivo. *PLoS One*, 2009, 4: e6453.

9. Cadirci E, Halici Z, Bayir Y, Albayrak A, Karakus E, Polat B, Unal D, Atamanalp SS, Aksak S, Gundogdu C. Peripheral 5-HT₇ receptors as a new target for prevention of lung injury and mortality in septic rats. *Immunobiology*, 2013, 218: 1271-1283.
10. Albayrak A, Halici Z, Cadirci E, Polat B, Karakus E, Bayir Y, Unal D, Atasoy M, Dogrul A. Inflammation and peripheral 5-HT₇ receptors: the role of 5-HT₇ receptors in carrageenan induced inflammation in rats. *Eur J Pharmacol*, 2013, 715: 270-279.
11. Soga F, Katoh N, Inoue T, Kishimoto S. Serotonin activates human monocytes and prevents apoptosis. *J Invest Dermatol*, 2007, 127: 1947-1955.
12. Zhang F, Feng X, Zeng Q, Wang B, Wilhelmsen K, Li Q, Cao X, Yu B. Sevoflurane induced amnesia inhibits hippocampal Arc expression partially through 5-hydroxytryptamine-7 receptors in the bilateral basolateral amygdala in rats. *Neurosci Lett*, 2014, 562: 13-18.
13. Bannerman D, Good M, Butcher S, Ramsay M, Morris R. Distinct components of spatial learning revealed by prior training and NMDA receptor blockade. *Nature*, 1995, 378: 182-186.
14. Collingridge G, Bliss T. Memories of NMDA receptors and LTP. *Trends in neurosciences*, 1995, 18: 54-56.
15. Schipke CG, Ohlemeyer C, Matyash M, Nolte C, Kettenmann H, Kirchhoff F. Astrocytes of the mouse neocortex express functional N-methyl-D-aspartate receptors. *The FASEB Journal*, 2001, 15: 1270-1272.

16. Petrie R, Reid I, Stewart C. The N-methyl-D-aspartate receptor, synaptic plasticity, and depressive disorder: a critical review. *Pharmacology Therapy*, 87: 11.
17. Shiffer H. Glutamate receptor genes: susceptibility factors in schizophrenia and depressive patients. *Mol Biol*, 2002, 25: 191-212.
18. Zarate C, Quiroz J, Payne J, Manji H. Modulators of the glutamatergic system: implications for the development of improved therapeutics in mood disorders. *Psychopharmacology bulletin*, 2001, 36: 35-83.
19. Zarate Ca, Du J, Quiroz J, Gray Na, Denicoff Kd, Singh J, Charney Ds, Manji Hk. Regulation of cellular plasticity cascades in the pathophysiology and treatment of mood disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2003, 1003: 273-291.
20. Daikhin Y, Yudkoff M. Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. *The Journal of nutrition*, 2000, 130: 1026S-1031S.
21. Kew JN, Kemp JA. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl)*, 2005, 179: 4-29.
22. Mori H, Mishina M. Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology*, 1995, 34: 1219-1237.
23. Meldrum B, Garthwaite J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends in pharmacological sciences*, 1990, 11: 379-387.
24. Anantharam V, Panchal RG, Wilson A, Kolchine VV, Treistman SN, Bayley H. Combinatorial RNA splicing alters the surface charge on the NMDA receptor. *FEBS Lett*, 1992, 305: 27-30.
25. Wong EH, Kemp JA. Sites for antagonism on the N-methyl-D-aspartate receptor channel complex. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 1991, 31: 401-425.
26. Lovinger DM, White G, Weight FF. Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Science*, 1989, 243: 1721-1724.

