

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



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

(DOKTORA TEZİ)

**N,N-DİMETİLTRİPTAMİNİN MERKEZİ SİNİR
SİSTEMİNDE AKSONAL VE DENDRİTİK YAPILARIN
OLUŞUMU VE NÖRONAL CANLILIK ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İN VİTRO ARAŞTIRILMASI**

MUZAFFER BEYZA ÇETİN OZANSOY

**DANIŞMAN
PROF. DR. NURAN DARIYERLİ**

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
FİZYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2018

TEZ ONAYI

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir.)



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.



Muzaffer Beyza Çetin Ozansoy

İTHAF

Bilim insanı olma yolunda attığım her adımda bana her zaman güvenen, cesaret veren ve yol gösteren, rahmetli babam Mehmed Celaleddin Çetin'e ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmam boyunca her zaman yakın ilgisi, desteği ve sabrı ile yanımda olan, değerli bilgileri ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, öğrencisi olmaktan dolayı büyük mutluluk duyduğum çok değerli danışman hocam, sayın **Prof. Dr. Nuran Darıyerli'ye**,

Temel tıp ve fizyoloji eğitimine ve bu alandaki bilimsel çalışmalara verdiği önem ve değerli katkıları ile bana örnek olan, anlayışı ve bilgisi ile doktora eğitimim süresince desteğini esirgemeyen kıymetli hocam, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı, sayın **Prof. Dr. Gülderen Şahin'e**,

Doktora eğitimimde değerli bilgileri ve tecrübeleri ile emeği geçen, ilgi ve desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan tüm değerli hocalarıma,

Tez çalışmamın deneylerini gerçekleştirmem için her türlü laboratuvar imkanından faydalanmamı sağlayan, bilgisi ve tecrübeleri ile desteğini esirgemeyen, İstanbul Medipol Üniversitesi Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi Müdürü ve Uluslararası Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı, değerli hocam, sayın **Prof. Dr. Gürkan Öztürk'e**,

Öğretim görevlisi olarak görev yaptığım ve aynı zamanda doktora eğitimim ve tez çalışmama devam ettiğim süre boyunca, anlayışı ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, kıymetli hocam, İstanbul Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı, sayın **Prof. Dr. Ertuğrul Kılıç'a**,

Doktora tez çalışmamda kullandığım DMT molekülünü sentezleyerek yapmayı hayal ettiğim çalışmanın gerçekleşmesinde önemli katkıda bulunan, İstanbul Medipol Üniversitesi Uluslararası Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi, değerli hocam, sayın **Doç. Dr. Mustafa Güzel'e**,

Tez çalışmam için materyal ve cihaz desteği sağlayarak yardımları ve ilgisi ile her zaman yanımda olan, değerli hocam, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi, sayın **Prof. Dr. Ülkan Kılıç'a**,

Tüm eğitim hayatım ve doktora eğitimim süresince, maddi manevi her türlü fedakarlıkları, sevgisi ve bana inancı ile hep yanımda olan, canım annem, ilk öğretmenim, **Sibel Çetin'e** ve doktora tez dönemim boyunca her an yanımda hissettiğim varlığı ile bana güç veren rahmetli babam, **Mehmed Celaleddin Çetin'e**,

Doktora tez dönemim süresince sevgisi, sabrı ve anlayışı ile hep yanımda olan, tez çalışmamın her aşamasında beni destekleyen, sevgili eşim, hocam ve meslektaşım, **Dr. Mehmet Ozansoy'a**, en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 21989

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ii
BEYAN.....	iii
İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xiii
ÖZET	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Nöronlarda Neurite Oluşumu ve Canlılığı Düzenleyen Faktörler	4
2.1.1. Nöronlarda Neurite Oluşumu Süreci.....	4
2.1.2. Nöronlarda Canlılığı Etkileyen Faktörlere Genel Bakış.....	9
2.2. Sigma-1 Reseptörü.....	15
2.2.1. Sig-1R'nün Keşfi	16
2.2.2. Sig-1R'nün Yapısı ve Genel Özellikleri	17
2.2.3. Sig-1R'nün Moleküler ve Hücreyel Fonksiyonları	21
2.2.4. Sig-1R'nün Neurite Oluşumu ve Nöronal Plastisitedeki Rolü	26
2.2.5. Sig-1R'nün Nöronal Canlılıktaki Rolü	29
2.2.5.1. Sig-1R'nün Kalsiyum Homeostasisi ve Eksitotoksosite Üzerine Etkileri	30
2.2.5.2. Sig-1R'nün Oksidatif Stres Üzerine Etkileri.....	32
2.2.5.3. Sig-1R'nün Mitokondriyel Aktivite ve Apoptoz Üzerine Etkileri.....	33
2.2.5.4. Sig-1R'nün ER Stresi Üzerine Etkileri	35
2.3. N,N-Dimetiltriptamin.....	36
2.3.1. N,N-Dimetiltriptaminin Yapısı ve Genel Özellikleri.....	36
2.3.2. DMT'nin Endojen Sentezi	41
2.3.3. DMT'nin Merkezi Sinir Sistemine Taşınma ve Depolanma Mekanizması.....	43
2.3.4. DMT'nin Bilinen Klinik Fizyolojik Etkileri	44

2.3.5. Endojen Halusinojen Madde Olarak DMT'nin Etkileri.....	46
2.3.6. DMT ve Sig-1R.....	50
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	54
3.1. Deney Hayvanları	54
3.2. Deney Grupları.....	54
3.3. DMT Molekülünün Sentez Protokolü.....	56
3.4. Yeni Doğan Fare Primer Hipokampal Nöron Kültürü Protokolü.....	56
3.4.1. Yeni Doğan Fare Hipokampus Diseksiyonu.....	57
3.4.2. Hücre Kültürü Petrilerinin Hazırlanması	57
3.4.3. Hipokampus Dokusundan Hücre İzolasyonu ve Nöron Kültürü Protokolü	58
3.5. İnsan Nöroblastoma Hücre Hattı (SHSY-5Y) Kültür Protokolü	59
3.6. İmmünohistokimya Protokolü ve Konfokal Mikroskopik Görüntülemeleri	60
3.6.1. Fiksasyon	60
3.6.2. Permeabilizasyon ve Bloklama	60
3.6.3. Primer Antikor Uygulaması	61
3.6.4. Sekonder Antikor Uygulaması.....	61
3.6.5. Yeni Doğan Fare Hipokampal Nöron Kültüründe Nöron ve Glia Ayrımının Konfokal Mikroskopik ile Gösterilmesi	61
3.6.6. Yeni Doğan Fare Hipokampal Nöronlarında Sig-1R Varlığının Konfokal Mikroskopik ile Gösterilmesi.....	62
3.7. Yeni Doğan Fare Hipokampal Nöronlarında ve İnsan Nöroblastoma Hücrelerinde Sig-1R Varlığının Western Blot Tekniği ile Gösterilmesi.....	62
3.7.1. Protein İzolasyonu.....	62
3.7.2. Protein konsantrasyonlarının ölçülmesi ve örneklerinin hazırlanması	63
3.7.3. Western Blot Protokolü.....	63
3.8. Hipokampal Nöronlarda Neurite Oluşumu Deneylerinin Protokolü	64
3.9. Yeni Doğan Fare Hipokampal Nöronlarında Neurite Oluşumunun Analiz Edilmesi	64
3.10. Canlılık Deneyi Protokolü ve Hidrojen Peroksit Toksikite Modeli	65
3.10.1. Toksik Hidrojen Peroksit Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	65
3.10.2. Deneyde Kullanılan Moleküllerin ve Dozlarının Tek Başına Toksik Etkilerinin Değerlendirilmesi.....	65
3.10.3. Canlılık Deneyi ve Hidrojen Peroksit Toksikite Modeli Protokolü	66

3.11. Hücre Canlılığının Invert Mikroskop ile Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi	.66
3.12. LDH Testi ile Hücre Canlılığının Analizi	66
3.13. Total Oksidan Kapasite Ölçümü	67
3.14. Verilerin İstatistiksel Analizi	68
4. BULGULAR	69
4.1. DMT Molekülünün Nükleer Magnetik Rezonans Spektroskopisi (NMR) ve Ultra-performans Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometrisi (UPLC-MS) Bulguları	69
4.2. Yeni Doğan Fare Hipokampal Nöronlarının Invert Mikroskopta Morfolojik Olarak Değerlendirilmesine Ait Bulgular	70
4.3. Yeni Doğan Fare Hipokampal Nöron Kültüründe Nöron ve Glia Ayırımının Konfokal Mikroskopi ile Gösterilmesine Ait Bulgular	72
4.4. Yeni Doğan Fare Hipokampal Nöronlarında Sig-1R'nün Konfokal Mikroskopi ile Gösterilmesine Ait Bulgular	73
4.5. Yeni Doğan Fare Hipokampal Nöronlarında ve İnsan Nöroblastoma Hücrelerinde Sig-1R'nün Western Blot Tekniği ile Gösterilmesine Ait Bulgular	74
4.6. Yeni Doğan Fare Hipokampal Nöronlarında Neurite Oluşumunun Değerlendirilmesine Ait Bulgular	75
4.7. Canlılık Deneyi ve Hidrojen peroksit Toksikite Modeli ile İlgili Ön Çalışmalara Ait Bulgular	81
4.7.1. Toksik Hidrojen Peroksit Konsantrasyonunun Belirlenmesine Ait Bulgular	81
4.7.2. Deneyde Kullanılan Moleküllerin ve Dozlarının Tek Başına Toksik Etkilerinin Değerlendirilmesine Ait Bulgular	82
4.8. LDH Testi ve Morfolojik Analizler ile Hücre Canlılığının Değerlendirilmesine Ait Bulgular	83
4.9. Total Oksidan Kapasite Ölçümlerine Ait Bulgular	87
5. TARTIŞMA	89
KAYNAKLAR	100
ETİK KURUL KARARI	125
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	126
ÖZGEÇMİŞ	127

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2-1: Sig-1R'nün ligandları. - Hayashi ve Su (2008) ve Hayashi (2015)'ten değiştirilerek.	20
Tablo 4-1: Neurite oluşumu deneylerinin ortalama ve standart sapma değerleri.	80
Tablo 4-2: Deneysel model için uygun toksik hidrojen peroksit konsantrasyonunun belirlenmesine ait ortalama ve standart sapma değerleri.	82
Tablo 4-3: Deneysel modelde kullanılan moleküllerin ve dozlarının tek başına toksik etkilerinin değerlendirilmesine ait ortalama ve standart sapma değerleri.	83
Tablo 4-4: LDH testi ile hücre canlılığı analizlerinin ortalama ve standart sapma değerleri.	87
Tablo 4-5: Total oksidan kapasite ölümlerinin ortalama ve standart sapma değerleri.	88

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Nöronlarda neurite yapılarının oluşum evreleri. - Thirovic ve Bradke (2009)'dan.....	6
Şekil 2-2: Nörotrofik faktör reseptörleri ve nörotrofinler tarafından aktive edilen hücre içi sinyal yolları. - Bucci ve ark. (2014)'ten.	8
Şekil 2-3: Nöronal canlılığı düzenleyen temel sinyal yolları. - Walker ve ark. (2013)'ten değiştirilerek.	11
Şekil 2-4: Akut ve kronik nörodejenerasyonda nöronal ölüme yol açan faktörler. - Tovar-y-Romo ve Penagos-Puig (2016)'dan değiştirilerek.....	12
Şekil 2-5: ER stresi yanıtı ve mitokondrinin nöronal hücre ölümündeki rolü. - Cao ve Kaufman (2014)'ten.....	15
Şekil 2-6: Sig-1R'nün yapısı. - Manohar ve ark. (2015)'ten.	19
Şekil 2-7: Sig-1R agonist ve antagonistlerinin etki mekanizması. - Yasui ve Su (2016)'dan.....	21
Şekil 2-8: Şaperon reseptör olarak Sig-1R'nün genel etki mekanizması. - Ishikawa ve Hashimoto (2010)'dan.	22
Şekil 2-9: Sig-1R'nün hücreSEL ve moleküler fonksiyonları. - Su ve ark. (2010)'dan. ..	25
Şekil 2-10: Sig-1R agonistleri tarafından NGF kaynaklı neurite oluşumunun güçlendirilmesi için önerilen mekanizma. - Nishimura ve ark. (2008)'den.	28
Şekil 2-11: Sig-1R'nün nörodejeneratif hastalıklardaki nöroprotektif etki mekanizmaları. - Hashimoto (2015b)'ten.....	30
Şekil 2-12: DMT ve benzer yapıdaki triptamin türevi halusinojenler. - Araújo ve ark. (2015)'ten.....	36
Şekil 2-13: DMT içeren ayahuasca içeceğinde bulunan alkaloidler ve kimyasal yapıları. - Domínguez-Clavé ve ark. (2016)'dan.	39
Şekil 2-14: DMT molekülünün sentez basamakları. – McKenna (2004)'ten.....	42
Şekil 2-15: DMT'nin Sig-1R üzerinden gösterdiği düşünülen olası etki mekanizması. - Su ve ark. (2009)'dan.....	52
Şekil 4-1: DMT'nin NMR Spektrumu.....	69
Şekil 4-2: DMT'nin UPLC-MS Kromatogramı.....	70
Şekil 4-3: Hipokampal nöronların kültür ortamına ekildikten 1 saat sonraki morfolojileri.	71

Şekil 4-4: Hipokampal nöronların kültür ortamına ekildikten 20 saat sonraki morfolojileri.....	72
Şekil 4-5: Hipokampal kültürün 20. saatinde indirekt immünohistokimya metodu ile işaretlenen nöron ve glialar.....	73
Şekil 4-6: Hipokampal nöronlarda Sig-1R'nün indirekt immünohistokimya metodu ile gösterilmesi.....	74
Şekil 4-7: Yenidoğan fare hipokampal nöronlarında ve insan nöroblastoma hücrelerinde Sig-1R'nün varlığının western blot tekniği ile gösterilmesi.....	75
Şekil 4-8: Kontrol, DMT 10 μ M, DMT 100 μ M ve SA4503 gruplarında hipokampal nöronların neurite yapılarını gösteren konfokal mikroskop görüntüleri.....	76
Şekil 4-9: DMT 10 μ M, DMT 10 μ M-NE100 ve DMT 10 μ M-XEST.C gruplarında hipokampal nöronların neurite yapılarını gösteren konfokal mikroskop görüntüleri.....	77
Şekil 4-10: DMT 100 μ M, DMT 100 μ M-NE100 ve DMT 100 μ M-XEST.C gruplarında hipokampal nöronların neurite yapılarını gösteren konfokal mikroskop görüntüleri.....	78
Şekil 4-11: SA4503, SA4503-NE100 ve SA4503-XEST.C gruplarında hipokampal nöronların neurite yapılarını gösteren konfokal mikroskop görüntüleri.....	79
Şekil 4-12: Yeni doğan fare hipokampal nöronlarında DMT'nin neurite oluşumu üzerine etkisinin değerlendirilmesi.....	80
Şekil 4-13: Toksik hidrojen peroksit konsantrasyonunun belirlenmesi.....	81
Şekil 4-14: Deneyde kullanılan moleküllerin ve dozlarının tek başına toksik etkilerinin değerlendirilmesi.....	82
Şekil 4-15: Kontrol grubundaki sağlıklı hücrelerin ve H ₂ O ₂ toksisitesine maruz kalmış hücrelerin morfolojisi.....	84
Şekil 4-16: H ₂ O ₂ toksisitesi öncesinde 10 μ M DMT ve 10 μ M DMT ile NE100 uygulanmış hücrelerin morfolojisi.....	84
Şekil 4-17: H ₂ O ₂ toksisitesi öncesinde 100 μ M DMT ve 100 μ M DMT ile NE100 uygulanmış hücrelerin morfolojisi.....	85
Şekil 4-18: H ₂ O ₂ toksisitesi öncesinde 10 μ M SA4503 ve 10 μ M SA4503 ile NE100 uygulanmış hücrelerin morfolojisi.....	85
Şekil 4-19: H ₂ O ₂ toksisitesi öncesinde 100 μ M SA4503 ve 100 μ M SA4503 ile NE100 uygulanmış hücrelerin morfolojisi.....	86
Şekil 4-20: LDH testi ile hücre canlılığının analizi.....	86

Şekil 4-21: Total oksidan kapasite ölçümlerinin değerlendirilmesi. 88



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- 5-HT: 5-hidroksitriptamin
μ-OR: Mu opioid reseptörü
AADC: Aromatik amino asit dekarboksilaz
ALS: Amiyotrofik lateral skleroz
APO1/FAS: Apoptozis antijen 1
ARE: Antioksidan yanıt elementleri
ASIC1a: Asit algılayıcı iyon kanalı 1 a
ATP: Adenozin trifosfat
ATCC: American Type Culture Collection
Bcl-2: B-cell lymphoma 2
BDNF: Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
Ca⁺²: Kalsiyum
CAMs: Hücre adezyon molekülleri
Cl: Klor
D1R: Dopamin D1 reseptörü
DAG: Diaçil gliserol
DHEA-S: Dehidroepiandrosteron-sülfat
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's medium
DMSO: Dimetil sülfoksit
DMT: N,N-dimetiltriptamin
DNA: Deoksiribonükleik asit
DTG: Ditolylguanidine
ECM: Ekstraselüler matriks
EDTA: Etilendiamintetraasetik asit
ELISA: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
ER: Endoplazmik retikulum
ERK: ekstraselüler sinyalle regüle olan kinaz
FASL: FAS ligand
FBS: Fetal sığır serumu
FDA: Gıda ve İlaç Kurumu
GDNF: Glial hücre kaynaklı nörotrofik faktör

GFAP: Glial fibriler asidik protein
GPRCs: G proteini ile eşleşen reseptörler
GRP78/BiP: Glukozla ilişkili protein 78/İmmüoglobulin bağlayıcı protein
H₂O₂: Hidrojen peroksit
INMT: İndoletilamin-N-metiltransferaz
IP3: İnositol 1-4-5-trifosfat
IP3R: İnositol 1-4-5-trifosfat reseptörü
IRE1: İnositol gerektiren enzim 1
JNK: c-Jun N-terminal kinaz
K⁺: Potasyum
K_i: Afinite değeri
L15: Leibovitz's medium
LDH: Laktat dehidrogenaz
LSD: Liserjik asit dietilamid
MAchR: Muskarinik asetilkolin reseptörü
MAM: Mitokondri ile ilişkili membran
MAO-A: Monoamin oksidaz enzimi A
MAOI: Monoamin oksidaz inhibitörü
MAPK: Mitojenle aktive olan protein kinaz
MEDİTAM: Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırma Merkezi
MS: Multipl skleroz
Na⁺: Sodyum
NBA: Neurobasal A medium
NFκB: NF kappa B
NGF: Sinir büyüme faktörü
NK: Doğal öldürücü
NMDAR: N-metil-D-aspartat reseptörü
NMR: Nükleer manyetik rezonans
NO: Nitrik oksit
NOS: Nitrik oksit sentaz
Nrf2: Nükleer faktör-eritroid 2 ile ilişkili faktör 2
NT: Nörotrofin
p38 MAPK: p38 MAP kinaz

PBS: Fosfat tampon çözeltisi
PI3K: Fosfatidilinositol-3 kinaz
PKC: Protein kinaz C
PLC: Fosfolipaz C
PLC γ : Fosfolipaz C γ
PPBP: 4-fenil-1-(4-fenilbutil) piperidin
PVDF: Poliviniliden diflorit
Rac-GTP: Rac-Guanozin trifosfat
REMER: Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi
RNS: Reaktif nitrojen türleri
ROS: Reaktif oksijen türleri
SA4503: Kutamesin
SBDL: Steroid bağlayıcı bölgesi
SAPKs: Stresle aktive olan protein kinazlar
SERT: Serotonin taşıyıcıları
SH-SY5Y: İnsan nöroblastoma hücre hattı
Sig-1R: Sigma-1 reseptörü
Sig-2R: Sigma-2 reseptörü
TAARs: Eser amin ile ilişkili reseptörler
TBS-T: Tris borik asit salin-Triton-X-100
TCA: Trikarboksilik asit siklusu
THH: Tetrahidroharmin
TMD: Transmembran bölgesi
TNF α : Tümör nekrozis faktör α
TNFR: Tümör nekrozis faktör reseptörü
TOS: Total oksidan kapasite
Trk: Tirozin kinaz reseptörü
TrkB: Tirozin kinaz B reseptörü
UPLC-MS: Ultra performans sıvı kromatografisi kütle spektrometresi
UPR: Katlanmamış protein cevabı
VGICs: Voltaj kapılı iyon kanalları
VMAT2: Vesiküler monoamin taşıyıcısı 2

ÖZET

Çetin Ozansoy, M.B. (2018). N,N-Dimetiltriptaminin Merkezi Sinir Sisteminde Aksonal ve Dendritik Yapıların Oluşumu ve Nöronal Canlılık Üzerine Etkilerinin İn Vitro Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji A.D. Doktora Tezi. İstanbul.