27. Bradley P, Engel G, Feniuk W, Fozard J, Humphrey P, Middlemiss D, Mylecharane E, Richardson B, Saxena P. Proposals for the classification and nomenclature of functional receptors for 5-hydroxytryptamine. *Neuropharmacology*, 1986, 25: 563-576.
28. Hansson E, Muyderman H, Leonova J, Allansson L, Sinclair J, Blomstrand F, Thorlin T, Nilsson M, Rönnbäck L. Astroglia and glutamate in physiology and pathology: aspects on glutamate transport, glutamate-induced cell swelling and gap-junction communication. *Neurochemistry international*, 2000, 37: 317-329.
29. Young AB, Fagg GE. Excitatory amino acid receptors in the brain: membrane binding and receptor autoradiographic approaches. *Trends in pharmacological sciences*, 1990, 11: 126-133.
30. Choi DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*, 1988, 1: 623-634.
31. Furukawa T, Hoshino S, Kobayashi S, Asakura T, Takahashi M, Atsumi T, Teramoto A. The glutamate AMPA receptor antagonist, YM872, attenuates cortical tissue loss, regional cerebral edema, and neurological motor deficits after experimental brain injury in rats. *Journal of neurotrauma*, 2003, 20: 269-278.
32. Albers GW, Goldberg MP, Choi DW. N-methyl-D-aspartate antagonists: Ready for clinical trial in brain ischemia? *Annals of neurology*, 1989, 25: 398-403.
33. Klein RC, Castellino FJ. Activators and inhibitors of the ion channel of the NMDA receptor. *Current drug targets*, 2001, 2: 323-329.
34. Anwyl R. Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain research reviews*, 1999, 29: 83-120.

35. Camodeca N, Breakwell NA, Rowan MJ, Anwyl R. Induction of LTD by activation of group I mGluR in the dentate gyrus in vitro. *Neuropharmacology*, 1999, 38: 1597-1606.
36. Huang L-Q, Rowan M, Anwyl R. Role of protein kinases A and C in the induction of mGluR-dependent long-term depression in the medial perforant path of the rat dentate gyrus in vitro. *Neuroscience letters*, 1999, 274: 71-74.
37. Masu M, Nakajima Y, Moriyoshi K, Ishii T, Akazawa C, Nakanishi S. Molecular characterization of NMDA and metabotropic glutamate receptors. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1993, 707: 153-164.
38. Nakanishi S, Nakajima Y, Masu M, Ueda Y, Nakahara K, Watanabe D, Yamaguchi S, Kawabata S, Okada M. Glutamate receptors: brain function and signal transduction. *Brain research reviews*, 1998, 26: 230-235.
39. Lopez-Bendito G, Shigemoto R, Fairen A, Lujan R. Differential distribution of group I metabotropic glutamate receptors during rat cortical development. *Cerebral Cortex*, 2002, 12: 625-638.
40. Hertz L, Dringen R, Schousboe A, Robinson SR. Astrocytes: glutamate producers for neurons. *Journal of neuroscience research*, 1999, 57: 417-428.
41. Okuyama H. Minimum requirements of n-3 and n-6 essential fatty acids for the function of the central nervous system and for the prevention of chronic disease. *Experimental Biology and Medicine*, 1992, 200: 174-176.
42. Chan PH, Fishman RA. Transient Formation of Superoxide Radicals in Polyunsaturated Fatty Acid-Induced Brain Swelling. *J Neurochem*, 1980, 35: 1004-1007.

43. Lipton SA, Choi Y-B, Pan Z-H, Lei SZ, Chen H-SV, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. 1993.
44. Lafon-Cazal M, Pietri S, Culcasi M, Bockaert J. NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature*, 1993, 364: 535-537.
45. Dumuis A, Sebben M, Haynes L, Pin J-P, Bockaert J. NMDA receptors activate the arachidonic acid cascade system in striatal neurons. *Nature*, 1988, 336: 68-70.
46. Lazarewicz J, Wroblewski J, Palmer M, Costa E. Activation of N-methyl-D-aspartate-sensitive glutamate receptors stimulates arachidonic acid release in primary cultures of cerebellar granule cells. *Neuropharmacology*, 1988, 27: 765-769.
47. Henderson LM, Chappell JB. NADPH oxidase of neutrophils. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1996, 1273: 87-107.
48. Moncada S, Palmer R, Higgs E. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological reviews*, 1991, 43: 109-142.
49. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1990, 87: 1620-1624.
50. Epstein FH, McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New England Journal of Medicine*, 1985, 312: 159-163.
51. Murphy TH, Miyamoto M, Sastre A, Schnaar RL, Coyle JT. Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron*, 1989, 2: 1547-1558.

52. Halliwell B. Oxidants and the central nervous system: some fundamental questions. Is oxidant damage relevant to Parkinson's disease, Alzheimer's disease, traumatic injury or stroke? *Acta Neurologica Scandinavica*, 1989, 80: 23-33.
53. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster J. Pathologic basis of disease. 2005.
54. Patel T, Gores GJ. Apoptosis and hepatobiliary disease. *Hepatology*, 1995, 21: 1725-1741.
55. Nagano T, Yamamoto K, Matsumoto S, Okamoto R, Tagashira M, Ibuki N, Matsumura S, Yabushita K, Okano N, Tsuji T. Cytokine profile in the liver of primary biliary cirrhosis. *Journal of clinical immunology*, 1999, 19: 422-427.
56. Rust C, Gores GJ. Apoptosis and liver disease. *The American journal of medicine*, 2000, 108: 567-574.
57. Preisler H, Li B, Yang J, Huang R, Devemy E, Venugopal P, Tao M, Chopra H, Gregory S, Adler S. Suppression of telomerase activity and cytokine messenger RNA levels in acute myelogenous leukemia cells in vivo in patients by amifostine and interleukin 4. *Clinical Cancer Research*, 2000, 6: 807-812.
58. McGeer EG, Olney JW, McGeer PL. *Kainic acid as a tool in neurobiology*. Baski. Lippincott Williams & Wilkins, 1978.
59. Choi DW, Rothman SM. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annual review of neuroscience*, 1990, 13: 171-182.
60. Epstein FH, Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *New England Journal of Medicine*, 1994, 330: 613-622.
61. Choi DW, Koh J-Y, Peters S. Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. *The Journal of neuroscience*, 1988, 8: 185-196.

62. Finkbeiner S, Stevens CF. Applications of quantitative measurements for assessing glutamate neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1988, 85: 4071-4074.
63. Hahn JS, Aizenman E, Lipton SA. Central mammalian neurons normally resistant to glutamate toxicity are made sensitive by elevated extracellular Ca^{2+} : toxicity is blocked by the N-methyl-D-aspartate antagonist MK-801. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1988, 85: 6556-6560.
64. Schramm M, Eimerl S, Costa E. Serum and depolarizing agents cause acute neurotoxicity in cultured cerebellar granule cells: role of the glutamate receptor responsive to N-methyl-D-aspartate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1990, 87: 1193-1197.
65. McCARTHY KD, De Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *The Journal of cell biology*, 1980, 85: 890-902.
66. Churchwell KB, Wright SH, Emma F, Rosenberg PA, Strange K. NMDA receptor activation inhibits neuronal volume regulation after swelling induced by veratridine-stimulated Na^{+} influx in rat cortical cultures. *The Journal of neuroscience*, 1996, 16: 7447-7457.
67. Dessi F, Charriaut-Marlangue C, Ben-Ari Y. Glutamate-induced neuronal death in cerebellar culture is mediated by two distinct components: a sodium-chloride component and a calcium component. *Brain research*, 1994, 650: 49-55.
68. Goldberg MP, Choi DW. Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *The Journal of neuroscience*, 1993, 13: 3510-3524.

69. Marks JD, Friedman JE, Haddad GG. Vulnerability of CA1 neurons to glutamate is developmentally regulated. *Developmental brain research*, 1996, 97: 194-206.
70. Sattler R, Charlton MP, Hafner M, Tymianski M. Distinct influx pathways, not calcium load, determine neuronal vulnerability to calcium neurotoxicity. *J Neurochem*, 1998, 71: 2349-2364.
71. Hartley D, Kurth M, Bjerkness L, Weiss J, Choi D. Glutamate receptor-induced 45Ca^{2+} accumulation in cortical cell culture correlates with subsequent neuronal degeneration. *The Journal of neuroscience*, 1993, 13.
72. Castilho RF, Hansson O, Ward MW, Budd SL, Nicholls DG. Mitochondrial control of acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *The Journal of neuroscience*, 1998, 18: 10277-10286.
73. McDougal DB, Cowsette BR, Pusateri ME, Carter JG, Manchester JK, Chi MM-Y, Lowry OH. Glutamate and potassium stimulation of hippocampal slices metabolizing glucose or glucose and pyruvate. *Brain research*, 1997, 755: 304-312.
74. Akaike A, Tamura Y, Terada K, Nakata N. Regulation by neuroprotective factors of NMDA receptor mediated nitric oxide synthesis in the brain and retina. *Progress in brain research*, 1994, 103: 391.
75. Dawson VL, Dawson TM, London ED, Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1991, 88: 6368-6371.
76. Huang Z, Huang PL, Panahian N, Dalkara T, Fishman MC, Moskowitz MA. Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science*, 1994, 265: 1883-1885.