N,N-dimetiltriptamin (DMT), vücutta periferik dokularda sentezlenen bir halusinojendir. Sigma-1 reseptörü (Sig-1R) agonisti olduğu keşfedilen DMT'nin, psikoaktif etkileri üzerinde durulmasına rağmen merkezi sinir sistemindeki fizyolojik rolü halen bilinmemektedir. Sig-1R, aksonal ve dendritik yapıların (neurite) oluşumu, plastisite, ER'dan mitokondriye Ca^{+2} akışı ve canlılık süreçlerinde önemli rol oynamaktadır. Çalışmamızın amacı, Sig-1R endojen agonisti DMT'nin neurite oluşumu ve nöronal canlılık üzerindeki olası fizyolojik etkilerini araştırmaktır. Bu amaçla, yeni doğan fare hipokampal nöron kültürü yapıldı. Deney gruplarına sırasıyla DMT veya Sig-1R sentetik agonisti SA4503, DMT ve SA4503 öncesinde Sig-1R antagonisti veya inositol 1-4-5-trifosfat reseptörü (IP3R) antagonisti uygulandı. Ardından immünohistokimya ile neurite yapıları işaretlenerek konfokal mikroskop görüntülemeleri üzerinden neurite analizi yapıldı. İnsan nöroblastoma hücreleri de sırasıyla DMT veya SA4503 ile ayrıca DMT ve SA4503 öncesinde Sig-1R antagonisti ile muamele edildi, ardından hücrelerde hidrojen peroksit toksisitesi oluşturuldu. Laktat dehidrogenaz testi ile hücre canlılığı, total oksidan kapasite testi ile oksidan parametreler ölçüldü. Sig-1R'nün hücrelerdeki varlığı immünohistokimya ve western blot teknikleriyle gösterildi. Çalışmamızda, DMT'nin hipokampal nöronlarda neurite oluşumunu arttırdığı ($p<0,001$), Sig-1R ve IP3R antagonisti uygulamaları ile bu etkisinin azaldığı görüldü ($p<0,001$). Ayrıca DMT'nin, hidrojen peroksit toksisitesini ve total oksidan kapasiteyi düşürerek ($p<0,001$) canlılığı arttırdığı, Sig-1R antagonistinin DMT kaynaklı antioksidan etkiyi azalttığı gözlemlendi ($p<0,001$). Endojen agonist olarak DMT'nin bu etkilerinin sentetik agonist kadar güçlü olduğu saptandı. Çalışmamızdan elde edilen veriler, DMT'nin Sig-1R üzerinden gerçekleşen nöroprotektif ve antioksidan etkilere sahip olduğunu, yine Sig-1R üzerinden neurite oluşumunu uyardığını ve bu etkisinin ER ile mitokondri arasındaki Ca^{+2} taşınmasının regülasyonu üzerinden olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: N,N-dimetiltriptamin, sigma-1 reseptörü, aksonal ve dendritik yapıların oluşumu, inositol 1-4-5-trifosfat reseptörü, nöronal canlılık

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 21989

ABSTRACT

Cetin Ozansoy, M.B. (2018). In Vitro Investigation of the Effects of N,N-Dimethyltryptamine on the Neurite Outgrowth and Neuronal Viability in Central Nervous System. İstanbul University, Institute of Health Science, Physiology. Philosophy of Doctorate Thesis. İstanbul.

N,N-dimethyltryptamine (DMT), is a hallucinogen synthesized in peripheral tissues in the body. The majority of research has been focused on the psychoactive effects of DMT, discovered as an endogen agonist of sigma-1 receptor (Sig-1R) but its physiological role in the central nervous system is still unknown. Sig-1R plays a vital role in neurite outgrowth, plasticity, Ca^{+2} transport from ER to mitochondria, viability. The aim of this study is to investigate the physiological effects of DMT in neurite outgrowth and neuronal survival. For this purpose, postnatal mice hippocampal neuron culture was performed. Neurons were treated with DMT or Sig-1R agonist SA4503. Sig-1R antagonist or inositol 1,4,5-triphosphate receptor (IP3R) antagonist were also added to culture before DMT and SA4503. Neurites were labeled immunocytochemically. Neurite analysis was performed on confocal microscope images. Human neuroblastoma cells were also treated with DMT or SA4503. Sig-1R antagonist was applied before DMT and SA4503. Then cells were exposed to hydrogen peroxide (H_2O_2). To determine cell viability and oxidant status, lactate dehydrogenase and total oxidant capacity tests were used. The presence of Sig-1R in cells was investigated by immunocytochemistry and western blotting. In our study, DMT increased neurite outgrowth ($p<0,001$), Sig-1R and IP3R antagonist treatment reduced this effect ($p<0,001$). DMT decreased H_2O_2 toxicity and oxidant capacity thus increased viability ($p<0,001$), Sig-1R antagonist treatment reduced this effect ($p<0,001$). Also, DMT were as potent as synthetic agonist. Our findings showed that DMT has neuroprotective, antioxidant effects through Sig-1R, induces neurite outgrowth through Sig-1R regulating Ca^{+2} transport between ER and mitochondria.

Key Words: N,N-dimethyltryptamine, sigma-1 receptor, neurite outgrowth, inositol 1-4-5-triphosphate receptor, neuronal viability

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 21989

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nöronlardaki aksonal ve dendritik yapıların diğer adı ile neurite yapılarının oluşumu, sinir sisteminin gelişimi ve fonksiyonel sinaptik bağlantıların kurulması için gerekli olan en temel basamaklardan biridir. Bu süreçte meydana gelecek problemler birçok nörolojik hastalığın patolojisinin altında yatan başlıca sebeplerdendir. Nöronal canlılığın korunması ile birlikte neurite oluşumunun artırılması, günümüzde nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde başta gelen terapötik stratejilerden biridir (Kiryushko ve ark. 2004; Read ve Gorman 2009; Kimura ve ark. 2014). Bir nöronda, ilk neurite yapılarının filizlenmesini daha sonra akson ve dendritlere farklılaşma, akson uzaması ve dendritik dallanma takip eder, dolayısıyla neurite yapıları akson ve dendritlerin temel yapısını oluşturur. (Dehmelt ve Halpain 2004; Kiryushko ve ark. 2004; Sainath ve Gallo 2015). Neurite oluşumu ve yönlenmesi ekstraselüler ortamdan gelen birçok sinyal tarafından kontrol edilir. Bu sinyaller ekstraselüler matriksten (ECM), ekstraselüler ortama salgılanan faktörlerden ve hücre içi lokal kalsiyum (Ca^{+2}) değişikliklerinden kaynaklanabilir. Bu uyarılar hücre içinde birçok sinyal yolağını aktive ederek neurite oluşumunu ve hücre canlılığı ile ilgili süreçleri etkiler (Kiryushko ve ark. 2004; Sainath ve Gallo 2015). Neurite oluşumu ve yönlenmesini uyaran ayrıca nöronal sağkalımı regüle ettiği bilinen ekstraselüler sinyaller içinde en çok çalışılmış olanlar, nörotrofik faktörlerdir (Kiryushko ve ark. 2004; Read ve Gorman 2009; Kimura ve ark. 2014). Nörotrofik faktörler, nöronal canlılığı ve neurite oluşumunu destekleyen, sinir sisteminin gelişimi, farklılaşması, sinaps oluşumu ve santral sinir sistemi plastisitesinde kritik rol oynayan faktörlerdir (Patapoutian ve Reichardt 2001; Kiryushko ve ark. 2004; Arévalo ve Wu 2006; Cui 2006). Nörotrofik faktörlerin reseptörlerine bağlanması, mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK), fosfotidilinositol-3 kinaz (PI3K) / Akt ve fosfolipaz C γ (PLC γ) / protein kinaz C (PKC) gibi hücre içi sinyal yollarını aktive eder. Böylece, hücre büyümesi, canlılık, neurite oluşumu ve farklılaşma gibi önemli süreçler regüle edilir (Patapoutian ve Reichardt 2001; Kiryushko ve ark. 2004; Arévalo ve Wu 2006; Cui 2006; Bucci ve ark. 2014). Hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu da hücre canlılığı ve neurite oluşumu gibi süreçlerde kritik rol oynamaktadır. Mitokondri ile endoplazmik retikulum (ER) arasındaki Ca^{+2} transferinin nöronlarda plastisiteyi, neurite oluşumunu ve canlılığı düzenlemekte önemli olduğu, nekroz ve apoptoz gibi ölüm süreçlerinin düzenlenmesinde birçok önemli fonksiyonu üstlendiği bilinmektedir (Mattson 2007; Ouyang ve Giffard 2012).

Son yıllarda, ER ve mitokondri arasındaki iletişime katılan, hücrelerdeki biyoenerjetik olaylarda, yaşamsal süreçlerde ve hücre ölümü mekanizmalarında rol oynayan ve protein-protein etkileşimleri üzerinden önemli hücresel işlevleri düzenleyen, moleküler şaperonlar adındaki birçok protein tanımlanmıştır (Ouyang ve Giffard 2012). Bu moleküler şaperonlardan biri olan Sigma-1 reseptörü (Sig-1R), ER membranında yerleşim gösteren, neurite oluşumu, plastisite, nöroprotektif ve yaşamsal süreçlerde rol oynayan önemli bir reseptördür (Hayashi ve Su 2007; Kourich ve ark. 2012; Luadtke ve

ark. 2012; Nguyen ve ark. 2014a). Sig-1R, periferik dokularda ve santral sinir sisteminde yaygın olarak eksprese edilir ancak ekspresyonunun en yüksek olduğu organ beyindir. Sig-1R aktive olduğunda hücre içinde çabuk yıkıma uğrayan inositol 1-4-5-trifosfat reseptörüne (IP3R) bağlanır ve onu stabilize ederek ER'dan Ca^{+2} iyonlarının mitokondriye akışını regüle eder. Böylece adenozin trifosfat (ATP) üretimi artırılır ve hücre içinde başlayan bu süreç neurite oluşumu, uzaması, oksidatif stresin ve apoptotik hücre ölümünün baskılanması gibi etkiler ile sonuçlanır. Sig-1R'ü hücre stres, ER Ca^{+2} unun azalması ya da yüksek konsantrasyonda agonistleri ile uyarılması durumunda, ER'dan ayrılarak plazma membranına taşınır ve membranda bulunan voltaj kapılı çeşitli iyon kanalları, reseptörler ve kinazlarla etkileşime girerek hücre fonksiyonları düzenler (Hayashi ve Su 2007; Ishikawa ve Hashimoto 2010; Kourich ve ark. 2012; Luadtke ve ark. 2012; Oyuang ve Giffard 2012; Nguyen ve ark. 2014a). *In vivo* ve *in vitro* birçok nörodejeneratif hastalık modelinde, nörotoksisite ve oksidatif stres hasarında Sig-1R selektif agonistlerinin nöroprotektif etki gösterdiği, nöronal plastisiteyi ve neurite uzamasını uyardığı bildirilmiştir (Frecska ve ark. 2013). Bu etkilerinden dolayı, son yıllarda, glokom, alzheimer, parkinson, multipl skleroz (MS), iskemi, depresyon, şizofreni, demans, amiyotrofik lateral skleroz (ALS) gibi birçok nörodejeneratif ve psikiyatrik hastalığın tedavisinde kullanılmak üzere yeni ve etkili Sig-1R agonistleri geliştirilmesi konusuna büyük bir ilgi vardır (Kourich ve ark. 2012; Nguyen ve ark. 2014a; 2014b; 2017; Hashimoto 2015).

N,N-dimetiltriptamin (DMT), Sig-1R'nün endojen ligandıdır ve vücutta periferik dokularda sentezlenen bir halusinojendir. Güney Amerika yerlileri tarafından şaman ayinlerinde kullanılan yopo, epena gibi psikoaktif tütsülerin ve ayahuasca, yage gibi kutsal çayların içerisinde bulunan ve psikoaktif etkisi olan bileşiklerden biri olarak tanınmıştır (Fontanilla ve ark. 2009). Güçlü psikotropik özelliklere sahip olan DMT doğada da birçok bitki türünde bulunan bir metillenmiş indolalkilamindir. DMT yapısal olarak serotonin, melatonin hormonu ve bufotenin, psilosin gibi halüsinojenik triptaminlere benzer (Barker ve ark. 2012; Frecska ve ark. 2013; Araújo ve ark. 2015; Carbonaro ve Gatch 2016) ve indol-etilamin-N-metiltransferaz (INMT) enzimi aracılığı ile triptofandan sentezlenir (Barker ve ark. 1981; Frecska ve ark. 2013; Carbonaro ve Gatch 2016). INMT enzimi, başta akciğer olmak üzere, tiroid ve adrenal bezlerde yüksek seviyelerde, daha az miktarda ise plasenta, iskelet kası, kalp, ince barsak, mide, pankreas ve lenf nodlarında ifade edilmektedir (Frecska ve ark. 2013). Periferik dokularda üretilen DMT merkezi sinir sistemine taşınarak nöronal vesiküllerde depo edilir (Cozzi ve ark. 2009; Vitale ve ark. 2011). DMT'nin genellikle psikoaktif etkileri üzerinde durulmasına rağmen fizyolojik süreçlerdeki rolü bilinmemektedir (Fontanilla ve ark. 2009; Su ve ark. 2009; Frecska ve ark. 2013). 2009'da endojen Sig-1R ligandı olduğu keşfedilen DMT'nin, Sig-1R üzerinden gerçekleşebilecek olası fizyolojik etkileri hakkında birçok hipotez öne sürülmüştür ancak reseptörün agonistleriyle yapılan birçok çalışma olmasına rağmen DMT'nin kendisinin kullanılarak yapıldığı ve merkezi sinir sistemi nöronları üzerindeki temel fizyolojik etkilerinin araştırıldığı çalışmalar bulunmamaktadır (Fontanilla ve ark. 2009; Frecska ve ark. 2013).

Çalışmada amacımız, merkezi sinir sistemindeki temel fizyolojik etkileri bilinmeyen bir endojen Sig-1R ligandı olan DMT'nin neurite oluşumu ve nöronal canlılık üzerindeki olası fizyolojik etkilerini araştırmaktır. Bu amaçla, DMT'nin neurite oluşumu üzerindeki etkilerini araştırmak üzere yeni doğan farelerin hipokampus dokularından izole edilen primer hipokampal nöronlar DMT veya Sig-1R sentetik agonisti ile ayrıca DMT ve Sig-1R sentetik agonistinden önce Sig-1R antagonisti veya IP3R antagonisti ile muamele edildi. Ardından nöronlardaki neurite yapıları immünositokimyasal yöntemle işaretlenerek konfokal mikroskopta görüntülendi ve neurite içeren hücrelerin yüzdeleri hesaplandı. Böylece, DMT'nin nöronlarda neurite oluşumu üzerindeki etkisi ilk kez çalışmamızda gösterildi. Öte yandan endojen ligand olarak DMT'nin bu etkisi sentetik bir agonist ile kıyaslandı ve etkisinin Sig-1R üzerinden gerçekleşip gerçekleşmediği bir antagonistin varlığında test edildi. DMT'nin neurite oluşumu üzerindeki etkisinin Sig-1R ile IP3R arasındaki etkileşimden kaynaklanıp kaynaklanmadığı da ilk kez çalışmamızda incelendi. DMT'nin nöronal canlılık üzerindeki etkisinin araştırılması için ise insan nöroblastoma hücre hattı (SH-SY5Y) hücrelerinde in vitro hidrojen peroksit (H_2O_2) toksisite modeli kullanıldı. Hücreler, H_2O_2 toksisitesinden önce DMT veya Sig-1R selektif agonisti ile ayrıca DMT veya Sig-1R selektif agonisti öncesinde Sig-1R selektif antagonisti ile muamele edildi. Ardından hücrelerde H_2O_2 toksisitesi oluşturuldu. Hücrelerin canlılığı laktat dehidrogenaz (LDH) testi ile, oksidan parametreler ise total oksidan kapasite (TOS) testi ile ölçülerek DMT'nin nöroprotektif etkisi incelendi. DMT'nin söz konusu nöroprotektif etkisi sentetik Sig-1R agonisti ile kıyaslandı ve bu etkisinin Sig-1R üzerinden gerçekleşip gerçekleşmediği Sig-1R antagonisti kullanılarak gösterilmiş oldu. Primer hipokampal nöronlarda Sig-1R'nün varlığı hem western blot tekniği hem de konfokal görüntülemeler ile, SH-SY5Y hücrelerinde ise western blot tekniği ile gösterildi. Böylece, Sig-1R endojen ligandı DMT'nin nöronal canlılığı destekleyici ve oksidatif stres hasarına karşı koruyucu etkileri de ilk kez bizim çalışmamızda gösterildi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nöronlarda Neurite Oluşumu ve Canlılığı Düzenleyen Faktörler

2.1.1. Nöronlarda Neurite Oluşumu Süreci

Sinir hücrelerinde aksonal ve dendritik uzantıların oluşumu, sinir sisteminin gelişimi, plastisitesi ve fonksiyonel nöronal bağlantıların kurulması için gerekli temel süreçlerden biridir. Bu süreçte meydana gelecek problemler birçok nörolojik hastalığın patolojisinin altında yatan temel sebeplerdendir. Nöronal canlılığın korunması ile birlikte neurite oluşumunun arttırılması, günümüzde nörodejenerasyonun, sinir hasarının veya sinaptik bağlantı problemlerinin olduğu hastalıklarda başta gelen tedavi stratejilerinden biridir (Kiryushko ve ark. 2004; Read ve Gorman 2009; Kimura ve ark. 2014).

Nöronlar morfolojik olarak bir veya birden daha fazla uzun ince uzantıları ile tanımlanırlar, bu uzantılara neurite adı verilir. Neurite oluşumu akson ve dendritlerin oluşumu için gerekli ilk temel basamaktır. Bir nöronda, ilk neurite yapılarının oluşumunu akson uzaması ve dendritik dallanma takip eder ve bu durum nöronal farklılaşmanın temelini oluşturan süreçtir (Dehmelt ve Halpain 2004; Kiryushko ve ark. 2004; Sainath ve Gallo 2015).

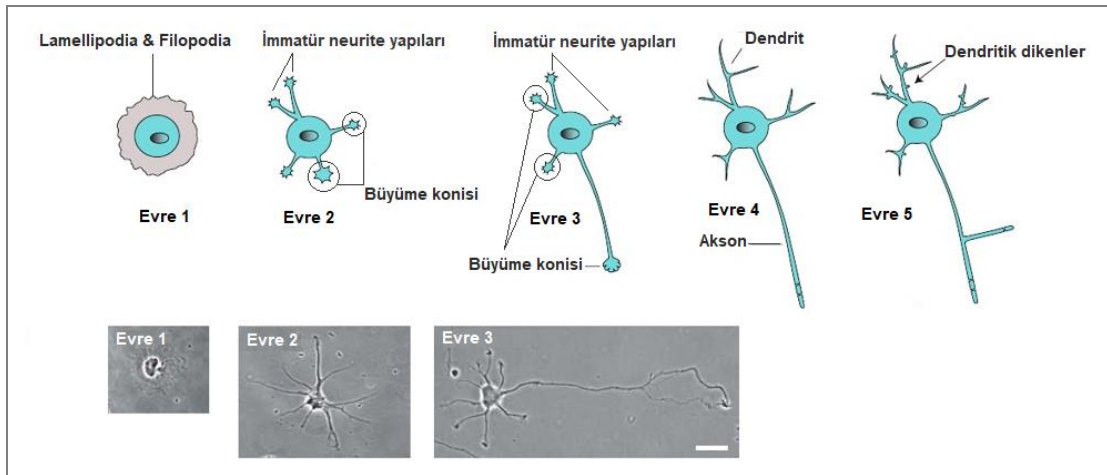
Olgunlaşmış nöronlarda bulunan hücresel uzantılar yani akson ve dendritler, in vivo şartlarda kolaylıkla tanımlanabilmektedir. Ancak in vivo ortamdaki deneysel zorluklar ve karmaşıklıklar nedeniyle in vitro hücre kültürü çalışmaları sıklıkla alternatif yöntemler olarak tercih edilmektedir. İn vitro kültür ortamına düşük yoğunlukta ekilerek oluşturulan primer nöron kültürleri, neurite oluşumu ve farklılaşma süreçlerini birçok açıdan in vivo şartlardakine oldukça benzer şekilde yansıtmaktadır ve faydalı deneysel modellerdir (Dehmelt ve Halpain 2004). Bu amaçla, primer hipokampal ve kortikal nöronlar fonksiyonel olarak farklılaşmış aksonlar ve dendritler oluşturmaları ve fonksiyonel sinaptik bağlantılar kurmaları nedeniyle neurite çalışmalarında tercih edilmektedirler. Öte yandan, deneysel tekniklerin zorluğundan dolayı sıklıkla daha basit modeller olan hazır hücre hatları ile örneğin; nöroblastoma hücreleri ya da sinir büyüme faktörü (NGF) ile uyarılmış neurite oluşumu modeli için PC12 hücreleri ile neurite çalışmaları yapılmaktadır (Dehmelt ve Halpain 2004). Ancak, kültür ortamlarında yaşatılan hazır hücre hatları, nöron benzeri hücrelerdir ve gerçek

neurite yapıları oluşturmazlar. Bu hücrelerin sahip olduğu uzantılar, gerçek neurite yapılarındaki hücre iskeleti organizasyonuna ve özelliklere tam olarak sahip değildir (Dehmelt ve Halpain 2004; Kiryushko ve ark. 2004).

Primer hipokampal nöronlar neurite oluşumunu inceleyen araştırmalarda sıklıkla kullanılmış bir modeldir ve olgunlaşma sürecindeki hipokampal nöronların geçirdiği morfolojik değişiklikler oldukça iyi tanımlanmıştır (Dehmelt ve Halpain 2004; Kiryushko ve ark. 2004; Sainath ve Gallo 2015). Yeni doğan nöronları ve nöral progenitör hücreler, neurite içermeyen, olgunlaşmamış küresel hücreler şeklindedir. Nöronlar gelişim süreçleri boyunca, önce yapısal ve morfolojik olarak farklı özelliklerdeki neurite yapılarını uzatırlar. Neurite oluşumu sürecinin ardından polarizasyon evresi başlar ve bu evrede tamamen farklılaşmış akson ve dendritler geliştirirler. In vitro kültür ortamında hipokampal nöronlarda neurite oluşumu, iyi tanımlanmış 5 evreden oluşur. İlk evrede, hücre gövdesinin etrafına yayılan aktinden zengin lamellipodia ve filopodia yapıları oluşur (Hücre kültürüne ekimden saatler sonra başlar, 0-6 saat). Ardından, yuvarlak şekilli nöronun gövdesinden, aynı boyda ve tam gelişmemiş olan immatür kısa uzantılar yani ilk neurite yapıları belirmeye başlar (6-24 saat). Bu neurite yapılarının uç kısımlarında büyüme konileri bulunur. Bir sonraki aşamada, eş boydaki immatür neurite yapılarından aktif büyüme konisine sahip olan biri, hızla uzamaya başlar (24-72 saat). Uzamaya başlayan bu neurite daha sonra aksone farklılaşır. Bir sonraki evreye gelindiğinde akson dışında kalan diğer küçük neurite yapıları dendritlere dönüşürler (3-7 gün) ve son evrede ise akson ve dendritlerin fonksiyonel olarak tamamen farklılaşması, dendritik dikenlerin oluşumu ve sinaptik bağlantıların kurulması (7-14 gün) gerçekleşir (Dotti ve ark. 1988; Yoshimura ve ark. 2006; Thirovic ve Bradke 2009; Flynn 2013; Lestanova ve ark. 2016). Nöronlarda neurite oluşumunun evreleri Şekil 2.1’de gösterilmiştir.