77. Olney JW, Sharpe LG. Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. *Science*, 1969, 166: 386-388.
78. Aarts MM, Tymianski M. Novel treatment of excitotoxicity: targeted disruption of intracellular signalling from glutamate receptors. *Biochemical pharmacology*, 2003, 66: 877-886.
79. Szatkowski M, Attwell D. Triggering and execution of neuronal death in brain ischaemia: two phases of glutamate release by different mechanisms. *Trends in neurosciences*, 1994, 17: 359-365.
80. Nicholls D, Attwell D. The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends in pharmacological sciences*, 1990, 11: 462-468.
81. Erspamer V AB. Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. *Nature*, 1952, 169: 800-801.
82. Sengupta B, Chaudhuri S, Banerjee A, Sengupta PK. Characterization of serotonin in protein and membrane mimetic environments: a spectroscopic study. *Chemistry & biodiversity*, 2004, 1: 868-877.
83. Suedee R, Seechamnaturakit V, Suksuwan A, Canyuk B. Recognition properties and competitive assays of a dual dopamine/serotonin selective molecularly imprinted polymer. *International journal of molecular sciences*, 2008, 9: 2333-2356.
84. Twarog BM, Page IH. Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am J Physiol*, 1953, 175: 157-161.
85. Twarog BM. Responses of a molluscan smooth muscle to acetylcholine and 5-hydroxytryptamine. *J Cell Physiol*, 1954, 44: 141-163.
86. Mathews C, Van Holde K. Metabolism of nitrogenous compounds. *Biochemistry*, 1990: 737-783.

87. Kema IP, de Vries EG, Muskiet FA. Clinical chemistry of serotonin and metabolites. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 2000, 747: 33-48.
88. Hannon J, Hoyer D. Serotonin receptors and systems: endless diversity. *Acta Biologica Szegediensis*, 2002, 46: 1-12.
89. Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey P. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacological reviews*, 1994, 46: 157-203.
90. Maricq AV, Peterson AS, Brake AJ, Myers RM, Julius D. Primary structure and functional expression of the 5HT3 receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science*, 1991, 254: 432-437.
91. Banes AK, Watts SW. Enhanced Contraction to 5-Hydroxytryptamine Is Not Due to “Unmasking” of 5-Hydroxytryptamine_{1B} Receptors in the Mesenteric Artery of the Deoxycorticosterone Acetate–Salt Rat. *Hypertension*, 2001, 38: 891-895.
92. Kristiansen K. Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacology & therapeutics*, 2004, 103: 21-80.
93. Kornau H-C, Schenker LT, Kennedy MB, Seeburg PH. Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science*, 1995, 269: 1737-1740.
94. Aghajanian G. Electrophysiology of serotonin receptor subtypes and signal transduction pathways. *Psychopharmacology: The fourth generation of progress*, 1995: 1451-1459.

95. Hoyer D, Middlemiss DN. Species differences in the pharmacology of terminal 5-HT autoreceptors in mammalian brain. *Trends in pharmacological sciences*, 1989, 10: 130-132.
96. Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2002, 71: 533-554.
97. Roberts C, Price GW. Interaction of serotonin autoreceptor antagonists in the rat dorsal raphe nucleus: an in vitro fast cyclic voltammetry study. *Neuroscience letters*, 2001, 300: 45-48.
98. Roberts C, Price G, Gaster L, Jones B, Middlemiss D, Routledge C. Importance of h5-HT 1B receptor selectivity for 5-HT terminal autoreceptor activity: an in vivo microdialysis study in the freely-moving guinea-pig. *Neuropharmacology*, 1997, 36: 549-557.
99. Bühlen M, Fink K, Böing C, Göthert M. Evidence for presynaptic location of inhibitory 5-HT_{1D}-like autoreceptors in the guinea-pig brain cortex. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 1996, 353: 281-289.
100. Pineyro G, de Montigny C, Weiss M, Blier P. Autoregulatory properties of dorsal raphe 5-HT neurons: Possible role of electrotonic coupling and 5-HT_{1D} receptors in the rat brain. *Synapse*, 1996, 22: 54-62.
101. Hopwood SE, Stamford JA. Multiple 5-HT 1 autoreceptor subtypes govern serotonin release in dorsal and median raphe nuclei. *Neuropharmacology*, 2001, 40: 508-519.
102. Hou M, Kanje M, Longmore J, Tajti J, Uddman R, Edvinsson L. 5-HT 1B and 5-HT 1D receptors in the human trigeminal ganglion: co-localization with calcitonin

gene-related peptide, substance P and nitric oxide synthase. *Brain research*, 2001, 909: 112-120.