Akson ve dendritlerin temel yapısı olan neurite yapılarının oluşumu, aktin ve mikrotübüllerin organizasyonu ile başlar (Dehmelt ve Halpain 2004; Sainath ve Gallo 2015). Bir hücresel uzantının neurite olarak tanımlanabilmesi için taşınması gereken bazı temel özellikler bulunmaktadır. Öncelikle neurite yapıları mikrotübülden oluşan bir iskelete sahip olmalıdır. Mikrotübüller en temel ve en önemli neurite markırıdır. İkinci olarak, neurite yapıları dinamik uzantılardır ve büyüme konisi adındaki farklı büyüklüklerdeki aktif uç kısımlara sahiptirler. Son olarak, neurite denilen uzantıların

boyunun en az hücre gövdesi kadar olması gerekmektedir. Bazı araştırmacılar, bu uzantıların hücre gövdesinin iki katı büyüklüğünden daha uzun olmaları gerektiğini düşünmektedir. Ancak primer hipokampal nöronlarda oluşan bazı neurite yapılarının hücre gövdesi boyunda olduğu ve bu yapıların boylarının saatlerce uzamadığı gözlenmiştir. Daha sonra bu uzantılardan birisi genellikle uzamasına devam ederek tek uzun bir aksona farklılaşmaktadır (Dehmelt ve Halpain 2004).



Şekil 2-1: Nöronlarda neurite yapılarının oluşum evreleri. - Thirovic ve Bradke (2009)'dan.

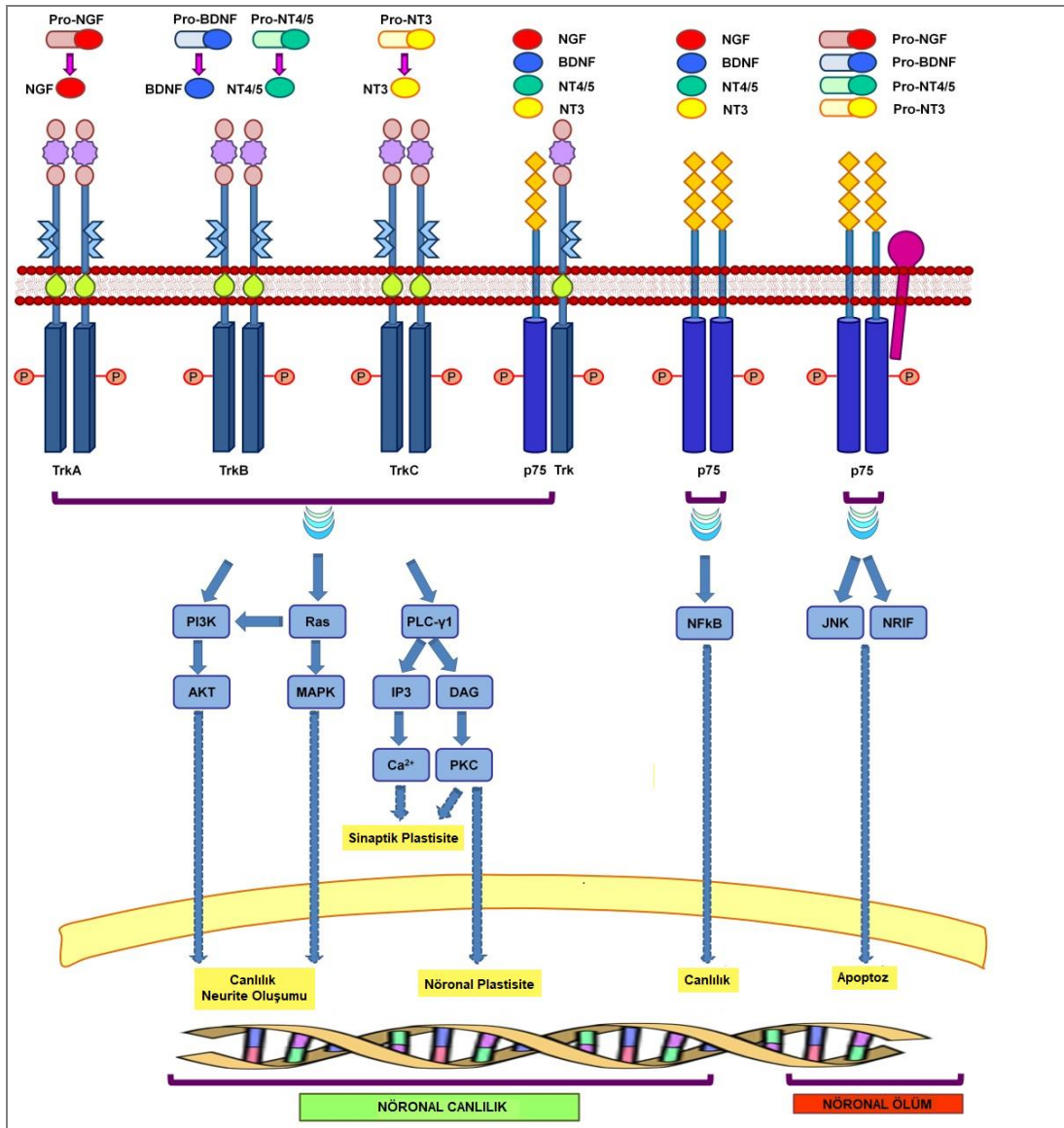
Neurite yapıları, büyüme konisi adı verilen aktin molekülünden zengin uç kısımlara sahiptir. (Dehmelt ve Halpain 2004). Gelişme ya da rejenerasyon sürecindeki nöronlarda bulunan büyüme konisi, neurite büyümesini ve akson yönlendiğini kontrol eden kritik öneme sahip bir yapıdır. Büyüme konileri plazma membranında bulunan reseptörler sayesinde neurite büyümesini ve uzamasını kontrol eden sinyalleri algılayabilirler (Kiryushko ve ark. 2004).

Neurite oluşumu ve yönlendiğini ekstraselüler ortamdan gelen birçok sinyal tarafından kontrol edilir. Bu sinyaller ekstraselüler matrikste (ECM) yer alan ECM molekülleri, hücre adezyon molekülleri (CAMs), çeşitli nöropeptidler, büyüme faktörleri ve hücre içi lokal kalsiyum (Ca^{+2}) değişikliklerinden kaynaklanır. Bu uyarılar hücre içinde birçok sinyal yolağını aktive ederek neurite oluşumunu ve hücre canlılığı ile ilgili süreçleri etkiler (Kiryushko ve ark. 2004; Sainath ve Gallo 2015). Neurite oluşumu ve yönlendiğini uyardığı bilinen ekstraselüler sinyaller içinde en çok

çalışılmış olanlar ise nörotrofik faktörlerdir (Kiryushko ve ark. 2004; Read ve Gorman 2009; Kimura ve ark. 2014). Nörotrofik faktörler, nöronal canlılık, apoptoz, gelişim, proliferasyon, sinaps oluşumu, farklılaşma ve santral sinir sistemi plastisitesinde kritik rol oynayan büyüme faktörleridir. Nörotrofik faktörlerin nöronal canlılığı desteklediği, neurite oluşumunu, nöronal plastisiteyi ve yetişkin santral sinir sisteminde akson rejenerasyonunu uyardığı bilinmektedir (Cui 2006). Son yıllarda yapılan çalışmalar nörotrofik faktörler ve reseptörleri dışında, G proteini ile eşleşen reseptörlerin (GPCRs) de hücre içinde başta protein kinazlar ve fosfolipaz C (PLC) olmak üzere çeşitli sinyal molekülleri üzerinden aktin ve mikrotübül organizasyonunu etkileyerek neurite gelişimi ve uzamasını uyardığını göstermektedir (Lestanova ve ark. 2016).

Nörotrofik faktörler arasında en iyi tanımlanmış grup nörotrofinler olarak adlandırılan beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), NGF, nörotrofin 3 (NT-3), nörotrofin 4 (NT-4) ve nörotrofin 5 (NT-5)'ten oluşan gruptur (Cui 2006). Bu faktörler iki reseptör sınıfı ile etkileşime girerler; yüksek bağlanma afinitesi gösterdikleri tirozin kinaz reseptörleri (Trk) ve daha düşük bağlanma afinitesi gösterdikleri, genellikle nörotrofinlerin öncül formlarının bağlandığı pan-nörotrofik reseptör p75'tir (Patapoutian ve Reichardt 2001; Kiryushko ve ark. 2004; Arévalo ve Wu 2006; Cui 2006). Nörotrofik faktörler biyolojik etkilerini, tirozin kinaz reseptörlerine bağlanarak gösterirler. Faktörün reseptörüne bağlanmasından sonra reseptör dimerizasyonu gerçekleşir, reseptörün sitoplazmik bölümündeki tirozin amino asitleri otofosforile olur. Otofosforilasyon, reseptörün sitoplazmik kısmındaki protein kinazların aktivasyonuna yol açar ve böylece hücre içinde çeşitli sinyal yolları uyarılır (Patapoutian ve Reichardt 2001; Arévalo ve Wu 2006; Cui 2006). Nörotrofik faktörlerin Trk reseptörlerine bağlanması ile, mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) / ekstraselüler sinyalle regüle olan kinaz (ERK), fosfotidilinositol-3 kinaz (PI3K) / Akt ve fosfolipaz C γ (PLC γ) / protein kinase C (PKC) gibi hücre içi sinyal yolları aktive olur. Aktive olan sinyal yolları hücresel canlılık, farklılaşma, apoptoz, neurite oluşumu ve plastisite gibi önemli süreçleri regüle eder (Patapoutian ve Reichardt 2001; Kiryushko ve ark. 2004; Arévalo ve Wu 2006; Cui 2006; Bucci ve ark. 2014). Şekil 2.2'de görüldüğü gibi, PI3K/Akt ve MAPK/ERK sinyal yolları nöronal canlılık ve neurite oluşumunu desteklerler. PLC γ sinyal yolu ise hücre içinde inositol 1-4-5-trifosfat (IP3) ve diaçil gliserol (DAG) üretimini artırarak hücre içi Ca⁺² konsantrasyonunun artmasına ve PKC aktivasyonuna yol açar, böylece nöronal ve sinaptik plastisiteyi uyarır. Öte yandan p75

reseptörlerinin neurite oluşumu üzerinde bir etkisi görülmemektedir, bu reseptörlerin nörotrofik faktörler tarafından uyarılması c-Jun N-terminal kinaz (JNK) sinyal yolu üzerinden apoptozu uyarır veya NF kappa B (NFkB) sinyal yolu üzerinden apoptozu baskılayarak canlılığı destekler (Arévalo ve Wu 2006; Cui 2006; Bucci ve ark. 2014).



Şekil 2-2: Nörotrofik faktör reseptörleri ve nörotrofinler tarafından aktive edilen hücre içi sinyal yolları. - Bucci ve ark. (2014)'ten.

Hücre içi Ca⁺² konsantrasyonunun kontrolü, hücre canlılığı, neurite oluşumu ve nöronal plastisite gibi süreçlerde önemli rol oynamaktadır. Sitoplazmik Ca⁺² seviyesinin düzenlenmesi dışında, büyüme konilerindeki lokal Ca⁺² miktarı da neurite oluşumu,

uzaması ve akson yönleneşmesi için çok önemlidir (Henley ve Poo 2004; Iketani ve ark. 2009). Plazma membranında bulunan çeşitli Ca^{+2} kanallarının ya da endoplazmik retikulumdaki (ER) IP3 reseptörlerinin (IP3R) spesifik inhibitörlerle bloke edilmesinin neurite oluşumunu ve uzamasını bloke ettiği, IP3R'den salınan Ca^{+2} miktarının belirli bir seviyede olmasının neurite büyümesi için kritik olduğu bilinmektedir (Henley ve Poo 2004; Iketani ve ark. 2009). Bu bağlamda, ER ve mitokondri gibi hücre içi Ca^{+2} miktarını düzenleyen organeller tüm bu süreçlerde ciddi rol oynamaktadır (Mattson ve ark. 2000; Henley ve Poo 2004). Mitokondri ile ER arasındaki Ca^{+2} transferinin nöronlarda plastisiteyi, neurite oluşumunu ve canlılığı düzenlemekte önemli rol oynadığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Mattson 2007).

ER nöronlarda canlılığı, neurite oluşumunu ve plastisiteyi düzenleyebilmek üzere hücre içinde yaygın bir lokalizasyona sahiptir, öyle ki ER nöronlarda neurite yapıları, akson ve dendritler, sinaptik terminaller gibi yapılara yayılmış olarak bulunur (Berridge 1998; Mattson ve ark. 2000). ER'un büyüme konilerinde ve sinaptik terminallerdeki lokal Ca^{+2} seviyelerini düzenlediği bilinmektedir (Mattson ve ark. 2000).

Mitokondri, canlılık ve apoptoz dışındaki bilinen etkileri yanısıra neurite oluşumunda da çok etkili bir organeldir. Mitokondri, neurite oluşumu, akson ve dendritik yapıların gelişimi ve sinaptik plastisite gibi temel süreçlerde önemli rol oynar. Mitokondrinin bu süreçlerdeki rolü ile ilgili olarak ortaya çıkan problemler birçok nörodejeneratif ve psikiyatrik hastalıkla ilişkilendirilmiştir (Mattson 2007). Mitokondri, nöronlarda akson terminallerinde, dendritlerde, neurite yapılarında, büyüme konilerinde, presinaptik ve postsinaptik terminallerde bulunmaktadır. Mitokondrinin bu bölümlere hareketi ve fonksiyonu Ca^{+2} iyonu miktarındaki değişiklikler ve nörotrofik faktörler gibi lokal sinyallerle düzenlenir. Öte yandan, neurite oluşumu ve uzamasında görev alan aktin filamentler, mikrotübüller, kinesin ve miyozinler gibi hücre iskeleti elemanları, iyon pompaları işlevlerini yerine getirmek için adenosin trifosfata (ATP) ihtiyaç duyarlar. Mitokondri tüm bu süreçler için de gerekli ATP'yi üretmekle sorumlu olan organeldir (Mattson 2007).

2.1.2. Nöronlarda Canlılığı Etkileyen Faktörlere Genel Bakış

Nöronal canlılık, hücresel strese yanıt olarak bozulabilen çok karmaşık ve birbiriyle etkileşim halindeki farklı sinyal yolları aracılığıyla sağlanır. Bu sinyal

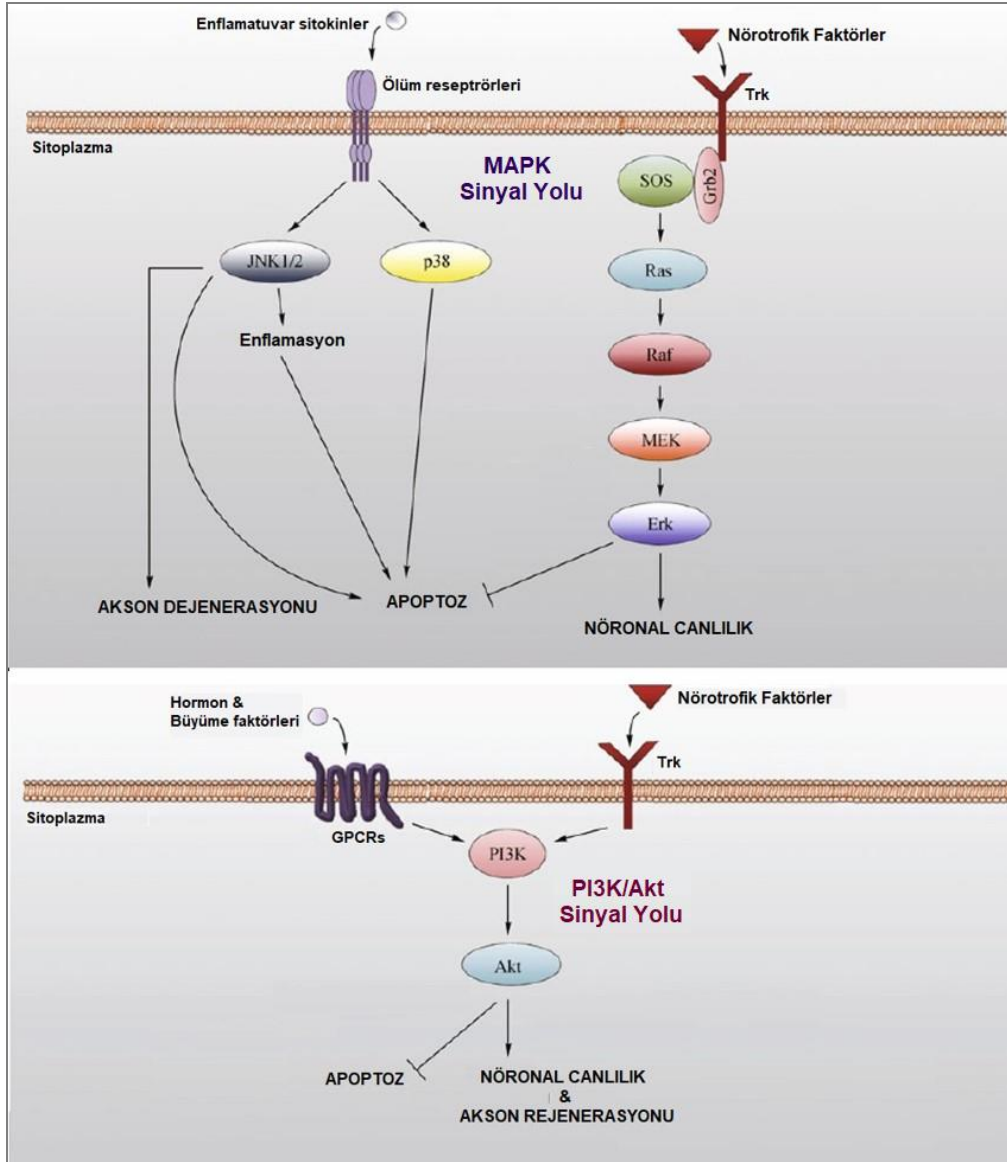
yollarının bir veya daha fazlasındaki bir değişim nöronun kaderini değiştirebilir. Nöronları etkileyen stresin şekli, süresi ve nöronun gelişimsel aşaması gibi çeşitli faktörler, farklı sinyal yollarını etkiler (Morrison ve ark. 2003). Sinir sisteminin normal gelişim süreci içerisinde sinaptik bağlantıların şekillendirilmesi, istenmeyen veya gereksiz görülen nöronların ortadan kaldırılması için apoptotik hücre ölümü ve nörotrofik faktörlerin sınırlandırılması gibi temel mekanizmalar devreye girer. Özellikle gelişim sürecindeki nöronlar canlılıklarını devam ettirebilmek için nörotrofik faktörlerin varlığına bağımlıdır. Olgunlaşmış nöronlarda ise nörotrofik desteğe olan ihtiyaç azalır ancak bu hücrelerin organizmanın yaşamı boyunca sağlıklı şekilde varlığını sürdürebilmesi için ölüm mekanizmalarının baskılanması gerekmektedir (Benn ve Woolf 2004). Bu nedenlerle, nörotrofik faktörler hem sinir sisteminin gelişimi boyunca hem de olgunlaşmış nöronlarda nöronal sağkalımı sürdüren vazgeçilmez moleküllerdir (Tovar-y-Romo ve ark. 2016).

Nörotrofik faktörler ile hücre içinde başlatılan iki temel sinyal yolu hem fizyolojik hem de patolojik şartlarda nöronal canlılığı ve ölümü düzenlemede kritik rol oynar. MAPK ve PI3K, nöronal büyüme, farklılaşma ve hayatta kalmada kritik rol oynayan serin / treonin protein kinazlardır (Morrison ve ark. 2003; Cui 2006; Walker ve ark. 2013). Şekil 2.3'te görüldüğü üzere, MAPK ailesinin ERK üyelerinin aktivasyonu ve PI3K/Akt sinyal yolağı hücre canlılığını desteklerken, MAPK ailesinin stresle aktive olan protein kinazlar (SAPKs) olarak da bilinen JNK ve p38 MAP kinaz (p38 MAPK) üyeleri ise hücre ölümünü uyarırlar (Morrison ve ark. 2003; Walker ve ark. 2013).

Sinir sisteminde nöronal ölümü tetikleyen uyarılar akut ya da kronik dejenerasyona yol açabilirler (Tovar-y-Romo ve Penagos-Puig 2016). İnme veya travmatik hasar gibi akut hasarlar, etkilenen bölgelerde fonksiyon kaybına yol açar. Hasarı takiben ilk olarak bu durumdan en çok zarar gören bölgedeki nöronlarda ölüm başlar ve bu dejeneratif süreç çevre dokuda bulunan nöronlara ulaşır. Uzamış dejenerasyon süreci; eksitotoksisite, hücre içi Ca^{+2} homeostasisindeki dengesizlikler, enerji metabolizmasındaki yetmezlik, nöroenflamasyon, oksidatif strese bağılı reaktif oksijen türü (ROS) artışı, ER stresi ve aksonal dejenerasyonu içeren bir dizi olayı (Şekil 2.4) kapsar (Tovar-y-Romo ve Penagos-Puig 2016).

Öte yandan alzheimer, parkinson, huntington, amiyotrofik lateral skleroz (ALS) gibi kronik hasarın görüldüğü nörodejeneratif hastalıklarda, çok daha uzun bir süreçte

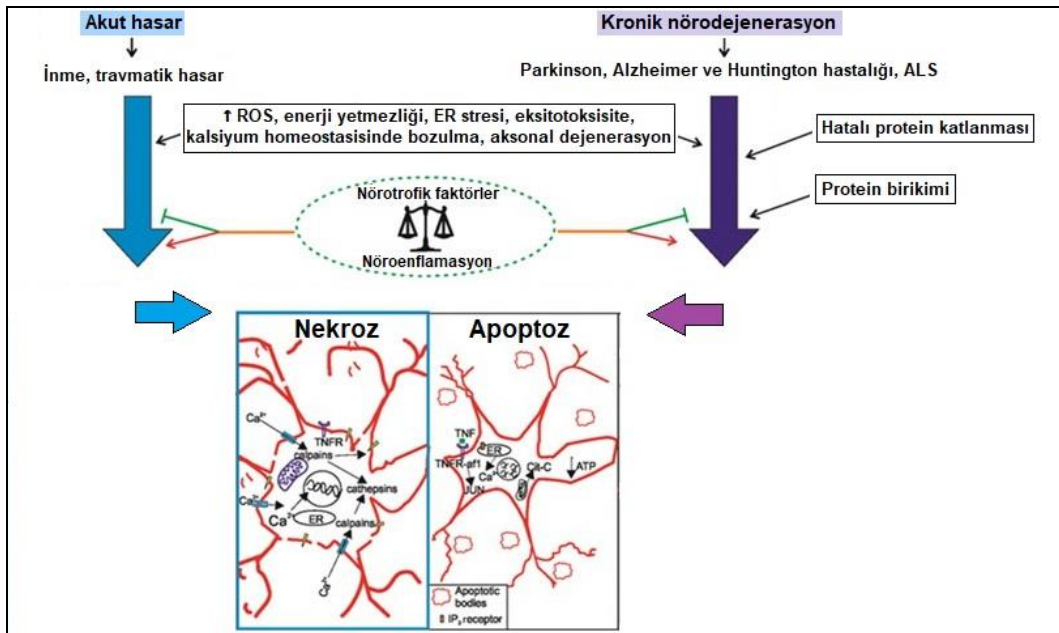
progresif nöron kaybı söz konusudur ve hatalı protein katlanması ya da protein birikimi gibi durumlar (Şekil 2.4) patolojik mekanizmayı oluşturan esas faktörlerdir (Tovar-y-Romo ve Penagos-Puig 2016).



Şekil 2-3: Nöronal canlılığı düzenleyen temel sinyal yolları. - Walker ve ark. (2013)'ten değiştirilerek.

Yukarıda belirtilen tüm nörodejeneratif süreçlerde, moleküler sinyaller hasarlı nöronların kaderini düzenler; ölüm uyarıcı sinyaller çok güçlü ise nöronal sağkalımı destekleyen faktörler hücre ölümünü durduramayabilir (Tovar-y-Romo ve Penagos-Puig 2016).

Olgunlaşmış nöronlarda hücre ölüm programlı hücre ölümü apoptoz ya da nekroz ile gerçekleşebilir (Benn ve Woolf 2004; Tovar-y-Romo ve Penagos-Puig 2016). Sinir sisteminin gelişimi sırasında, apoptotik hücre ölümü nöronal ağların oluşumu ve şekillendirilmesi için gerekli bir süreçtir. Olgunlaşmış nöronlar, fonksiyonel bağlantılara dahil olduğu için ölüme daha az duyarlıdır. Ancak canlılıklarını devam ettirebilmeleri için, çeşitli hücre streslere maruz kaldıklarında apoptotik sürecin aktive olmasını önlemek adına antiapoptotik faktörler devreye girer ve ölüm süreci baskılanır (Benn ve Woolf 2004; Tovar-y-Romo ve Penagos-Puig 2016).



Şekil 2-4: Akut ve kronik nörodejenerasyonda nöronal ölüme yol açan faktörler. - Tovar-y-Romo ve Penagos-Puig (2016)'dan değiştirilerek.

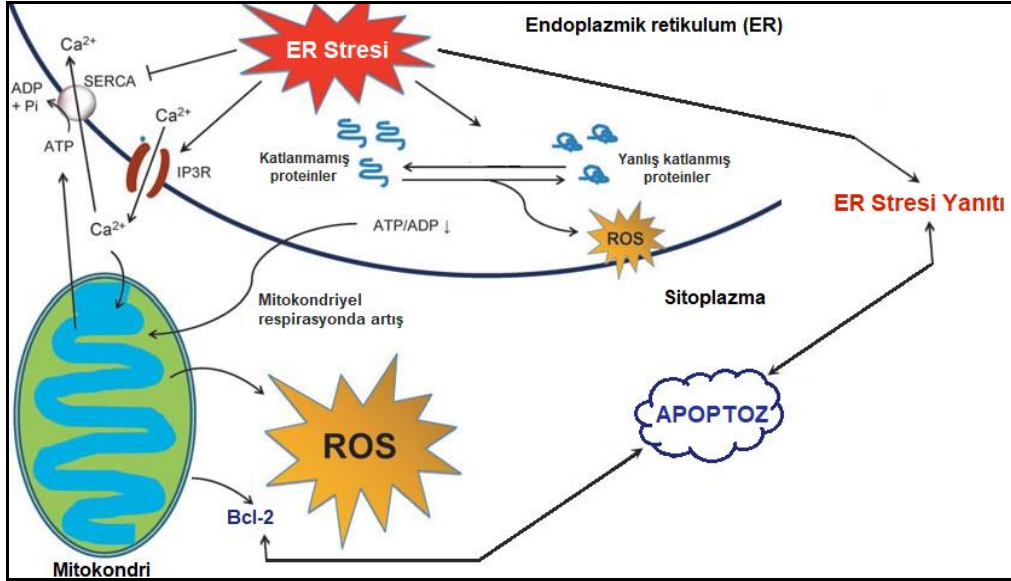
Sinir sisteminin gelişimi esnasında gerçekleşen fizyolojik apoptozun yanısıra, apoptoz patolojik olarak da gerçekleşebilir. Patolojik apoptoz, sağ kalım faktörlerinin, akut veya kronik olarak hücrede meydana gelen stres, hasar veya genetik anormalliklerle başa çıkmada yetersiz kaldığı durumlarda ortaya çıkar (Benn ve Woolf 2004). Apoptoz uzamış nörodejeneratif süreçlerde sıklıkla görülür. Programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptoz, uyarının türüne bağlı olarak ekstrinsik/ölüm reseptörleri yolu ile ya da intrinsik/mitokondriyel yol ile başlatılır. Ekstrinsik yol tümör nekrozis faktör reseptörü (TNFR) ailesinin, tümör nekrozis faktör reseptörü 1 (TNFR1) ve

apoptosis antijen 1 (APO1) diğeri adı ile FAS reseptörlerinin, tümör nekrozis faktör α (TNF α) ve FAS ligand (FASL) ile uyarılması ile başlar. Bu yol özellikle alzheimer, huntington, parkinson hastalıkları, ALS ve prion hastalığı gibi nörodejeneratif süreçlerde görülen nöroenflamasyonda ayrıca travma ve inmede görülen akut hasarlarla uyarılır (Benn ve Woolf 2004; Tovar-y-Romo ve Penagos-Puig 2016). İnterinsik yol ise mitokondriyel hasar sonrası mitokondriyel permeabilitenin bozularak apoptotik sitokrom c gibi proteinlerin sitozole salınımı ile başlar. Mitokondriyel hasar, iskemi, oksidatif stres, eksitotoksisite, artmış hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu ve iyonize radyasyon da dahil olmak üzere çeşitli uyanlarla tetiklenebilir. Kronik nörodejeneratif bozukluklarda, mitokondri için zararlı sinyaller olan ROS, nitrik oksit (NO), glutamat, toksik proteinler ve lipitler de apoptozu uyarır (Benn ve Woolf 2004; Tovar-y-Romo ve Penagos-Puig 2016). Apoptoz ile hücre ölümünün kararı B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) protein ailesinin antiapoptotik ve proapoptotik üyeleri tarafından kontrol edilir. Apoptozda her iki yolun uyarılması sonuçta kaspaz enzimlerinin aktive olmasına yol açar, hücre büzülür ve membranda blebler olarak tanımlanan kabarcıklar meydana gelir, kromatin kondanse olur, deoksiribonükleik asitte (DNA) fragmentasyon meydana gelir ve hücre membranla kaplı küçük apoptotik cisimler halinde paketlenir. Apoptotik cisimcikler daha sonra mikroglialar tarafından fagositoz ile ortadan kaldırılır (Benn ve Woolf 2004; Tovar-y-Romo ve Penagos-Puig 2016).

Olgun nöronlarda hücre ölümü apoptoz dışında nekroz ile de gerçekleşir. Nekrotik ölüm, fiziksel hasar, enerji tükenmesi, toksik uyarılar, hipoksi ve iskemi gibi dış uyanlar sonucunda oluşur. Nekroz şiddetli stresin olduğu koşullarda ve genellikle akut hasar uyarılarının ardından gerçekleşir (Benn ve Woolf 2004). Tipik olarak iskemi, hipoksi, inme ve santral sinir sistemi hasarında görülmesinin yanısıra, multipl skleroz (MS), ALS, alzheimer hastalığı, astrositoz ve reaktif gliozisde de ortaya çıkar (Benn ve Woolf 2004). İnteraselüler Ca^{+2} konsantrasyonundaki değişiklik nekrozu tetikleyen temel uyarandır. İyon kanallarının aktivasyonu ile ekstraselüler ortamdan hücre içine başlayan Ca^{+2} akışı ve bunu takiben ER ve mitokondri gibi intraselüler depolardan sitozole Ca^{+2} salınımındaki artış nekrozu tetikler. Ca^{+2} homeostasisinde görülen bu dengesizlik eksitotoksisitenin de temel faktörüdür. Nekrotik ölümden, hücre içine aşırı miktarda gerçekleşen Ca^{+2} girişi kalpain ve katepsin enzimlerinin aktive olmasına yol açar, hücre iskeleti proteinleri, membran reseptörleri ve taşıyıcılar yıkılır, membran bütünlüğü bozulur, organeller ve hücre şişerek rüptüre olur ve hücre içeriği çevre dokuya yayılır.

Nekroz enflamatuvar yanıtlara yol açar. Nekroz sırasında meydana gelen enflamatuvar yanıt reaktif astrositleri ve mikrogliaları içerir (Benn ve Woolf 2004; Tovar-y-Romo ve Penagos-Puig 2016). Apoptoz ve nekroz farklı sinyal yolları içermesine rağmen, aynı uyarılar uyarının yoğunluğuna, etkilediği nöronal alt popülasyona ve hücrenin olgunlaşma basamağına bağlı olarak apoptoza veya nekroza yol açabilir (Benn ve Woolf 2004; Tovar-y-Romo ve Penagos-Puig 2016).

ER stresi ile uyarılan nöronal ölüm son yıllarda önem kazanmıştır. ER stresi, ER lümenindeki Ca^{+2} miktarının azalması, ER'da yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi, oksidatif stres, iskemi ve kimyasal toksinlerin etkisi ile tetiklenen bir süreçtir (Benn ve Woolf 2004). ER stresine yanıt olarak gelişen ER stresi yanıtı, ER şaperonları gibi spesifik proteinlerin ifadelerini değiştirir, yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinlerin yıkılmasını artırır ve hatalı proteinlerin birikimini azaltmak için protein sentezini inhibe eder. Bununla birlikte, uzun süren ve ağır ER stresi sonucunda ER'un işlevi ciddi şekilde bozulursa, apoptotik hücre ölümüne yol açan hücresel sinyaller aktive edilir (Lindholm ve ark. 2006). Şekil 2.5'te görüldüğü gibi, ER stresi esnasında ER'dan çıkan Ca^{+2} mitokondriye giriş yapar ve mitokondride aşırı Ca^{+2} birikimine neden olur. Bu durum da mitokondriyel membran depolarizasyonu sonucu apoptotik proteinlerin sitozole salınmasına yol açar (Benn ve Woolf 2004). Ayrıca, hücrede herhangi bir sebeple meydana gelen ROS artışı doğrudan ER stresini uyarır ve ROS üretimi artar. Mitokondri, ER stresinde ROS üretimi için önemli bir kaynaktır (Cao ve Kaufman 2014).



Şekil 2-5: ER stresi yanıtı ve mitokondrinin nöronal hücre ölümündeki rolü. - Cao ve Kaufman (2014)'ten.

Nöronlar, yanlış katlanmış proteinlerin toksik etkilerine karşı oldukça hassastırlar. Bu nedenle alzheimer, huntington, parkinson ve prion hastalığı gibi yanlış katlanmış protein patolojisinin görüldüğü hastalıklarda ER stres kaynaklı apoptozun hücre ölümünde önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir (Benn ve Woolf 2004; Lindholm ve ark. 2006).

2.2. Sigma-1 Reseptörü

Sigma-1 reseptörü (Sig-1R), ER'da yerleşim gösteren, nöronal canlılık, farklılaşma, plastisite ve nöroprotektif süreçlerde önemli rol oynayan bir reseptördür (Hayashi ve Su 2007; Kourich ve ark. 2012; Luedtke ve ark. 2012; Nguyen ve ark. 2014a). Sig-1R hücresel canlılığı ve fonksiyonları modüle edebilme özelliğinin keşfedilmesiyle son yıllarda dikkat çekmiştir (Nguyen ve ark. 2014a). Sig-1R, başta iskemi, alzheimer hastalığı, ALS, parkinson hastalığı, huntington hastalığı, retinal dejenerasyon, nöropatik ağrı, depresyon, şizofreni, obsesif kompulsif bozukluk gibi birçok nörodejeneratif ve nöropsikiyatrik hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Bu özelliklerinden dolayı Sig-1R ve onun selektif ligandları klinik açıdan son yıllarda büyük önem kazanmıştır (Ishikawa ve Hashimoto 2010; Kourich ve ark. 2012; Nguyen ve ark. 2014a; 2014b; 2017; Hashimoto 2015; Su ve ark. 2016a).

2.2.1. Sig-1R'nün Keşfi

Sigma reseptörü ailesine ait olan Sig-1R, ilk olarak 1970'lerde yanlılıkla bir opioid reseptörü alt tipi olarak tanımlanmıştır (Martin ve ark. 1976). Daha sonra yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular ise sigma reseptörlerinin klasik opioid reseptörlerinden farklı olduğunu ortaya koymuştur. Çok daha selektif radyoligandların kullanılması ile yapılan çalışmalarla reseptörün özellikleri ve ligand bağlayıcı bölgeleri tanımlanmıştır. Sigma reseptörleri için spesifik bağlanma yerlerinin varlığı ilk olarak, Su (1982) tarafından yürütülen öncü bir çalışma ile gösterilmiştir ve sigma reseptörlerinin opioid reseptörlerden farklı bir reseptör grubu olduğu keşfedilmiştir. 1970'lerde yanlılıkla bir opioid reseptörü alt tipi olarak tanımlanan sigma reseptörleri, günümüzde herhangi bir reseptör grubunda yer almayan, iyonotropik reseptörler ve G proteini ile eşleşen reseptörlerden (GPCRs) çok farklı ve benzersiz, non-opioid bir protein sınıfı olarak kabul görmektedir (Hayashi ve Su 2007; 2008; Su ve ark. 2010; Nguyen ve ark. 2014a).

Devam eden çalışmalar sonucunda, sigma reseptörlerinin Sig-1R ve sigma-2 reseptörü (Sig-2R) olmak üzere iki alt tipi olduğu gösterilmiştir (Hayashi ve Su 2008; Su ve ark. 2010; Kourich ve ark. 2012; Su ve ark. 2016a). Sig-1R, 1996 yılında gine domuzu karaciğerinden elde edilen örneklerden klonlanmış ve moleküler konformasyonu açığa kavuşturulmuştur (Hanner ve ark. 1996). Daha sonraki yıllarda sıçan, fare gibi başka memelilerden ve insandan elde edilen örneklerden de klonlama çalışmaları yapılmıştır. Sig-2R ise günümüzde halen klonlanmamıştır ve hücre ölümünde rol oynaması dışında hücresel fonksiyonu hakkında henüz başka bir bilgi yoktur (Hayashi ve Su 2008; Su ve ark. 2010; Kourich ve ark. 2012; Su ve ark. 2016a).

2007 yılı ise Sig-1R araştırmaları için önemli bir dönüm noktası olmuştur. Hayashi ve Su (2007), yaptıkları çalışmaların sonucunda Sig-1R'nün fizyolojik etkilerini açıklayan yeni bir konsept öne sürmüşlerdir, bu konsept "şaperon reseptör" konseptidir. Şaperon moleküller, bakteri, bitki ve hayvan hücrelerinde protein-protein etkileşimleri üzerinden proteinlerin fonksiyonlarını etkileyen ve hücresel işlevleri düzenleyen moleküllerdir. Son yıllarda, ER ve mitokondri arasındaki iletişimi düzenleyen, hücrelerdeki biyoenerjetik süreçlerde, hücre canlılığı ve ölüm mekanizmalarında rol oynayan, hücreleri fizyolojik ve patolojik streslerden koruyan birçok şaperon protein tanımlanmıştır (Oyung ve Giffard 2012). Bu şaperonlardan biri

de Sig-1R'dür (Hayashi ve Su 2007; Kourrich ve ark. 2012; Oyuang ve Giffard 2012; Kimura ve ark. 2014; Schäfer ve ark. 2014).

2.2.2. Sig-1R'nün Yapısı ve Genel Özellikleri

Sig-1R, 223 amino asit içeren 25kDa ağırlığında küçük bir integral membran proteindir (Ishikawa ve Hashimoto 2010; Su ve ark. 2010; Kourich ve ark. 2012; Nguyen ve ark. 2014a). Sig-1R farklı memeli türlerinden klonlanarak incelenmiştir. Reseptör insan, fare, sıçan, kobay, hamster, fare gibi memeliler arasında yüksek oranda korunmuştur ve %90 aynı %95 benzer aminoasit dizileri içermektedir. Sig-1R reseptörünün aminoasit sekansı maya C8-C7 sterol izomerazinki ile de %30 özdeşliğe sahiptir ancak sterol izomeraz aktivitesine sahip değildir. Memeli C8-C7 sterol izomerazı da dahil olmak üzere Sig-1R bilinen hiçbir memeli proteini ile sekans homolojisi taşımamaktadır ve bu özelliği ile oldukça dikkat çekmektedir (Hanner ve ark. 1996; Hayashi ve Su 2008; Su ve ark. 2010).

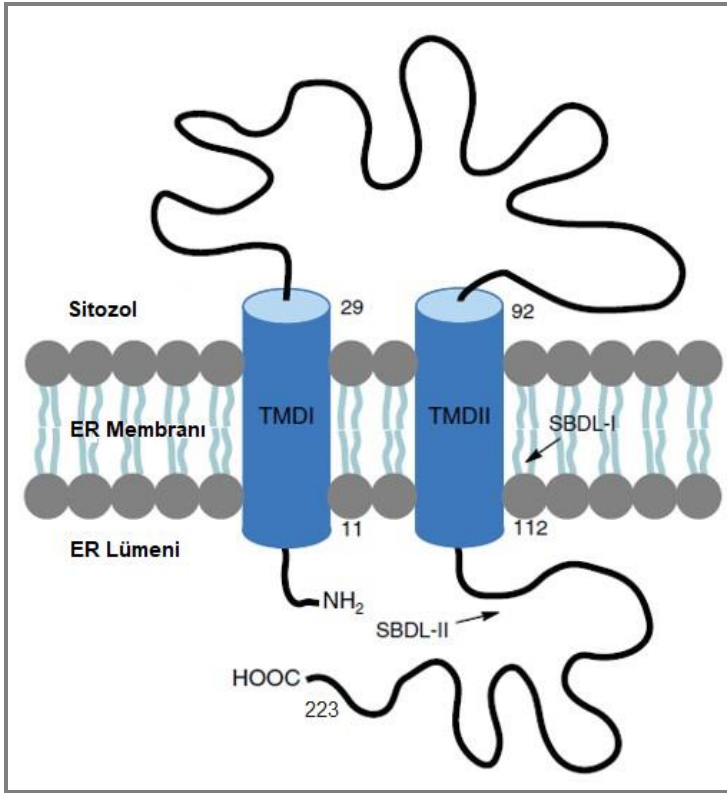
Sig-1R, ER'da yerleşim göstermektedir. ER'da ise ER ile mitokondri arasındaki iletişimin sağlandığı yakın temas bölgeleri olan "mitokondri ile ilişkili membran"da (MAM) (Oyuang ve Giffard 2012) bulunmaktadır (Hayashi ve Su 2003a; 2003b; 2007; Hayashi ve Su 2008; Ishikawa ve Hashimoto 2010; Su ve ark. 2010; Hayashi 2015). MAM, ER ile mitokondri arasındaki Ca^{+2} sinyali, hücrel redoks seviyesi, biyoenerjetik sistem, lipid metabolizması, hücrel canlılık ve hücre ölümü gibi önemli süreçlerin düzenlendiği, özelleşmiş ER membranı bölümüdür. MAM'ın temel fonksiyonunun ER ile mitokondri arasındaki Ca^{+2} sinyalini kontrol etmek olduğu ve bu fonksiyonun normal ve patofizyolojik koşullarda birçok önemli hücrel fonksiyonu etkilediği son yıllarda gösterilmiştir ve bu sürecin nasıl düzenlendiği büyük bir ilgi odağı olmuştur (Hayashi ve ark. 2009; Fujimoto ve Hayashi 2011; Oyuang ve Giffard 2012; Hayashi 2015; Yasui ve Su 2016).