103. Bruinvels A, Landwehrmeyer B, Gustafson E, Durkin M, Mengod G, Branchek T, Hoyer D, Palacios J. Localization of 5-HT 1B, 5-HT 1D α , 5-HT 1E and 5-HT 1F receptor messenger RNA in rodent and primate brain. *Neuropharmacology*, 1994, 33: 367-386.

104. Waeber C, Moskowitz M. [3H] sumatriptan labels both 5-HT_{1D} and 5-HT_{1F} receptor binding sites in the guinea pig brain: an autoradiographic study. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 1995, 352: 263-275.

105. Linder AE, Ni W, Diaz JL, Szasz T, Burnett R, Watts SW. Serotonin (5-HT) in veins: not all in vain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2007, 323: 415-421.

106. Van de Kar LD, Javed A, Zhang Y, Serres F, Raap DK, Gray TS. 5-HT_{2A} receptors stimulate ACTH, corticosterone, oxytocin, renin, and prolactin release and activate hypothalamic CRF and oxytocin-expressing cells. *The Journal of neuroscience*, 2001, 21: 3572-3579.

107. Van Oekelen D, Megens A, Meert T, Luyten W, Leysen J. Role of 5-HT₂ receptors in the tryptamine-induced 5-HT syndrome in rats. *Behavioural pharmacology*, 2002, 13: 313-318.

108. Duxon M, Flanigan T, Reavley A, Baxter G, Blackburn T, Fone K. Evidence for expression of the 5-hydroxytryptamine-2B receptor protein in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 1997, 76: 323-329.

109. Hoyer D. Molecular pharmacology and biology of 5-HT 1C receptors. *Trends in pharmacological sciences*, 1988, 9: 89-94.

110. Millan M, Dekeyne A, Gobert A. Serotonin (5-HT) 2C receptors tonically inhibit dopamine (DA) and noradrenaline (NA), but not 5-HT, release in the frontal cortex in vivo. *Neuropharmacology*, 1998, 37: 953-955.
111. Jørgensen H, Knigge U, Kjaer A, Warberg J. Adrenocorticotrophic hormone secretion in rats induced by stimulation with serotonergic compounds. *Journal of neuroendocrinology*, 1999, 11: 283-290.
112. Raap D, Van de Kar LD. Selective serotonin reuptake inhibitors and neuroendocrine function. *Life sciences*, 1999, 65: 1217-1235.
113. Boess F, Martin I. Molecular biology of 5-HT receptors. *Neuropharmacology*, 1994, 33: 275-317.
114. Weiss B, Mertz A, Rappold G. Assignment of a human homolog of the mouse Htr3 receptor gene to chromosome 11q23. 1-q23. 2. *Genomics*, 1995, 29.
115. Claeysen S, Faye P, Sebben M, Lemaire S, Bockaert J, Dumuis A. Cloning and expression of human 5-HT_{4S} receptors. Effect of receptor density on their coupling to adenylyl cyclase. *Neuroreport*, 1997, 8: 3189-3196.
116. Barnes JM, Barnes NM. Neurochemical consequences following pharmacological manipulation of central 5-HT₄ receptors. İçinde: *5-HT₄ Receptors in the Brain and Periphery*, Springer, 1998: 103-126.
117. Erlander MG, Lovenberg TW, Baron BM, de Lecea L, Danielson PE, Racke M, Slone AL, Siegel BW, Foye PE, Cannon K. Two members of a distinct subfamily of 5-hydroxytryptamine receptors differentially expressed in rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1993, 90: 3452-3456.
118. Schanen N, Scherer S, Tsui L-C, Francke U. Assignment of the 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 5A gene (HTR5A) to human chromosome band 7q36. 1. *Cytogenetic and Genome Research*, 1996, 72: 187-188.