Sig-1R, MAM'da özellikle seramid ve kolesterolden zengin mikro alanlarda yerleşim gösterir (Hayashi ve Su 2003a; 2003b; Hayashi ve Fujimoto 2010; Su ve ark. 2010; Yasui ve Su 2016) ve MAM'da başka bir şaperon protein olan glukozla ilişkili protein 78/immünoglobulin bağlayıcı protein (GRP78/BiP) ile kompleks halinde bulunur. GRP78/BiP ile bağlı iken Sig-1R inaktif durumdadır (Hayashi ve Su 2007; 2008; Ishikawa ve Hashimoto 2010; Su ve ark. 2010; Hashimoto 2015; Ruscher ve Wieloch 2015). Sig-1R MAM'da, ER ve mitokondri arasındaki Ca^{+2} akışı, ROS üretimi,

apoptotik hücre ölümü ve nöronlarda dendritik dikenlerin oluşumu süreçlerini kontrol eder (Su ve ark. 2010; Hayashi 2015). Sig-1R, ağırlıklı olarak MAM'da bulunmakla birlikte hücre içinde dinamik olarak yer değiştirebilmektedir (Hayashi ve Su 2003a; 2003b; 2007; Hayashi ve Su 2008; Ishikawa ve Hashimoto 2010; Su ve ark. 2010; Hayashi 2015). Reseptörün ligand ile uyarılması veya uzun süreli hücresel stres durumunda Sig-1R, GRP78/BiP'ten ve MAM'dan ayrılarak hücrenin farklı bölgelerine ve plazma membranına transloke olabilmekte ve aktive olan reseptör çeşitli proteinlerin, iyon kanallarının, reseptörlerin ve kinazların fonksiyonlarını düzenleyebilmektedir (Hayashi ve Su 2003a; 2003b; 2007; 2008; 2010; Mavlyutov ve Ruoho 2007; Hayashi ve Fujimoto 2010; Su ve ark. 2010). Deneysel ve biyoinformatik çalışmalar, Sig-1R'nün MAM'dan ayrılarak hücre membranı dışında nukleus membranı ve sitozole de transloke olduğunu, ekstraselüler sıvıya geçiş yapabildiğini ve bu bölgelerde de farklı proteinlerle etkileşime girerek hücresel fonksiyonları düzenleyebildiğini göstermiştir (Su ve ark. 2010; Mavlyutov ve ark. 2015; Tsai ve ark. 2015; Su ve ark. 2016a). Tüm bu verilere rağmen Sig-1R'nün hücre içindeki translokasyonunu hangi faktörlerin uyardığı ve bu yer değiştirmenin nasıl gerçekleştiği tam olarak netleştirilememiştir. Çalışmalardan elde edilen son bulgulara göre lipidden zengin mikro alanların reseptörün yer değiştirmesinde rol oynadığı öne sürülmüş ve ER'da bu alanlardaki kolesterol miktarının düşürülmesi veya seramid sentezinin inhibe edilmesinin Sig-1R'nün MAM'dan ayrılmasına yol açtığı bildirilmiştir (Hayashi ve Fujimoto 2010; Su ve ark. 2010).

Şekil 2.6'da görüldüğü üzere, Sig-1R, kısa bir N ucuna ve ER lümenine bakan uzun bir C ucuna sahiptir. Reseptörün, N ucunda ve proteinin merkezinde iki adet transmembran bölgesi (TMD) bulunur. TMDI ve TMDII sırasıyla aminoasit 11-29 ve aminoasit 92-112 arasında bulunmaktadır. Reseptörün sitozolik kısmı ise aminoasit 29-92 arasında yer alır. Uzun C ucu ER membranına bağlıdır. Sig-1R'nün şaperon aktivitesi, amino asit 116'dan amino asit 223'e kadar uzanan uzun C ucunda gerçekleşir (Seth ve ark. 2001; Chen ve ark. 2007; Hayashi ve Su 2007; 2008; Kourich ve ark. 2012; Ortega-Roldan 2013; Hayashi 2015; Manohar ve ark. 2015). Sig-1R polipeptidinin kolesterol ve diğer lipid türlerini bağlayabilen iki adet steroid bağlayıcı bölgesi (SBDL) de bulunmaktadır. Çalışmalardan elde edilen veriler reseptörün C ucunda spesifik olarak sterol bağlayan hidrofobik bir bölge bulunduğunu da ileri sürmektedir (Hayashi ve Su 2008; Ishikawa ve Hashimoto 2010; Hayashi 2015;

Ruscher ve Wieloch 2015). Reseptörün TMDI, TMDII, SBDL-I, SBDL-II bölgeleri ve C ucu ligand bağlayan başlıca bölgeleridir (Su ve ark. 2010; Manohar ve ark. 2015). Tüm bu bilgiler reseptörün çeşitli hidrofobik bileşikler, steroidler veya ilaçlar gibi çok çeşitli ligandlar için benzersiz afinitesini açıklamaktadır (Hayashi ve Su 2008).



Şekil 2-6: Sig-1R'nün yapısı. - Manohar ve ark. (2015)'ten.

Sig-1R'ne bağlanan bileşikler çok çeşitlidir, bunlardan en bilinenleri; benzomorfanlar (SKF-10047, pentazosin, dekstrometorfan), antipsikotikler (haloperidol), antidepresanlar (fluvoxamine), steroidler (progesteron, dehidroepiandrosteron-sülfat (DHEA-S)) ve halusinojen (metamfetamin, kokain, DMT) moleküllerdir. Ayrıca, antihistaminikler (klorfeniramin), nuklear hormon reseptör ligandları (tamoxifen), kalsiyum kanal antagonistleri (verapamil, emopamil), antifungal ajanlar (fenpropimorf, tridemorf) da Sig-1R'ne bağlanabilmektedir (Hayashi ve Su 2008; Ishikawa ve Hashimoto 2010; Su ve ark. 2010; Hayashi 2015). Sig-1R endojen ligandlarının progesteron, pregnenolon, DHEA-S gibi nörosteroidler ve N,N-

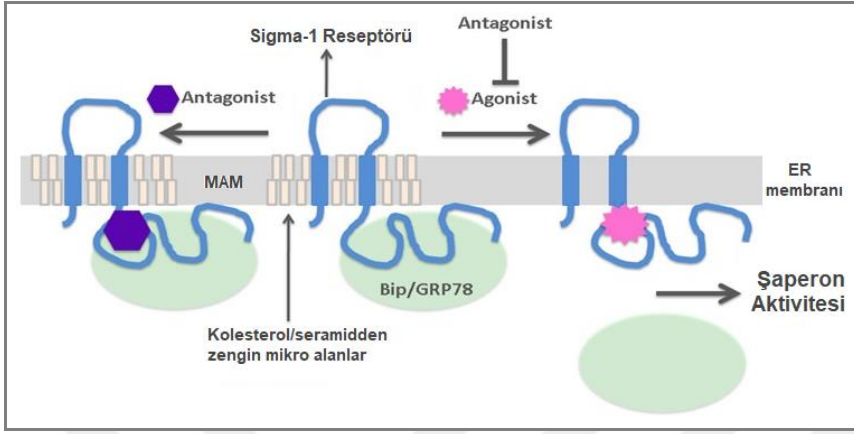
dimetiltriptamin (DMT) olduğu bilinmektedir (Fontanilla ve ark. 2009; Luedtke ve ark. 2012; Frecska ve ark. 2013). Sig-1R'nün bilinen ligandları Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2-1: Sig-1R'nün ligandları. - Hayashi ve Su (2008) ve Hayashi (2015)'ten değiştirilerek.

Sigma-1 reseptörü ligandları	Agonist/Antagonist
<u>Sentetik ligandlar</u>	
*SA4503 (Kutamesin)	Selektif agonist
*JO1784 (İgmesin)	Selektif agonist
*OPC-14523	Non-selektif agonist
4-fenil-1-(4-fenilbutil)piperidin (PPBP)	Agonist
(+)Pentazosin (Benzomorfan)	Prototipik selektif agonist
PRE-084	Selektif agonist
(+)-SKF10047 (Benzomorfan)	Non-selektif agonist
Ditolylguanidine (DTG)	Non-selektif agonist
*NE-100	Selektif antagonist
*BMY14802	Antagonist
*Rimkazol	Düşük afiniteli antagonist
BD-1047	Prototipik antagonist
BD 1063	Prototipik antagonist
*Panamesin	Antagonist
BD-1088	Antagonist
<u>Endojen ligandlar</u>	
DHEA-S (Nörosteroid)	Agonist
Progesteron (Nörosteroid)	Antagonist
Pregnenolon (Nörosteroid)	Agonist
D-eritro-sfingosin (Endojen sfingolipid)	?
N,N-dimetiltriptamin (DMT) (Endogenous halusinojen)	Agonist
<u>Klinikte kullanılan ve Sigma-1 reseptörüne afinitesi olan ilaçlar</u>	
Afobazole (Anksiyolitik)	Agonist
Dextromethorphan	Agonist
Donepezil (Asetilkolin esteraz inhibitörü)	Agonist
Fluvoxamine (Antidepresan)	Agonist
Sertraline (Antidepresan)	Antagonist
Haloperidol (Antipsikotik)	Antagonist
Fluoxetine (Antidepresan)	Agonist
Imipramine (Antidepresan)	Agonist
<i>* Klinik çalışmalara dahil edilen/edilmesi düşünülen bileşikler</i>	
<i>? Agonis/antagonist etkisi henüz bilinmeyen bileşik</i>	

Sig-1R için hangi ligandın agonist hangi ligandın antagonist etki gösterdiği ile ilgili olarak birçok çalışma yapılmıştır. Sig-1R'nün ER'da şaperon molekül BiP/GRP78 ile bağlanmasından yola çıkılarak Sig-1R ile BiP/GRP78'in birbirinden ayrılmasına yol açan böylece reseptörün aktive olmasına ve şaperon molekül olarak fonksiyon göstermesine olanak sağlayan ligandlar agonist olarak, bu disosiyasyonu ve reseptörün

aktivasyonunu engelleyen moleküller ise antagonist olarak (Şekil 2.7) tanımlanmışlardır (Ishikawa ve Hashimoto 2010; Su ve ark. 2010; Yasui ve Su 2016).



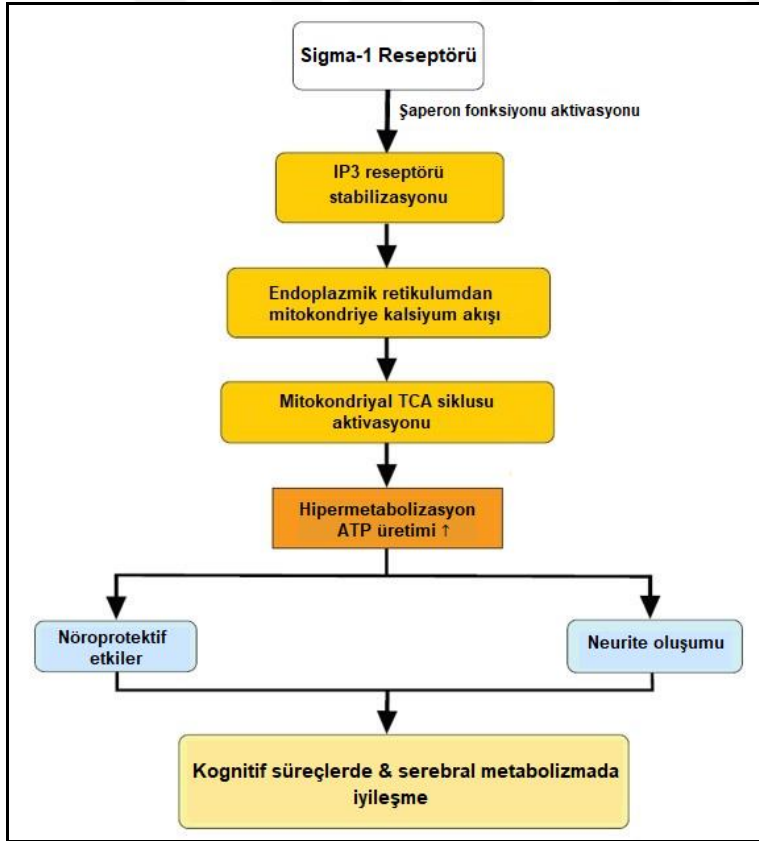
Şekil 2-7: Sig-1R agonist ve antagonistlerinin etki mekanizması. - Yasui ve Su (2016)'dan.

2.2.3. Sig-1R'nün Moleküler ve Hücresel Fonksiyonları

Sig-1R, periferik dokularda ve santral sinir sisteminde yaygın olarak bulunmaktadır ve beyin, karaciğer, pankreas, dalak, kalp ve adrenal bezi de içeren birçok organda ifade edilmektedir. Sig-1R'nün, en yüksek oranda ifade edildiği organ ise beyindir (Hayashi ve Su 2008; Kourich ve ark. 2012; Luedtke ve ark. 2012; Nguyen ve ark. 2014a; Hayashi 2015). Sig-1R merkezi sinir sisteminde nöronlarda, astrositlerde, oligodendrositlerde ve mikroglialarda bulunmaktadır (Ruscher ve Wieloch 2015). Sig-1R'nün farklı organlardaki bu geniş dağılımı, reseptörün temel bir rolü olduğunu göstermektedir (Hayashi ve Su 2008).

Hayashi ve Su (2007) yaptıkları çalışmalar sonucunda, sigma-1 reseptörlerinin hücrelerdeki fizyolojik etkilerini açıklamak için "reseptör şaperon"u konseptini önermişlerdir ve bu keşifleri reseptörün etki mekanizması ile ilgili önemli bir dönüm noktası olmuştur. Şaperon konseptine göre Sig-1R'nün genel etki mekanizması (Şekil 2.8) şu şekildedir; normal fizyolojik şartlarda Sig-1R ER'da başka bir moleküler şaperon olan BiP/GRP78 ile bir kompleks oluşturur. BiP/GRP78 ile bu kompleksi oluşturduğunda Sig-1R'nün aktivasyonu inhibe edilmiş olur. ER stresi ya da ER'da Ca^{+2} miktarının azalmasına neden olan herhangi bir stres durumu, Sig-1R'nün BiP/GRP78 kompleksinden ayrılmasına yol açar, böylece Sig-1R aktif bir şaperon molekül haline

gelir. Aktive olan Sig-1R, IP3R'ne bağlanır. IP3R, stabil olmayan proteinlerdir ve hücre içinde proteozomlar tarafından kolaylıkla degrade edilirler, ancak Sig-1R'nün bağlanması ile stabil hale gelirler ve yıkımdan kurtulurlar. IP3R stabilizasyonu sonucunda Ca^{+2} iyonları ER'dan mitokondriye akmaya başlar. Mitokondri içine doğru gerçekleşen bu Ca^{+2} akışı mitokondrideki dehidrogenazları aktive ederek intramitokondriyel trikarboksilik asit siklusunu (TCA) aktive eder. TCA siklusunun aktive olması ise hücre içinde hipermetabolizasyonu başlatır, bu süreç de neurit oluşumu, uzaması ve nöroprotektif etkiler ile sonuçlanır. Bu nedenle Sig-1R'nün, hücre içindeki biyoenerji sisteminin ve ATP üretiminin düzenleyicisi olarak görev aldığı kabul edilmektedir (Hayashi ve Su 2007; Hayashi ve ark. 2009; Ishikawa ve Hashimoto 2010; Fujimoto ve Hayashi 2011; Hayashi 2015).



Şekil 2-8: Şaperon reseptör olarak Sig-1R'nün genel etki mekanizması. - Ishikawa ve Hashimoto (2010)'dan.

Sig-1R'nün hücrel fonksiyonları ile ilgili daha sonra yapılan çalışmalar, Sig-1R'nün ER ile mitokondri arasındaki Ca^{+2} akışını ve ATP üretimini düzenleme etkisi dışında, hücre içi sinyal iletimini, ER stresini, hücrel redoks seviyelerini, hücrelerin yaşamsal süreçlerini ve sinaptogenez gibi birçok fizyolojik süreci regüle eden bir moleküler şaperon olduğunu göstermiştir. (Su ve ark. 2010; Hayashi ve ark. 2011; Luedtke ve ark. 2012; Hayashi 2015). Sig-1R, MAM'da IP3R stabilitesini ve dolayısıyla ER ve mitokondri arasındaki Ca^{+2} sinyalini düzenlemenin yanısıra ROS seviyesini de düzenler. Sig-1R'leri ER'da ROS üretimini azaltır ve NFkB sinyali üzerinden nukleusta antiapoptotik Bcl-2 geninin transkripsiyonunun artmasına neden olur ve apoptotik hücre ölümüne karşı koruyucu bir rol oynar (Meunier ve Hayashi 2010; Su ve ark. 2010; Hayashi 2015). Öte yandan, mitokondriyel bütünlüğün korunmasını sağlayarak, nöronlarda dendritik dikenlerin oluşumundan ve dallanmasından sorumlu olan Rac-Guanozin trifosfat (Rac-GTP) molekülünün yıkımına neden olan apoptotik protein sitokrom c'nin mitokondriden sitozole salınımını engeller, böylece Rac-GTP seviyesini artırır ve nöronlarda dendritik dikenlerin oluşumunu regüle eder (Tsai ve ark. 2009; Su ve ark. 2010).

Sig-1R'nün canlılık üzerindeki etkileri incelendiğinde, MAM'da hücrel canlılığı özet olarak 3 temel yol üzerinden desteklediği görülmektedir. İlk olarak Sig-1R, IP3R üzerindeki şaperon etkisi ile IP3R'lerini degradasyondan korur ve ER-mitokondri arasındaki Ca^{+2} sinyalinin devamlılığını sağlar ve bu yolla mitokondrideki ATP üretimini kolaylaştırır (Hayashi ve Su 2007; Tagashira ve ark. 2014; Hayashi 2015; Su ve ark. 2016a). İkinci olarak Sig-1R, ER'da yer alan bir ER stres proteini olan inositol gerektiren enzim 1'i (IRE1) de şaperon etkisiyle stabilize eder ve ER stresi ile ilgili sinyallerin nukleusa iletilmesini sağlar. Böylece ER-nukleus arasındaki antioksidan kapasiteyi artırıcı sinyalleri güçlendirir. Sig-1R'nün IRE1 ile oluşturduğu kompleks ayrıca mitokondrideki ROS üretimini de kontrol eder. Böylece antistres ve antioksidan proteinlerin ve enzimlerin üretimi artırılır. Son olarak Sig-1R, antioksidan genlerin ifade edilmesini kontrol eden bir transkripsiyon faktörü olan nukleer faktör-eritroid 2 ile ilişkili faktör 2'nin (Nrf2) sinyalini güçlendirerek antioksidan enzimlerin üretimini artırır, ROS üretimini ve hücre içinde birikimini azaltır, serbest radikal hasarını baskılar. Nrf2 nukleusta yer alan antioksidan yanıt elementlerine (ARE) bağlanan ve antioksidan enzim genlerinin ifade edilmesini düzenleyen bir

transkripsiyon faktörüdür (Pal ve ark. 2012; Mori ve ark. 2013; Hayashi 2015; Wang ve ark. 2015; Su ve ark. 2016a).

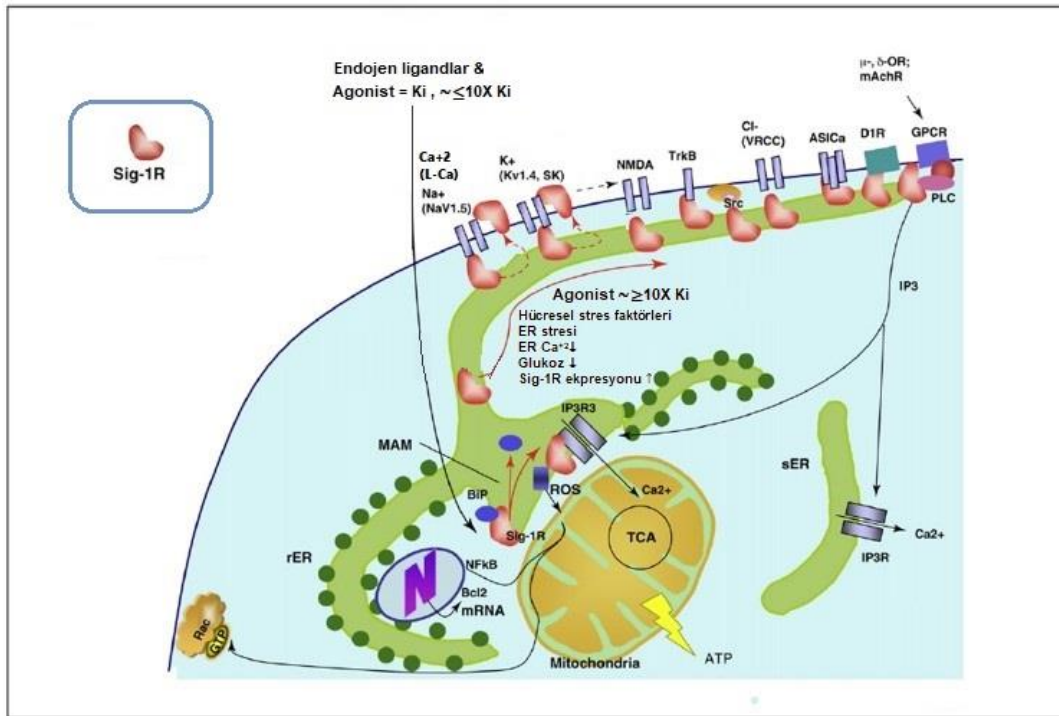
Şekil 2.9'da görüldüğü gibi, reseptörün ligand ile uyarılması ve hücrel stresin yanı sıra glukoz yoksunluğu, ER'daki Ca^{+2} miktarının azalması gibi stresli koşullar ve reseptörün hücrelerde fazla miktarda bulunması Sig-1R'nün MAM'dan ayrılarak başka bölgelere hareketine neden olmaktadır (Hayashi ve Su 2007; Su ve ark. 2010). Sig-1R'leri, agonistlerinin düşük dozları ile yani yaklaşık olarak afinite değerlerine (K_i) eşit ya da K_i değerlerinin 10 katından daha az dozlarında uyarıldıklarında reseptör BiP proteininden ayrılır ve IP3R'leri ile etkileşime girerek (Şekil 2.9) ER'dan mitokondriye Ca^{+2} akışını düzenler (Hayashi ve Su 2007; Pabba 2013). Ancak Sig-1R'leri, agonistlerinin yüksek dozları yani K_i değerlerinin yaklaşık 10 katından daha yüksek dozları ile uyarılırsa ya da ER stresi, hücrel stres gibi faktörler ile aktive olursa Sig-1R MAM'dan ayrılarak hücrenin başta hücre membranı olmak üzere farklı bölgelerine transloke olur (Şekil 2.9) ve bu bölgelerde protein-protein etkileşimi üzerinden farklı hücrel komponentlerin aktivitelerini bir şaperon molekül olarak düzenler (Hayashi ve Su 2007; Su ve ark. 2010; Pabba 2013).