119. Grailhe R, Grabtree GW, Hen R. Human 5-HT₅ receptors: the 5-HT_{5A} receptor is functional but the 5-HT_{5B} receptor was lost during mammalian evolution. *European journal of pharmacology*, 2001, 418: 157-167.
120. Kohen R, Metcalf MA, Khan N, Druck T, Huebner K, Lachowicz JE, Meltzer HY, Sibley DR, Roth BL, Hamblin MW. Cloning, Characterization, and Chromosomal Localization of a Human 5-HT₆ Serotonin Receptor. *J Neurochem*, 1996, 66: 47-56.
121. Bonaventure P, Nepomuceno D, Hein L, Sutcliffe JG, Lovenberg T, Hedlund PB. Radioligand binding analysis of knockout mice reveals 5-hydroxytryptamine(7) receptor distribution and uncovers 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin interaction with alpha(2) adrenergic receptors. *Neuroscience*, 2004, 124: 901-911.
122. Thomas DR, Hagan JJ. 5-HT₇ receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 2004, 3: 81-90.
123. Geurts FJ, De Schutter E, Timmermans JP. Localization of 5-HT_{2A}, 5-HT₃, 5-HT_{5A} and 5-HT₇ receptor-like immunoreactivity in the rat cerebellum. *J Chem Neuroanat*, 2002, 24: 65-74.
124. Roth BL, Craig SC, Choudhary MS, Uluer A, Monsma F, Shen Y, Meltzer HY, Sibley DR. Binding of typical and atypical antipsychotic agents to 5-hydroxytryptamine-6 and 5-hydroxytryptamine-7 receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1994, 268: 1403-1410.
125. Sleight AJ, Carolo C, Petit N, Zwingelstein C, Bourson A. Identification of 5-hydroxytryptamine₇ receptor binding sites in rat hypothalamus: sensitivity to chronic antidepressant treatment. *Mol Pharmacol*, 1995, 47: 99-103.
126. Mullins UL, Gianutsos G, Eison A. Effects of antidepressants on 5-HT₇ receptor regulation in the rat hypothalamus. *Neuropsychopharmacology*, 1999, 21: 352-367.

127. Yau JL, Noble J, Seckl JR. Acute restraint stress increases 5-HT₇ receptor mRNA expression in the rat hippocampus. *Neuroscience letters*, 2001, 309: 141-144.
128. Nilsson T, Longmore J, Shaw D, Pantev E, Bard JA, Branchek T, Edvinsson L. Characterisation of 5-HT receptors in human coronary arteries by molecular and pharmacological techniques. *Eur J Pharmacol*, 1999, 372: 49-56.
129. Ullmer C, Schmuck K, Kalkman HO, Lubbert H. Expression of serotonin receptor mRNAs in blood vessels. *FEBS Lett*, 1995, 370: 215-221.
130. Tuladhar BR, Ge L, Naylor RJ. 5-HT₇ receptors mediate the inhibitory effect of 5-HT on peristalsis in the isolated guinea-pig ileum. *Br J Pharmacol*, 2003, 138: 1210-1214.
131. Martin G, Humphrey P. Receptors for 5-hydroxytryptamine: current perspectives on classification and nomenclature. *Neuropharmacology*, 1994, 33: 261-273.
132. Bard JA, Zgombick J, Adham N, Vaysse P, Branchek TA, Weinshank RL. Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT₇) positively linked to adenylate cyclase. *J Biol Chem*, 1993, 268: 23422-23426.
133. Adham N, Zgombick JM, Bard J, Branchek TA. Functional characterization of the recombinant human 5-hydroxytryptamine₇ (a) receptor isoform coupled to adenylate cyclase stimulation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1998, 287: 508-514.
134. Lovenberg TW, Baron BM, de Lecea L, Miller JD, Prosser RA, Rea MA, Foye PE, Racke M, Slone AL, Siegel BW. A novel adenylyl cyclase-activating serotonin receptor (5-HT₇) implicated in the regulation of mammalian circadian rhythms. *Neuron*, 1993, 11: 449-458.