Sig-1R, membranda voltaj kapılı iyon kanalları (VGICs), N-metil-D-aspartat reseptörleri (NMDAR), dopamin D1 reseptörü (D1R), muskarinik ve nikotinik asetilkolin reseptörleri, tirozin kinaz B reseptörü (TrkB), IP3R gibi çeşitli reseptör, kanal proteinleri ve kinazlarla etkileşime girer (Hayashi ve Su 2003a; 2010; Su ve ark. 2010; Kourrich ve ark. 2012; Su ve ark. 2016a). Sig-1R voltaj kapılı potasyum (K^+), Ca^{+2} , sodyum (Na^+) ve klor (Cl^-) kanallarını regüle edebilmekte, voltaj kapılı iyon kanalları dışında IP3R, asit algılayıcı iyon kanalı 1 a (ASIC1a) gibi Ca^{+2} kanallarını, NMDAR, DR1 ve TrkB reseptörlerini de fiziksel etkileşime girerek kontrol edebilmektedir. Öte yandan Sig-1R, G proteinleri ile direkt bir etkileşime girmediği düşünülmekle birlikte son çalışmalarda reseptörün G proteini ile eşleşen reseptörlerden (GPCRs) mu opioid reseptörü (μ -OR) ve muskarinik asetilkolin reseptörü (mAChR) ile fonksiyonel ve fiziksel bir etkileşime girdiği ve bu reseptörleri de aktive ettiği (Şekil 2.9) gösterilmiştir (Su ve ark. 2010; Kourrich ve ark. 2012; Su ve ark. 2016a).

Sig-1R'nün K^+ ve Ca^{+2} kanalları üzerindeki etkisi bu iyon kanallarını inhibe etme ya da kanalların aktivitelerini güçlendirme şeklinde çift yönlüdür. Sig-1R'nün Na^+ kanalları ile etkileşime girmesi ise bu kanalların inhibisyonuna yol açar (Kourrich ve

ark. 2012; Pabba 2013). Öte yandan Sig-1R, NMDAR ve D1R aktive eder (Monnet ve ark. 1990; Martina ve ark. 2007; Hayashi ve Su 2008; Navarro ve ark. 2010; Pabba 2013). Sig-1R'nün özellikle voltaj kapılı iyon kanalları üzerindeki düzenleyici etkisi göz önüne alındığında, reseptörün nöronlarda eksitabilite, sinaptik ileti ve nörotransmitter salınımı gibi süreçlerde nasıl bir rol oynadığı merak konusudur ancak reseptörün bu süreçlerdeki etkisi henüz tam olarak bilinmemektedir. Sig-1R'nün iyon kanalları ve reseptör proteinlerle olan çok çeşitli etkileri ve spesifik etkin deneysel modellerin oluşturulamaması tüm bu süreçlerdeki net etkisini anlamayı zorlaştırmaktadır (Kourrich ve ark. 2012).

İyon kanallarına ve reseptörlere ek olarak Sig-1R plazma membranındaki kinazların fonksiyonlarını da düzenleyebilmektedir. Örneğin; Sig-1R'leri PLC'yi aktive ederek sitoplazmadaki IP3 seviyelerini arttırmakta (Şekil 2.9) ve böylece bu yolla da ER'dan mitokondriye ve sitozole Ca^{+2} akışını kontrol etmektedir (Morin-Surun ve ark. 1999; Su ve ark. 2010; Ruscher ve Wieloch 2015). Sig-1R nöronlarda TrkB ile PLC'nin bağlanmasını arttırmakta ayrıca plazma membranındaki Src kinazı (Şekil 2.9) da aktive edebilmektedir (Su ve ark. 2010; Kourrich ve ark. 2012; Su ve ark. 2016a).



Şekil 2-9: Sig-1R'nün hücresel ve moleküler fonksiyonları. - Su ve ark. (2010)'dan.

Tüm bu veriler Sig-1R'nün, bir şaperon molekül olarak ER, nukleus ve plazma membranı gibi farklı bölgelerde etki göstererek, organeller arası sinyal düzenleyici olarak görev yaptığını ve proteinlerin aktivitelerini regüle ederek hücre biyolojisinde önemli rol oynadığını göstermektedir (Su ve ark. 2010).

Moleküler şaperonlar, konformasyonel olarak hatasız olan proteinleri bağlayabilirler. Ancak, şaperon moleküller, hedef proteinleri sadece konformasyonel olarak yanlış katlandığında veya yanlış katlanmaya eğilimliyken şaperon aktivitelerini arttırarak düzenleyici etki gösterebilirler (Hayashi ve Su 2007). İn vivo ve in vitro çalışmalardan elde edilen bulgulara göre; normal fizyolojik koşullar altında, çoğu iyon kanalı ve reseptör Sig-1R veya ligandlarından etkilenmez dolayısıyla Sig-1R agonistleri tek başına belirgin bir etki göstermezler ancak fizyolojik yanıtları güçlendirebilir veya patolojik durumlarda fonksiyonları iyileştirebilirler. Sig-1R'nün etkisi, hedef proteini olan iyon kanalı ya da reseptör sadece aktif haldeyken belirginleşir. Ancak Sig-1R'nün hedefindeki iyon kanalı ya da reseptör dinlenme durumundayken, Sig-1R düzenleyici etkisini gösteremez (Hayashi ve Su 2007; 2008). Sig-1R agonistlerinin bu özelliği klinik açıdan terapötik bir avantaj sağlamaktadır. Klinikte kullanılan ilaçların çoğu normal fizyolojik fonksiyonlarda değişikliklere neden olduğundan çeşitli yan etkilere yol açabilmektedir. Sig-1R agonsitlerinin normal fizyolojik şartlarda belirgin etkiler göstermemesi ve patolojik durumlarda iyileştirici etkilere yol açması bu moleküllerin klinikte kullanımını bir bakıma güvenli kılmaktadır. Şaperon özelliği sayesinde Sig-1R'nün gen mutasyonları veya oksidatif stresin neden olduğu protein fonksiyonu bozukluklarında ya da yanlış protein katlanması ve birikmesinin görüldüğü alzheimer, parkinson, ALS, hungtington, prion hastalıkları ve serebral iskemi gibi nörodejeneratif hastalıklarda olası klinik kullanımı önem kazanmaktadır (Hayashi ve Su 2007; 2008). Bu nedenlerle Sig-1R agonistlerinin, özellikle protein fonksiyonu ve konformasyonunda bozukluğun görüldüğü hastalıklarda faydalı olabileceği düşünülmektedir (Hayasi ve Su 2007; Su ve ark. 2010).

2.2.4. Sig-1R'nün Neurite Oluşumu ve Nöronal Plastisitedeki Rolü

Beyin plastisitesi, reseptör ve iyon kanallarının aktivitesindeki değişiklikler, sinapslardaki dendritik dikenlerde ve reseptör sayısındaki değişimler, yeni sinapsların oluşumu, neurite oluşumu ve sinaptogenesis gibi farklı süreçleri içerir. Fonksiyonel iyileşme, yeni sinapsların kurulması ve plastisite ile sağlanır (Ruscher ve Wieloch

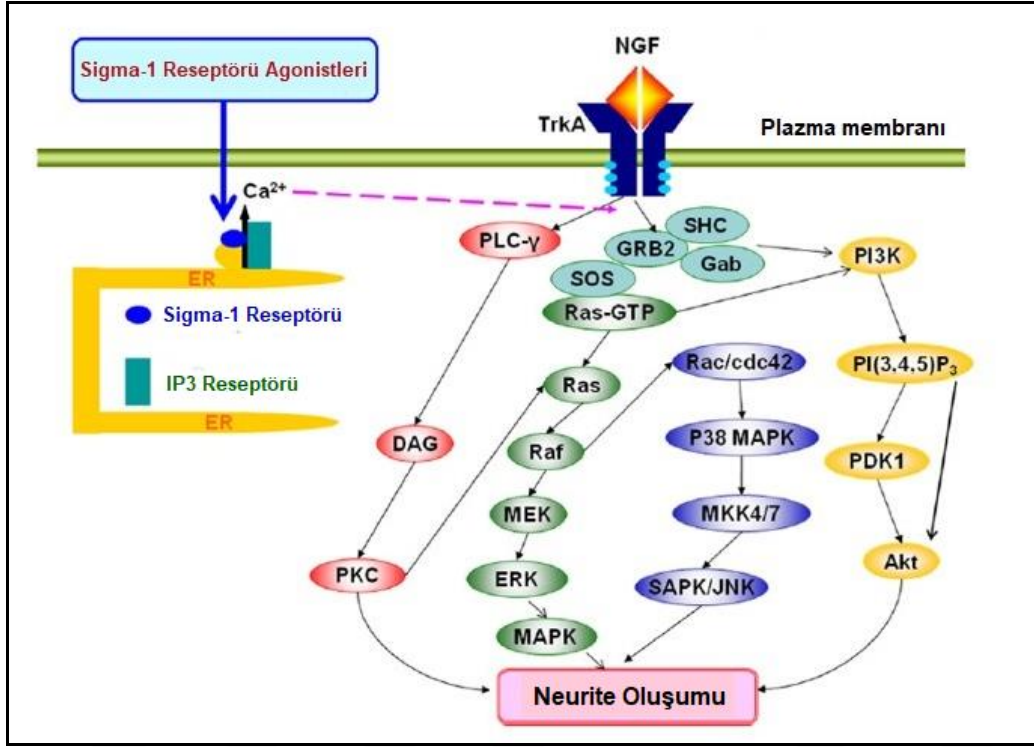
2015). Nöroprotektif etki ile birlikte neurite oluşumunun artırılması, günümüzde nörodejenerasyonun ve sinaptik bağlantılarda hasarın olduğu hastalıklarda başta gelen tedavi stratejilerinden biridir (Kimura ve ark. 2014).

Sig-1R'nün nörotrofik faktörlerle uyarılan neurite oluşumunu arttırdığı, klinikte yaygın olarak kullanılan antidepresanlar ile nörodejeneratif ve nöropsikiyatrik hastalıkların tedavisinde kullanılan bazı ilaçların Sig-1R üzerinden neurite oluşumunu ve uzamasını uyardığı bilinmektedir (Ishima ve ark. 2008; Nishimura ve ark. 2008; Ishima ve Hashimoto 2012). Bu kapsamda Sig-1R ligandlarının, hastalık ve yaralanma sonrası fonksiyonel iyileşmeyi sağlayabileceği düşünülmektedir. Sig-1R agonistleri, beyin plastisitesi boyunca yeni nöronal bağlantıların kurulması için gereken esas işlem olan neurite oluşumunu yani aksonal ve dendritik yapıların oluşması sürecini uyarılmaktadır (Ruscher ve Wieloch 2015). Sig-1R, hipokampal nöronlarda dendrit uzaması, dallanması ve dendritik diken oluşumunu uyarır (Tsai ve ark. 2009), akson boyununun uzamasına ve büyüme konilerinin morfolojisinin düzenlenmesine katkıda bulunur (Li ve ark. 2017). Deneysel inme ve glutamat toksisitesi modelleriyle yapılan çalışmalarda, Sig-1R agonistlerinin kortikal nöronlarda, spinal motor nöronlarda ve arka kök ganglionu nöronlarında neurite uzamasını ve boyunu arttırdığı ayrıca plastitisteyi uyardığı gösterilmiştir (Guzman-Lenis ve ark. 2009; Ruscher ve ark. 2011).

Sig-1R, bazı nöronal büyüme faktörleri ile sinerjistik olarak etki etmekte ve onların sentezini de düzenlemektedir (Kimura ve ark. 2014; Ruscher ve Wieloch 2015). Sig-1R ve nörotrofin reseptörleri benzer fonksiyonlara sahiptirler ve aralarındaki ilişkinin bazı psikiyatrik hastalıklarda rol oynadığı öne sürülmektedir (Takebayashi ve ark. 2002; 2004; Kimura ve ark. 2014).

Şekil 2.10'da görüldüğü üzere, Sig-1R, NGF ile uyarılan neurite oluşumunu güçlendirir. Bu süreçte Sig-1R ile IP3R arasındaki etkileşimin rol oynadığı, PLC, PI3K, p38MAPK, JNK ve Ras/Raf/MAPK sinyal yollarının bu etkiye aracılık ettiği gösterilmiştir (Nishimura ve ark. 2008). Ayrıca, klinikte kullanılan imipramin ve fluvoxamin gibi antidepresanların, alzheimer tedavisinde kullanılan bir asetilkolin esterase inhibitörü olan donepezil'in ve serebral vazodilatör etkisinden dolayı post serebral iskemi vakalarında tedavi edici ajan olarak kullanılan ifenprodil'in de NGF ile uyarılan neurite oluşumunu Sig-1R üzerinden uyardıkları ve bu etkilerini Sig-1R'nün

ilişkide olduğu IP3R üzerinden düzenlediği de bildirilmiştir (Takebayashi ve ark. 2002; Ishima ve ark. 2008; Nishimura ve ark. 2008; Ishima ve Hashimoto 2012).



Şekil 2-10: Sig-1R agonistleri tarafından NGF kaynaklı neurite oluşumunun güçlendirilmesi için önerilen mekanizma. - Nishimura ve ark. (2008)'den.

NGF ve reseptörü ile olan ilişkisi dışında Sig-1R'nün glial hücre kaynaklı nörotrofik faktör (GDNF) ve BDNF gibi başka nörotrofik faktörlerle ayrıca TrkB reseptörü ile de ilişkisi bulunmaktadır (Kimura ve ark. 2014; Ruscher ve Wieloch 2015). Sig-1R aktivasyonu BDNF ve GDNF ekspresyonunu arttırmaktadır ve çeşitli nörodejeneratif hastalık modellerinde plastisite ve iyileşme süreçlerini desteklediği bilinmektedir (Kikuchi-Utsumi ve Nakaki 2008; Penas ve ark. 2011; Francardo ve ark. 2014; Peviani ve ark. 2014; Xu ve ark. 2015). Sig-1R agonisti kronik uygulamasının hipokampusta BDNF protein seviyesini arttırdığı (Kikuchi-Utsumi ve Nakaki 2008), nöroblastoma hücrelerinde ise BDNF sekresyonunu arttırdığı (Fujimoto ve ark. 2012) bildirilmiştir. Öteyandan, Sig-1R ve BDNF ile uyarılmış neurite oluşumu arasındaki bir ilişkinin varlığı da rapor edilmiştir. BDNF ve TrkB reseptör aktivitesi antidepresanların etki mekanizmaları ile ilişkilendirilmiştir ve bu etkide Sig-1R'nün rolü olduğu

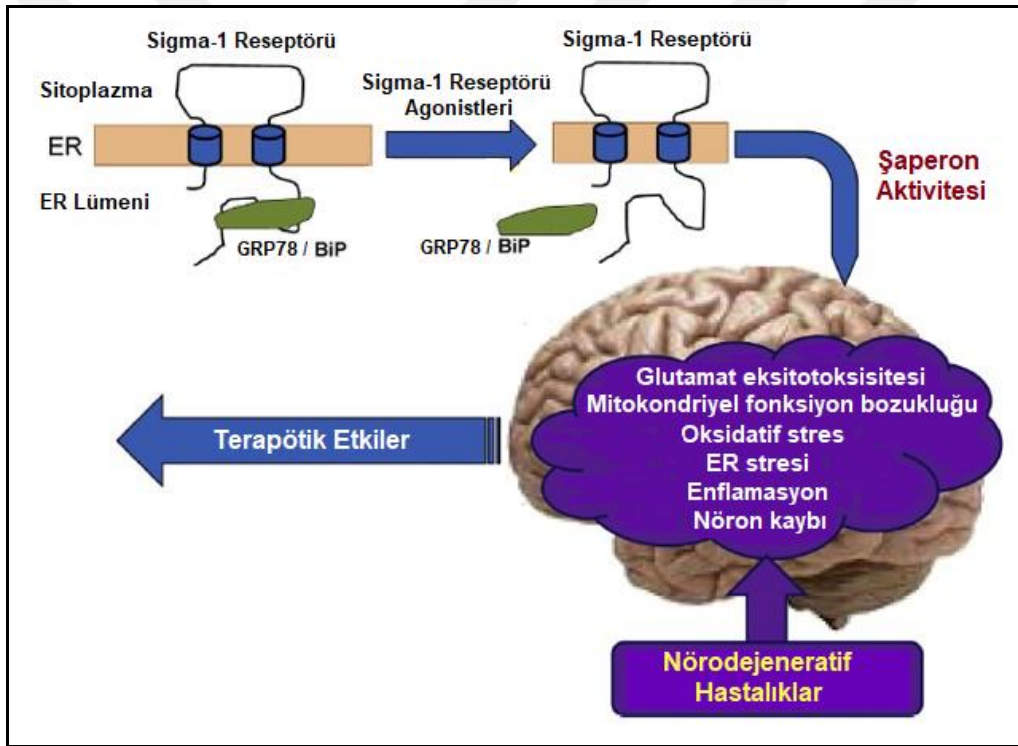
gösterilmiştir (Kimura ve ark. 2014). Sig-1R aktivasyonunun serebellar granül nöronlarında neurite oluşumunu uyardığı, TrkB reseptörleri ile fiziksel etkileşime girerek reseptörü fosforilasyon yolu ile aktive ettiği de rapor edilmiştir (Kimura ve ark. 2013). Tüm bu veriler antidepresanların etki mekanizması altında Sig-1R'nün şaperon aktivitesinin etkili ve önemli olduğunu ayrıca, Sig-1R'nün nörotrofik faktörlerle neurite oluşumunu uyararak, nörolojik ilaçların etkisine katkıda bulunabileceğini göstermektedir (Kimura ve ark. 2014). Sig-1R'nün ve agonistlerinin tüm bu etkilerinin, dejenere olmuş ya da tamamen kaybedilmiş nöronal bağlantıların yeniden kurulması açısından klinikte önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir (Kimura ve ark. 2014).

2.2.5. Sig-1R'nün Nöronal Canlılıktaki Rolü

Alzheimer, parkinson, ALS gibi nörodejeneratif hastalıklar ve iskemi, inme, travmatik beyin hasarı gibi patolojik durumlar önemli beyin fonksiyonlarının ve nöronların kaybı ile sonuçlanan patolojik süreçlerdir. Günümüzde sinirbilimde karşılaşılan en büyük güçlüklerden biri hücre ölümüne neden olan bu süreçlerin altında yatan mekanizmaları açığa kavuşturmak böylece hasar sonrası rejenerasyonu uyarmak, beyinde meydana gelen fonksiyon bozukluklarını azaltmak ya da tedavi etmek üzere güncel tedavi yaklaşımları geliştirebilmektir (Ruscher ve Wieloch 2015). Güncel nöroprotektif terapiler, nöronal dejenerasyonu ve ölümü önlemek, parkinson, alzheimer ve ALS'de olduğu gibi nöron kaybına yol açan yanlış katlanmış proteinlerin birikimini engellemek ve serebral iskemi sonrası kan akımını yeniden düzenlemek üzerine yoğunlaşmıştır. Bunların yanısıra, diğer tedavi edici yaklaşımlar ise kalsiyum ve glutamat toksisitesine karşı nöronları korumak, oksidatif stres ve nöroenflamasyonu önleyerek beyindeki doku kaybını ve fonksiyon bozukluklarını sınırlandırmak (Dirnagl 2012; Ruscher ve Wieloch 2015) ayrıca nöroplastisiteyi uyararak sinaptik bağlantıların yeniden şekillenmesini sağlamaktır (Wieloch ve Nikolic 2006; Ruscher ve Wieloch 2015). Sig-1R'nün tüm bu hücrel ve fizyolojik süreçlerde rolü olduğu bilinmektedir. Sig-1R aktivasyonu nöroprotektif etkilere sahiptir ayrıca fonksiyon kayıplarından sonra iyileşmeyi teşvik etmekte, plastisiteyi uyarmakta ve onarım mekanizmalarını güçlendirmektedir (Kourrich ve ark. 2012; Ruscher ve Wieloch 2015).

Sig-1R'nün nöroprotektif etkileri farklı agonistler kullanılarak hem deneysel modellerde hem de inme, alzheimer, parkinson, huntigton hastalığı, ALS, depresyon, retinal dejenerasyon gibi hastalık modellerinde gösterilmiştir (Nguyen ve ark. 2014a;

2017; Ruscher ve Wieloch 2015). *In vivo* ve *in vitro* serebral iskemi, akut beyin hasarı, glutamat toksisitesi, oksidatif stres hasarı ve birçok nörodejeneratif hastalık modelinde Sig-1R selektif agonistlerinin nöroprotektif etki gösterdiği, oksidatif stres kaynaklı hücre ölümünü azalttığı, glutamat ekzitotoksitesinden hücreleri koruduğu, hücre içine fazla Ca^{+2} akışını azalttığı, proapoptotik ve antiapoptotik genlerin ifadesini değiştirerek hücreleri apoptotik ölümden koruduğu, enflamasyonu baskıladığı, nöronal plastisiteyi ve neurite uzamasını uyardığı (Şekil 2.11) bildirilmiştir (Kourrich ve ark. 2012; Luedtke ve ark. 2012; Fresca ve ark. 2013; Nguyen ve ark. 2014a; 2014b; 2017; Ruscher ve Wieloch 2015).



Şekil 2-11: Sig-1R'nün nörodejeneratif hastalıklardaki nöroprotektif etki mekanizmaları. - Hashimoto (2015b)'ten.

2.2.5.1. Sig-1R'nün Kalsiyum Homeostasisi ve Eksitotoksite Üzerine Etkileri

Santral sinir sisteminin başlıca eksitatör nörotransmitter olan glutamat, öğrenme ve bellek gibi birçok nörolojik fonksiyonun gerçekleşmesinde rol oynamaktadır. Glutamatın uzun süreli salınımı ise NMDAR'nün uzun süreli aktivasyonuna neden olarak intraselüler Ca^{+2} miktarının aşırı artışına, Ca^{+2} homeostasisinin bozulmasına ve

sonuçta nöronal eksitotoksositeye yol açar (Nguyen ve ark. 2014a; 2014b). Bu durum aşırı miktarda Ca^{+2} 'un mitokondriye girişine, mitokondri fonksiyonlarının bozulmasına, oksidatif ve nitrosatif strese, kaspazların ve kalpainlerin aktivasyonuna sonunda da hücre ölümüne sebep olur. Eksitotoksosite ve intraselüler Ca^{+2} artışı inme ve travmatik beyin hasarı gibi akut hasarların yanısıra ALS, alzheimer ve parkinson hastalığı gibi uzamış dejeneratif süreçlerle de ilişkilidir (Nguyen ve ark. 2014a; 2014b; 2017).

Nörodejeneratif hastalıklar ve inme sonrasında görülen hücre ölümünde Ca^{+2} toksisitesi önemli rol oynadığından, Sig-1R'nün Ca^{+2} homeostasisi üzerindeki etkisi beyini bu hasardan korumak için kritik önem taşımaktadır (Ruscher ve Wieloch 2015). Hücrelerde toksik etki gösterecek Ca^{+2} yükselmeleri sadece NMDAR aracılığıyla değil ER gibi hücre içi Ca^{+2} depolarından ve membrandaki diğer iyon kanalları aracılığı ile de sağlanabilir (Nyguen ve ark. 2017). Sig-1R'leri MAM'da, ER'daki depo Ca^{+2} 'un mobilizasyonunu regüle etmektedir. Ayrıca bilinmektedir ki Sig-1R, ER ile mitokondri arasındaki Ca^{+2} akışının uygun şekilde devam edebilmesi için IP3R'lerinin stabilizasyonuna da katkı sağlamaktadır ve PLC'yi aktive ederek sitoplazmadaki IP3 seviyelerini de arttırmaktadır. Tüm bunlara ek olarak hücre içi Ca^{+2} seviyelerini düzenleyen ASIC1-a, voltaja duyarlı Ca^{+2} kanalları, AMPA ve NMDA reseptörleri Sig-1R tarafından regüle edilebilmektedir (Su ve ark. 2010; Ruscher ve Wieloch 2015). Dolayısıyla, söz konusu kanalların aracılık etmesi sonucunda gerçekleşen hücre için zararlı olacak intraselüler Ca^{+2} yükselmelerinin Sig-1R agonistlerinin bu kanalları düzenleyici fonksiyonu sayesinde engellenebileceği ve nöroprotektif etki sağlanabileceği düşünülmektedir (Ruscher ve Wieloch 2015).

Bu kapsamda yapılmış çalışmalarda, Sig-1R ligandlarının primer nöronlarda iskemi ve glutamat toksisitesi modellerinde eksitotoksositeye karşı nöroprotektif etki gösterdiği ortaya konmuştur (DeCoster ve ark. 1995; Dun ve ark. 2007; Shen ve ark. 2008). Sig-1R agonistlerinin intraselüler Ca^{+2} homeostasisini koruyarak (Klette ve ark. 1995; Monnet 2005; Katnik ve ark. 2006), glutamat salınımını azaltarak (Lobner ve Lipton 1990), apoptotik genlerin ve kaspazların aktivasyonunu engelleyerek nöronlarda canlılığı arttırdığı, NMDAR aktivitesini inhibe ederek eksitotoksik hasarı azalttığı bildirilmiştir (Tchedre ve Yorio 2008; Zhang ve ark. 2011). Sig-1R aktivasyonu ayrıca intraselüler asidoz ve iskemi kaynaklı aşırı Ca^{+2} artışlarını da engeller (Cuevas ve ark. 2011; Katnik ve ark. 2014).

2.2.5.2. Sig-1R'nün Oksidatif Stres Üzerine Etkileri

Serbest radikaller, en dış yörüngesinde en az bir eşlenmemiş elektron içeren moleküllerdir ve eşlenmemiş elektronun varlığı nedeniyle oldukça reaktiflerdir. Oksijeni içeren herhangi bir serbest radikal, ROS olarak adlandırılır (Uttara ve ark. 2009; Chen ve ark. 2012). ROS, hücreSEL canlılık, bağışıklık gibi süreçlerde ve hücre içi sinyal iletim yollarında rol oynar ve bu nedenle hücrelerde düşük seviyelerde üretimine ihtiyaç vardır. ROS üretiminin ana kaynağı mitokondridir. Mitokondride ROS oksidatif fosforilasyon sürecinde üretilir. Mitokondri dışında peroksizomlar ve bağışıklık sistemi hücreleri de ROS üretimine katkıda bulunur (Chen ve ark. 2012). Oksijenle ilişkili serbest radikaller (süperoksit ve hidroksil radikalleri) ve reaktif türler (hidrojen peroksit, nitrik oksit, peroksinitril ve hipokloröz asit) vücutta aerobik metabolizmanın sonucu olarak oluşur. Serbest radikalleri temizlemek veya üretimini engellemekten sorumlu moleküller ise antioksidanlar olarak adlandırılır ve vücutta üretilen, diyetle alınan moleküller (glutasyon, arjinin, taurin, selenyum, polifenoller, A, C, E vitamini vb.) ile antioksidan enzimleri (süperoksit dismutaz, katalaz, glutasyon redüktaz, glutasyon peroksidaz vb.) içerir (Uttara ve ark. 2009). Serbest radikallerin fazla üretilmesi veya oluşan serbest radikallerin antioksidan sistem tarafından yeterince temizlenememesi ROS artışına yol açar ve bu durum hücrelere hasar verir. Bu sürece oksidatif stres denir. Oksidatif stres, biyolojik sistemlerde ROS üretimi ile ROS detoksifikasyonu arasındaki dengesizliklerden kaynaklanır (Uttara ve ark. 2009; Chen ve ark. 2012; Liu ve ark. 2017). Oksidatif stres sürecinde okside moleküllerin birikmesi ve normal hücreSEL işlevlerin ve canlılığın bozulması söz konusudur.

Nöronlar oksidatif strese karşı oldukça duyarlıdır. Özellikle beyin, oksijen tüketiminin çok fazla olması, antioksidan sistemlerinin zayıf olması, ROS üretimini katalize eden metal iyonlarını barındırması ve peroksidasyona karşı duyarlı olan çoklu doymamış yağ asitlerinden zengin olması nedeniyle oksidatif hasara karşı çok hassastır (Uttara ve ark. 2009; Chen ve ark. 2012; Liu ve ark. 2017). ROS mitokondrial disfonksiyon durumunda artar ayrıca reaktif glialar tarafından da üretilir (Nguyen ve ark. 2014a). Glutamat, dopamin ve serotonin gibi nörotransmitterlerin aşırı salınımı da ROS artışına yol açar. ROS lipidler, proteinler ve DNA gibi hücreSEL komponentlere hasar verir. ROS ve oksidatif stresin alzheimer, iskemi, parkinson, ALS, hungtington, MS gibi birçok nörodejeneratif hastalığın patofizyolojisine katıldığı bilinmektedir (Uttara ve ark. 2009; Chen ve ark. 2012; Liu ve ark. 2017). Oksidatif stres ayrıca

mitokondrial fonksiyonu bozarak, ATP'nin tükenmesine ve antioksidan kapasitenin azalmasına da yol açar. ROS dışında hücelere zarar veren reaktif nitrojen türleri (RNS) de patolojik durumlarda üretilmektedir (Nguyen ve ark. 2014a; 2014b).

Sig-1R'nün hücelerde ifadesinin azalması ya da reseptörün ifade edilmemesi oksidatif stres hasarını artırır. Öte yandan Sig-1R agonistleri ROS üretimini azaltırken antagonistler ise ROS üretimini artırır (Mori ve ark. 2013; Pal ve ark. 2012). Birçok çalışmada Sig-1R agonistlerinin ROS/RNS'ni azalttığı ve nöroprotektif etkili olduğu gösterilmiştir. Sig-1R agonistleri iskemi, diyabet ve amiloid beta toksisitesinin neden olduğu ROS/RNS üretimini azaltır (Smith ve ark. 2008; Yang ve ark. 2010; Behensky ve ark. 2013a). Hidrojen peroksit toksisite modelinde Sig-1R agonisti uygulamasının primer kortikal nöronları oksidatif stres hasarından koruyarak nöroprotektif etki gösterdiği ve bu etkisini glutamat reseptörünün ifadesini azaltarak ve MAPK/ERK sinyal yolunu regüle ederek gerçekleştirdiği gösterilmiştir (Tuerxun ve ark. 2010). Sig-1R aktivasyonu sonrası görülen ROS seviyesindeki düşüş, Sig-1R'nün nukleusta antioksidan Nrf2 sinyalini ve ARE genlerinin ifadesini artırması dolayısıyla antioksidant enzimlerin üretiminin artırıyor olması ile ilişkilendirilmiştir (Mori ve ark. 2013; Pal ve ark. 2012). Ayrıca in vitro huntigton hastalığı modeli ile yapılan bir çalışmada Sig-1R agonistlerinin NF-kB sinyal yolu üzerinden antioksidan proteinlerin seviyesini arttırarak nöroprotektif etki gösterdiği de bildirilmiştir (Hyrskyluoto ve ark. 2013).

ROS dışında Sig-1R agonistlerinin nitrosatif stres hasarını da iyileştirebildiği ifade edilmektedir. Sig-1R agonistlerinin iskemi sonrası nitrik oksit (NO) üretimini ve nitrosatif stresin proteinlere ve nükleik asitlere verdiği hasarı azaltarak hüceleri stresten koruduğu bilinmektedir (Bhardwaj ve ark. 1998; Yang ve ark. 2010). Sig-1R aktivasyonu kaynaklı NO üretimindeki azalma Sig-1R'nün nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesini azaltmasından kaynaklanmaktadır (Goyagi ve ark. 2001; Vagnerova ve ark. 2006; Yang ve ark. 2010).

2.2.5.3. Sig-1R'nün Mitokondriyel Aktivite ve Apoptoz Üzerine Etkileri

Mitokondri nöronal canlılık üzerinde çok yönlü ve kritik bir öneme sahiptir. Enerji kaynağı ATP'ye ek olarak Ca^{+2} homeostasisini ve apoptozu da düzenler. Bozulmuş mitokondri fonksiyonları birçok nörodejeneratif hastalık ile ilişkilendirilmiştir (Nguyen ve ark. 2014a; 2014b). Eksitotoksik hücre ölümünde

görülen intraselüler Ca^{+2} miktarındaki artış mitokondrial Ca^{+2} miktarının artışına ve mitokondrinin fonksiyonunda bozulmalara yol açar. Ca^{+2} 'un hücre içine akışı, hücredeki iyon dengesini korumak adına $Na^{+}-K^{+}$ pompasının aktivitesinde artışa yol açar, bu durum hücrenin artan ATP ihtiyacını karşılamak için ATP üretim hızında artışı gerektirir ve tüm bu süreç mitokondri fonksiyonunda bozulmaya neden olur (Nguyen ve ark. 2014a; 2014b). ER stresi esnasında meydana gelen ER'dan Ca^{+2} çıkışı ve mitokondriye fazla Ca^{+2} girişi de aynı şekilde mitokondriyi olumsuz yönde etkiler. Bu nedenle ER ile mitokondri arasındaki ilişki apoptozda önemli rol oynar (Lindholm ve ark. 2006). Mitokondriyel fonksiyondaki bozulmalar hücreye hasar verecek ROS ve RNS artışına, enerji üretiminde yetersizliğe, kaspazların aktivasyonuna ve mitokondriyel membran permeabilitesinin bozularak apoptotik proteinlerin sitozole salınmasına sonunda hücre ölümüne yol açar (Nguyen ve ark. 2014a; 2014b).

Sig-1R agonistlerinin mitokondriyel yol üzerinden gerçekleşen apoptotik süreci baskıladığı, antiapoptotik ve proapoptotik genlerin ifadesini etkilediği, mitokondriyel Ca^{+2} alımını ve biyoenerjetik süreçleri regüle ettiği birçok çalışmada gösterilmiştir (Nguyen ve ark. 2014a; 2014b). Sig-1R'nün aktivasyonu özellikle antiapoptotik Bcl-2 proteininin ifadesini düzenleyerek hücre ölümünü engellemektedir (Meunier ve Hayashi 2010). Sig-1R'nün, Bcl-2 proteininin hücrelerde ifade edilme seviyesini NF-kB ve ERK sinyal yolları üzerinden düzenlediği gösterilmiştir (Meunier ve Hayashi 2010; Ha ve ark. 2014). Hücrelerde Sig-1R miktarının artması Bcl-2 proteini seviyesini arttırarak antiapoptotik etki gösterirken, reseptör miktarının azalması Bcl-2 proteini seviyesini azaltır ve apoptotik hücre ölümünü tetikler (Meunier ve Hayashi 2010; Ha ve ark. 2014). Sig-1R seviyesinin azalması nöronlarda hidrojen peroksit kaynaklı apoptotik ölümü arttırır (Meunier ve Hayashi 2010). Sig-1R agonistlerinin in vitro iskemi (Yang ve ark. 2007), glutamat toksisitesi (Tchedre ve Yorio 2008), amiloid beta toksisitesi (Behensky ve ark. 2013b) ve viral toksisite (Zhang ve ark. 2012) modellerinde intraselüler Ca^{+2} seviyesini düzenleyerek, antiapoptotik Bcl-2 proteininin miktarını arttırarak, proapoptotik Bax geninin ve kaspazların aktivasyonunu inhibe ederek nöroprotektif etki gösterdiği ve canlılığı desteklediği gösterilmiştir.

Sig-1R ligandlarının ayrıca biyoenerjetik sistemde meydana gelen bozuklukları da iyileştirebildiği, mitokondriyel solunum sürecini destekleyerek ATP üretiminde meydana gelen aksaklıkları iyileştirdiği farklı hücre tiplerinde ve model

sistemlerde gösterilmiştir (Klouz ve ark. 2003; Klouz ve ark. 2008; Tagashira ve ark. 2013). ER stresi esnasında Sig-1R'nün IP3R ile direkt etkileşime girerek mitokondriye Ca^{+2} alımını kontrol ettiği, IP3R stabilize ettiği ve bu yolla hücrel canlılığı desteklediği bilinmektedir (Hayashi ve Su 2007). Öte yandan Bcl-2 proteininin de IP3R ile etkileşime girerek reseptörün aktivitesini güçlendirdiği gösterilmiştir (Rizzuto ve ark. 2009). Bu veriler değerlendirildiğinde Sig-1R'nün bu mekanizmalar üzerinden mitokondriyel Ca^{+2} alımını ve ATP üretimini düzenliyor olabileceği öne sürülmektedir (Nguyen ve ark. 2014a).

2.2.5.4. Sig-1R'nün ER Stresi Üzerine Etkileri

ER, protein sentezi ve katlanması başta olmak üzere hücrel homeostaziste önemli rol oynar. Ca^{+2} konsantrasyonundaki dengesizlikler ve oksidatif stres gibi durumlar ER fonksiyonunun bozulmasına, yanlış katlanmış ya da katlanmamış proteinlerin ER lümeninde birikmesine neden olur (Lindholm ve ark. 2006; Nguyen ve ark. 2014a). Bu durum ise ER'da katlanmamış protein cevabı (UPR) adı verilen bir süreci başlatır. UPR, protein birikimine karşı adaptif, koruyucu yanıtları ve apoptozun uyarılmasını başlatır. Adaptif yanıtlar; ER'da protein translasyonu ve protein birikimi azalması, ER'nun protein katlama kapasitesinin artırılması ve katlanmamış/hatalı katlanmış proteinlerin degradasyonu şeklindedir. Diğer yanıtlar ise; antiapoptotik protein Bcl-2 ekspresyonunun azalması, apoptotik proteinler Bak ve Bax ekspresyonunun artması, mitokondriden apoptotik sitokrom c salınımının artması ve kaspaz aktivasyonunun artması gibi yollar üzerinden apoptozun uyarılmasını kapsar (Lindholm ve ark. 2006; Nguyen ve ark. 2014a; 2014b). Akut stres ve orta derecede protein birikimi genellikle protein degradasyonunu uyararak adaptif ve koruyucu bir etki sağlar. Uzun süreli ve aşırı protein birikimi ise hücre ölümünü tetikler. Bununla uyumlu olarak bilinmektedir ki uzun süren ER stres yanıtının alzheimer, parkinson ve huntington gibi nörodejeneratif hastalıklar ile ilişkisi vardır (Nguyen ve ark. 2014a; 2014b; 2017).

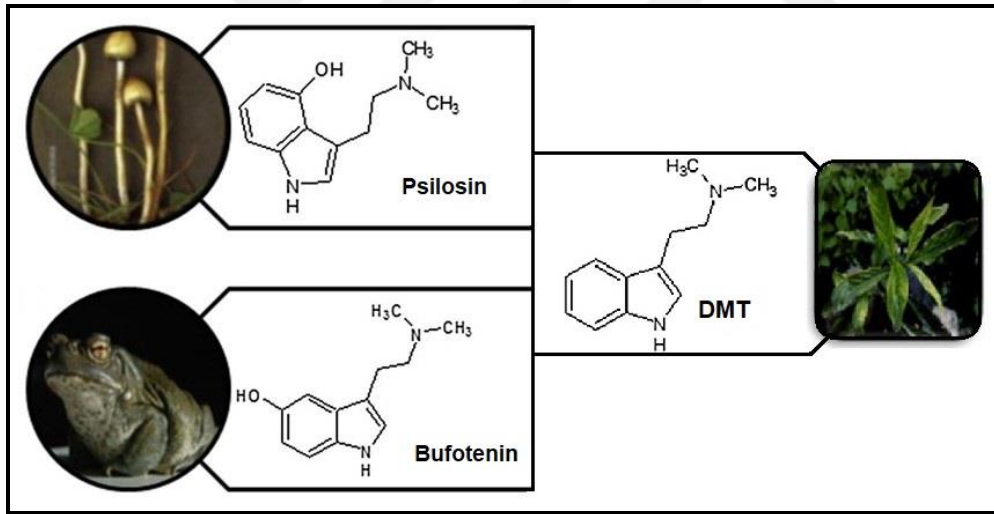
ER stresi esnasında ya da agonistleri ile uyarıldığında Sig-1R, MAM'da bağlı olduğu Bip/GRP78'ten ayrılır ve ER'da bulunan ve ER stresi yanıtında rol oynayan proteinlerin aktivitelerini modüle eder (Hayashi ve Su 2007; Mori ve ark. 2013). Ayrıca ER stresi ile birlikte Sig-1R'nün hücrelerde miktarı artmaktadır. Sig-1R miktarının artması ER stresini azaltarak canlılığı desteklemektedir. Öte yandan, hücrelerde Sig-1R

miktarının azalması ER stresi kaynaklı apoptotik hücre ölümünü uyarılmaktadır (Hayashi ve Su 2007; Mori ve ark. 2013).

2.3. N,N-Dimetiltriptamin

2.3.1. N,N-Dimetiltriptaminin Yapısı ve Genel Özellikleri

N,N-dimetiltriptamin (DMT) güçlü psikoaktif özelliklere sahip, metillenmiş bir indolalkilamindir (Barker ve ark. 2012). Bu indol alkaloid doğada yaygın olarak bulunmaktadır (Frecska ve ark. 2013; Carbonaro ve Gatch 2016). Hızlı ve kısa süreli psikoaktif etki gösteren DMT, triptamin türevi bir halusinojen maddedir (Rodriguez 2007). DMT, triptofan aminoasitinden sentezlenen serotonin hormonu ve melatonin hormonu ile benzer yapıdadır. Ayrıca, doğada bulunan bufotenin ve psilosin gibi halusinojenik triptaminler de (Şekil 2.12) yapısal olarak DMT molekülü ile oldukça benzerdir (Frecska ve ark. 2013; Araújo ve ark. 2015).



Şekil 2-12: DMT ve benzer yapıdaki triptamin türevi halusinojenler. - Araújo ve ark. (2015)'ten.