135. Baker LP, Nielsen MD, Impey S, Metcalf MA, Poser SW, Chan G, Obrietan K, Hamblin MW, Storm DR. Stimulation of Type 1 and Type 8 Ca^{2+} /Calmodulin-sensitive Adenylyl Cyclases by the Gs-coupled 5-Hydroxytryptamine Subtype 5-HT₇ Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273: 17469-17476.
136. Errico M, Crozier R, Plummer M, Cowen D. 5-HT₇ receptors activate the mitogen activated protein kinase extracellular signal related kinase in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience*, 2001, 102: 361-367.
137. Cunha MP, Lieberknecht V, Ramos-Hryb AB, Olescowicz G, Ludka FK, Tasca CI, Gabilan NH, Rodrigues ALS. Creatine affords protection against glutamate-induced nitrosative and oxidative stress. *Neurochemistry international*, 2016.
138. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
139. Kanki R, Nakamizo T, Yamashita H, Kihara T, Sawada H, Uemura K, Kawamata J, Shibasaki H, Akaike A, Shimohama S. Effects of mitochondrial dysfunction on glutamate receptor-mediated neurotoxicity in cultured rat spinal motor neurons. *Brain Res*, 2004, 1015: 73-81.
140. Hirata Y, Yamamoto H, Atta MS, Mahmoud S, Oh-hashii K, Kiuchi K. Chloroquine inhibits glutamate-induced death of a neuronal cell line by reducing reactive oxygen species through sigma-1 receptor. *J Neurochem*, 2011, 119: 839-847.
141. Chen J, Chua KW, Chua CC, Yu H, Pei A, Chua BH, Hamdy RC, Xu X, Liu CF. Antioxidant activity of 7,8-dihydroxyflavone provides neuroprotection against glutamate-induced toxicity. *Neurosci Lett*, 2011, 499: 181-185.

142. Ma S, Liu H, Jiao H, Wang L, Chen L, Liang J, Zhao M, Zhang X. Neuroprotective effect of ginkgolide K on glutamate-induced cytotoxicity in PC 12 cells via inhibition of ROS generation and Ca(2+) influx. *Neurotoxicology*, 2012, 33: 59-69.
143. Conrad M, Sato H. The oxidative stress-inducible cystine/glutamate antiporter, system x (c) (-) : cystine supplier and beyond. *Amino Acids*, 2012, 42: 231-246.
144. Dawson VL, Dawson TM, Bartley DA, Uhl GR, Snyder SH. Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *J Neurosci*, 1993, 13: 2651-2661.
145. Fischer R, Maier O. Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: role of TNF. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 2015: 610813.
146. Liu S, Yin T, Wei X, Yi W, Qu Y, Liu Y, Wang R, Lian K, Xia C, Pei H, Sun L, Ma Y, Lau WB, Gao E, Koch WJ, Wang H, Tao L. Downregulation of adiponectin induced by tumor necrosis factor alpha is involved in the aggravation of posttraumatic myocardial ischemia/reperfusion injury. *Crit Care Med*, 2011, 39: 1935-1943.
147. Kigerl KA, Gensel JC, Ankeny DP, Alexander JK, Donnelly DJ, Popovich PG. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J Neurosci*, 2009, 29: 13435-13444.
148. Chaparro-Huerta V, Flores-Soto ME, Gudino-Cabrera G, Rivera-Cervantes MC, Bitzer-Quintero OK, Beas-Zarate C. Role of p38 MAPK and pro-inflammatory cytokines expression in glutamate-induced neuronal death of neonatal rats. *Int J Dev Neurosci*, 2008, 26: 487-495.
149. Mizuno T, Zhang G, Takeuchi H, Kawanokuchi J, Wang J, Sonobe Y, Jin S, Takada N, Komatsu Y, Suzumura A. Interferon-gamma directly induces neurotoxicity

through a neuron specific, calcium-permeable complex of IFN-gamma receptor and AMPA GluR1 receptor. *FASEB J*, 2008, 22: 1797-1806.

150. Smith T, Groom A, Zhu B, Turski L. Autoimmune encephalomyelitis ameliorated by AMPA antagonists. *Nat Med*, 2000, 6: 62-66.

151. Wang YC, Lee CM, Lee LC, Tung LC, Hsieh-Li HM, Lee-Chen GJ, Su MT. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress contribute to the pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 12 (SCA12). *J Biol Chem*, 2011, 286: 21742-21754.



EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Tuğba Nurcan YÜKSEL Doğum tarihi: 25.06.1988 Doğum yeri: İstanbul Medeni hali: Bekar Uyruğu: T.C. Adres: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, 25240 ERZURUM Tel: 0442 3448727 Faks: - E-mail: nurchanyuksel_25@hotmail.com
Eğitim
Lise: Üsküdar Lisesi (2005) Lisans: Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi (2006-2010) Yüksek lisans: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı (2010-2013) Doktora: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı (2013-2016)
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce: Orta derecede (ÜDS:57,50 Ekim-2012) Almanca: Rusça:
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
.....
İlgi Alanları ve Hobiler
.....