Hayvanlarda endojen bir bileşik olan DMT, yeryüzünde 50'den fazla bitki türünde bulunmaktadır (Carbonaro ve Gatch 2016; Domínguez-Clavé ve ark. 2016). Birçok bitki türü dışında ayrıca baklagiller, mantarlar, deniz süngerleri, tunikatlar ve kurbağalar gibi yüzlerce organizmada da DMT'nin varlığı bilinmektedir (Jacob ve Presti 2005). DMT'nin doğada önemli miktarlarda ve yaygın olarak bulunmasına karşın

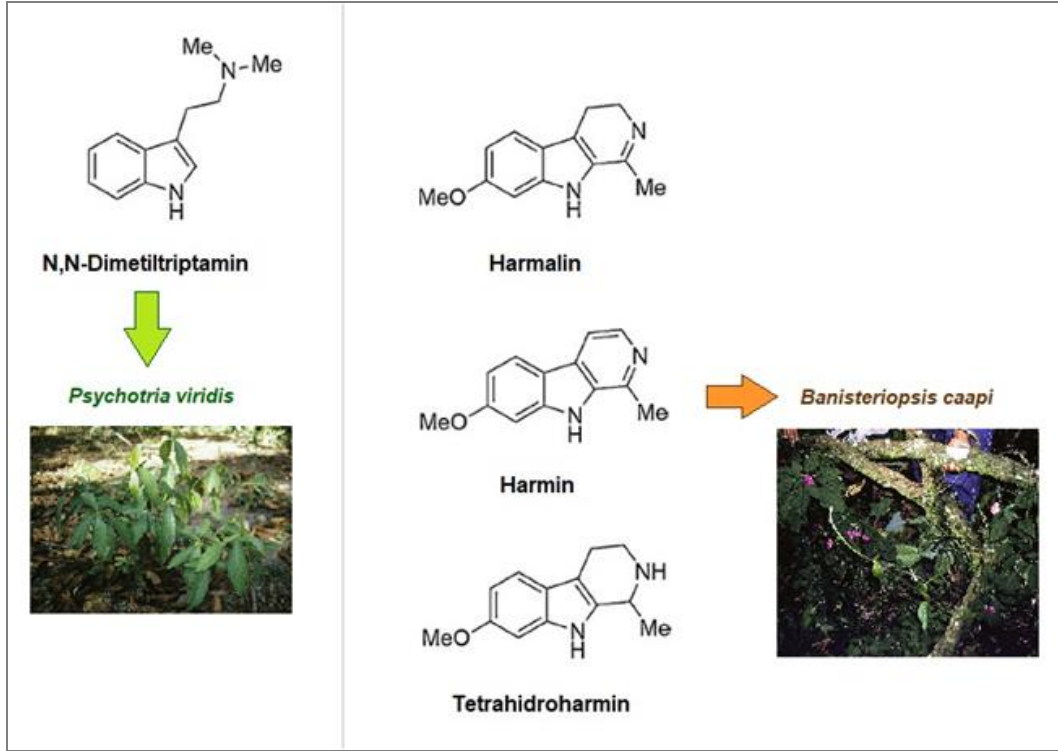
biyolojik rolü tam olarak aydınlanabilmiş değildir (Frecka ve ark. 2013; Carbonaro ve Gatch 2016).

DMT ile ilgili ilk bilimsel bilgilerin elde edilmesi DMT molekülünün Manske tarafından 1931'de laboratuvarında sentezlenmesi ile başlamıştır (Kaynak: Jacob ve Presti 2005 p. 1). DMT, ilk kez 1946 yılında Brezilyalı kimyacı Oswaldo Gonçalves deLima tarafından *Mimosa tenuiflora* bitkisinin köklerinden izole edilmiştir. 1950'lilerde, DMT'nin bir Amazon bitkisi olan *Anadenanthera peregrina* tohumları ile hazırlanan ve Amazon'da şamanik ritüellerde kullanılan cohoba ve yopo olarak adlandırılan psikoaktif bir tütü içindeki güçlü psikoaktif bileşiklerden biri olduğu tespit edilmiştir (Jacob ve Presti 2005). Saf DMT'nin insanlardaki halusinojenik ve psikoaktif etkileri ise ilk kez 1956 yılında Stephen Szara tarafından rapor edilmiştir ve bileşiğe olan ilgi artmaya başlamıştır (Kaynak: Jacob ve Presti 2005 p. 2; Frecka ve ark. 2013 p. 2; Domínguez-Clavé ve ark. 2016 p. 90). 1960'larda ise Amazonda dini ritüellerde kullanılan ve *Virola* türünden bir bitkiden hazırlanan epena adlı tütünün de DMT içerdiği bildirilmiştir. Ardından, 1965 yılında Franzen ve Gross, DMT'yi insan idrar ve kanının normal bileşenleri olarak rapor etmiş (Kaynak: Jacob ve Presti 2005 p. 2) ve 1972 yılında ise ilk kez Saavedra ve Axelrod tarafından DMT'nin sıçan ve insan beynindeki varlığı gösterilmiştir (Kaynak: Carbonaro ve Gatch 2016 p. 75). Böylece DMT'nin bir endojen halusinojen olduğu ileri sürülmüştür. Bu bulgular ve daha sonraki araştırmacıların yaptığı çalışmalar doğrultusunda DMT'nin psikedelik etkileri kesin olarak gösterilmiş ve yüksek konsantrasyonda vücuda alımı sonrası hızlı ve kısa süreli görsel halüsinasyonlara yol açması onu ilgi konusu yapmıştır. Çalışmalar ilerledikçe de DMT'nin psikoaktif etkilerinin yanısıra farklı fizyolojik etkileri olabileceği, bir nörotransmitter ya da nöromodülatör olarak etki gösterebileceği ile ilgili veriler elde edilmiştir (Barker ve ark. 1981; Su ve ark. 2009; Frecka ve ark. 2013; Carbonaro ve Gatch 2016).

DMT ile ilgili olarak, Gıda ve İlaç Kurumu (FDA) onayı alınarak insan denekleri üzerinde yapılmış olan en kapsamlı ve büyük ölçekli klinik çalışma 1990'ların başında New Mexico Üniversitesi'nde Dr. Rick Strassman tarafından yürütülmüştür. Strassman'ın bu çalışmasında psikiyatrik bir hastalığı olmayan ve sağlıklı 60 gönüllü denek yer almış ve 5 yıl süren çalışma boyunca bu deneklere geniş doz aralığında 400'den fazla intravenöz DMT uygulaması yapılmış ve DMT deneyiminin fizyolojik ve

sübjektif etkileri araştırılmıştır (Strassman ve ark. 1994a; 1994b). Strassman bu çalışmalarından elde ettiği tüm verileri “The Spirit Molecule DMT” (Ruh Molekülü DMT) adlı bir kitap halinde 2001 yılında yayınlamıştır. Strassman (2001) bu araştırmalarının sonunda, DMT'nin insan bilincinin daha iyi anlaşılması için önemli bir araç olduğuna karar vermiştir; bu fikir, DMT ve ilgili triptamin halüsinojenlere duyulan ilgiyi arttırmıştır. Son yıllarda DMT'nin kullanımı hızla artmaktadır (Carbonaro ve Gatch 2016).

DMT, belki de en çok Güney Amerika'da Amazon havzasındaki yerli halk tarafından şamanik törenlerde yüz yıllardır kullanılan ayahuasca, hoasca ve yage gibi karışımların içinde bulunan temel psikoaktif bileşiklerden biri olması ile tanınmaktadır (Jacob ve Presti 2005; Frecska ve ark. 2013; Carbonaro ve Gatch 2016). Ayahuasca adı verilen halüsinojenik içecek, *Banisteriopsis caapi* bitkisinin kök ve kabukları ile *Psychotria viridis* bitkisinin yapraklarının kaynatılması ile elde edilir. *Psychotria viridis* bol miktarda DMT'yi içerirken, *Banisteriopsis caapi* harmin, tetrahydroharmin (THH) ve az miktarda harmalin alkaloidlerini (Şekil 2.13) içerir (Riba ve ark. 2003; McKenna 2004; Su ve ark. 2009; Frecska ve ark. 2013; Domínguez-Clavé ve ark. 2016; dos Santos ve ark. 2016). Bu alkaloidler genel olarak beta-karbolinler olarak adlandırılırlar. Ayrıca harminin orijinal olarak *Peganum harmala* bitkisinden izole edilmiş olmasından dolayı harmala alkaloidleri olarak da bilinirler (Frecska ve ark. 2013; Domínguez-Clavé ve ark. 2016).



Şekil 2-13: DMT içeren ayahuasca içeceğinde bulunan alkaloidler ve kimyasal yapıları. - Domínguez-Clavé ve ark. (2016)'dan.

Günümüzde DMT içeren ayahuasca, Peru, Kolombiya ve Ekvator'daki Amazon yerli halk arasında etnik tıp ve şamanizmin önemli bir unsurudur. (McKenna 2004; dos Santos ve ark. 2016). Amazon Havzasında ayahuasca kullanımının kökenleri bilinmemektedir, çok sayıda yerli kabile arasında oldukça yaygın olması nedeniyle 19. yüzyılın ortalarında batıda dikkat çekmiştir (McKenna 2004). Brezilya'da ve Dünya genelinde Amazon şamanizmi, Hristiyanlık, spiritüalizm ve Afrika-Brezilya dinlerinden çeşitli öğeleri harmanlayan Santo Daime, União do Vegetal ve Barquinha gibi senkretik dinlerin ayinlerde ayahuasca kutsal bir karışım olarak kullanılmaktadır. Dünya çapında yaklaşık 20.000 kişinin, dini törenlerinde ayahuasca kullanımını kutsal kabul eden çeşitli Brezilya dini inanışlarının üyesi olduğu tahmin edilmektedir (dos Santos ve ark. 2016). Birleşik Devletlerde ritüellerde ve dini törenlerde düzenli olarak ayahuasca kullanan kişilerin sayısı artmaktadır. Brezilya ve Amerika'da senkretik dini gruplar tarafından ayahuasca'nın ritüellerde kullanılması yasal olarak onaylanmıştır (McKenna 2004; dos Santos ve ark. 2016). Ayahuasca'nın psikolojik ve tıbbi faydaları bilim insanları, hekimler ve entellektüellerin ilgisini çekmiştir. Pek çok Kuzey Amerikalı ve Avrupalı, ayahuasqueros olarak da adlandırılan geleneksel şamanların liderliğindeki

ayahuasca törenlerine katılmak için Amazon'a gitmektedir. Amazon'da ayahuasca turizminin büyümesi, giderek artan sayıda turistlerin de bu bölgeye gitmesine olanak sağlamaktadır (McKenna 2004).

Ekzojen olarak DMT, oral yoldan, intramuskuler veya intravenöz enjeksiyon ile, burundan çekilerek, tütsü halinde solunarak ya da sigara şeklinde içilerek vücuda alınabilir (Rodriguez 2007). DMT oral yoldan vücuda alındığında aktif değildir. Bunun sebebi, mitokondrilerde bulunan ve endojen biyojenik aminlerin oksidatif deaminasyonunu katalizleyen monoamin oksidaz enzimi A (MAO-A) tarafından DMT'nin priferal dokularda hızlı bir şekilde yıkılmasıdır (McKenna ve ark. 1984). Oral kullanımda DMT'nin aktif olması için, MAO inhibitörü (MAOI) ile birlikte kullanılması gerekmektedir. DMT içeren karışımlarda MAOI olarak etki gösteren beta-karbolinler bulunmaktadır. Ayahuasca içeriğinde bulunan β -karbolinler MAO-A inhibitörüdür ve MAO-A enzimini inhibe ederek DMT'nin gastrointestinal kanalda ve karaciğerde yıkılmasını engellerler. Böylece DMT yıkıma uğramadan sistemik sirkülasyonda kalır ve santral sinir sistemine ulaşarak etkisini gösterir (McKenna ve ark. 1984; Riba ve ark. 2003; McKenna 2004; Domínguez-Clavé ve ark. 2016; dos Santos ve ark. 2016). İlginç şekilde, DMT'nin kendisi de yüksek dozlarda MAO-A enzimini inhibe eder (Carbonaro ve Gatch 2016).

Endojen bir bileşik olarak DMT insan kan, idrar ve serebrospinal sıvı gibi vücut sıvılarında tespit edilmiştir ancak metabolik olarak çok hızlı yıkıma uğradığı için, endojen DMT miktarını doğru olarak ölçebilmiş çalışmalar bulunmamaktadır (Fontanilla ve ark. 2009; Carbonaro ve Gatch 2016). DMT'nin az bir kısmı ana bileşik olarak idrarla atılır (Barker ve ark. 1981). DMT, esas olarak MAO enzimi tarafından metabolize edilir öte yandan DMT'nin peroksidazlar tarafından yıkılarak çeşitli metabolitlere dönüştürüldüğü ile ilgili de veriler bulunmaktadır. İnsan ve kemirgenlerle yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, DMT'nin yıkımı ile oluşan metabolitlerin hiçbiri DMT'ye benzer etkiler oluşturmamaktadır (Carbonaro ve Gatch 2016).

1970'lerde deney hayvanları üzerinde yapılan birçok çalışmada DMT'nin tolerans oluşturmadığı gösterilmiştir. Strassman ve ark. (1996) insanlar üzerinde yaptığı klinik çalışmalarda, DMT'nin halusinojenik etki ile ilgili olarak bir tolerans oluşturmadığını gözlemlemişlerdir. Bazı akut kardiyovasküler etkilerinin yanı sıra

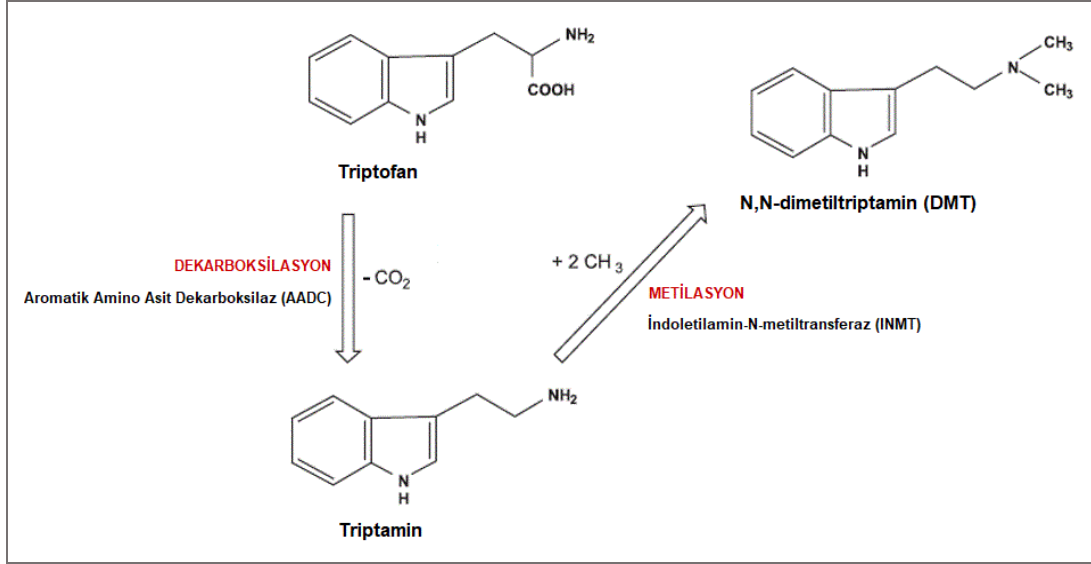
DMT'nin bilinen bir organ toksisitesi yoktur ve literatürde DMT'nin uzun süreli kullanımının toksik etkileri hakkında bir rapor da bulunmamaktadır (Carbonaro ve Gatch 2016). Öte yandan, DMT'nin nöroprotektif etkili olduğuna dair bazı çalışmalar bulunmaktadır (Frecska 2008; Szabo ve ark. 2016).

Bitki ve hayvanlar alemindeki yaygın varlığına ve hatta insanlarda endojen olarak bulunmasına rağmen, biyolojik önemi ile ilgili bilgilerin yetersiz olması ve güçlü halusinojenik etkisi nedeniyle DMT'nin bir nörotoksin olduğu ve medikal kullanımının kabul edilemeyeceği şeklinde bir görüş oluşmuştur ve bu nedenle DMT, 1970 yılında Amerika Birleşik Devletleri denetimli maddeler yasası ile birinci sınıf denetimli madde kapsamına alınmıştır (Jacob ve Presti 2005; Frecska ve ark. 2013). Ardından 1971'de Birleşmiş Milletler Psikotrop Maddeler Sözleşmesi ile de uluslararası olarak da birinci sınıf denetimli / yasaklı madde kapsamına alınmıştır. Amerikan hükümeti tarafından yasaklanmış kontrole tabi maddeler yüksek bağımlılık riski taşıyan, kabul edilmiş tıbbi kullanımı olmayan, tıbbi gözetim altında dahi kullanımı güvenli olmayan maddeler olarak tanımlanmıştır. Oysa DMT, organlar üzerinde toksisitesi bulunmayan, fizyolojik bağımlılığa ya da bağımlılık davranışlarına yol açmayan bir maddedir. Dolayısıyla molekülün bu kategoride sınıflandırılmasının aslında klinik ve bilimsel kanıtlara değil sosyo-politik nedenlere dayandırıldığı düşünülmektedir (Jacob ve Presti 2005; Frecska ve ark. 2013). Bu alanda çalışan araştırmacılara göre, "DMT'nin denetimli maddeler kapsamına alınması, DMT ile ilgili yapılacak bilimsel araştırmalara büyük ölçüde engel olmuştur ve halen de olmaktadır" (Strassman 1995; Frecska ve ark. 2013). Öte yandan, Ayahuasca ve yapımında kullanılan bitkilerin bazıları birinci sınıf kontrollü madde kapsamında olan DMT'yi içermesine rağmen ilginç olarak 1971 tarihli Psikotropik Maddeler Sözleşmesi kapsamında uluslararası olarak yasaklanmamıştır (McKenna 2004). Bu nedenle günümüzde DMT araştırmaları, genellikle DMT içeren ayahuasca ve benzeri karışımların kullanılması ile yapılmaktadır (McKenna 2004).

2.3.2. DMT'nin Endojen Sentezi

DMT, esansiyel amino asit triptofandan sentezlenir. Şekil 2.14'te görüldüğü gibi, sentezin ilk basamağında triptofan amino asidi aromatik amino asit dekarboksilaz (AADC) enzimi aracılığı ile dekarboksile olarak triptamine çevrilir. Triptamin ise indoletilamin-N-metiltransferaz (INMT) enzimi tarafından transmetile edilir. INMT enzimi bu reaksiyonda S-adenozil metionini substrat olarak kullanır ve triptamine metil

grupları eklenmesini katalize eder. Metilasyon sonunda önce N-metiltriptamin ardından da iki metil grubunun eklenmesi ile DMT (Şekil 2.14) üretilir (Barker ve ark. 1981; Jacob ve Presti 2005; McKenna 2004; Freska ve ark. 2013; Carbonaro ve Gatch 2016).



Şekil 2-14: DMT molekülünün sentez basamakları. – McKenna (2004)'ten.

Triptaminden DMT'yi sentezleyen INMT enzimi vücutta birçok dokuda yaygın olarak ifade edilir. INMT enzimi, vücutta başta akciğer olmak üzere, tiroid bezi ve adrenal bezde yüksek seviyelerde bulunur. INMT enzimi ayrıca, plasenta, iskelet kası, kalp kası, ince barsak, mide, retina, pankreas ve lenf nodlarında da orta seviyede üretilir. Ayrıca, INMT'nin omuriliğin ön boynuzunda yoğun olarak lokalize olduğu da bildirilmiştir (Mandell ve Morgan, 1971; Wyatt ve ark. 1973; Thompson ve Weinshilboum 1998; Thompson ve ark. 1999; Jacob ve Presti 2005; Mavlyutov ve ark. 2012). INMT'nin periferik dokularda yoğun olarak bulunmasından dolayı DMT'nin temel fizyolojik fonksiyonunun periferik etkiler üzerinden gerçekleştiği varsayılmıştır (Karkkainen et al. 2005). Ancak daha sonraki çalışmalarda INMT'nin merkezi sinir sisteminde beyinde de bulunduğu ortaya konmuştur. İnsan beyinde en yüksek INMT aktivitesinin unkus, medulla, amigdala, frontal korteks (Mendell ve Morgan 1971), fronto-parietal ve temporal loblarda (Saavedra ve ark. 1973) olduğu bilinmektedir. Son olarak, INMT'nin pineal bezde de bulunduğu 2011 yılında Cozzi ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (Kaynak: Carbonaro ve Gatch 2016 p. 77). INMT'nin

dokulardaki bu geniş dağılımı, DMT için de geniş bir dağılım anlamına gelmektedir (Carbonaro ve Gatch 2016). Öte yandan, DMT'nin kan-beyin bariyerini bir aktif transport sistemi aracılığı ile geçebiliyor olması, periferik dokularda sentezlenen DMT'nin santral sinir sistemi fonksiyonlarını da etkileyebileceğini düşündürmektedir (Frecska ve ark. 2013).

Yapılan çalışmalarda, DMT üretiminin, kemirgen beyinde ve adrenal bezinde stres koşulları altında arttığı gösterilmiştir (Christian ve ark. 1977; Frecska ve ark. 2013). Ancak, DMT üretimini arttıran stres kaynaklı mekanizmanın, INMT aktivitesindeki artıştan mı yoksa DMT'nin yıkımındaki azalmadan mı kaynaklandığı henüz bilinmemektedir (Carbonaro ve Gatch 2016).

INMT'nin enzimatik aktivitesi endojen inhibitörler tarafından yakından kontrol edilmektedir. DMT'nin yüksek konsantrasyonlarda INMT aktivitesini %90 inhibe eder (Lin ve ark. 1974; Marzullo ve ark. 1977). Ek olarak, INMT enzimini içeren dokular aynı zamanda DMT'yi katabolize eden enzimleri de içermektedir. İntraselüler olarak üretilen DMT'nin yalnızca çok küçük bir miktarı kana salınır ve periferik dokularda enzimler tarafından hızla yıkılır. Bu durum DMT'nin kanda ya da orijinal doku örneklerindeki miktarının doğru ve tutarlı bir şekilde tespit edilmesine izin vermemektedir (Karkkainen ve ark. 2005; Barker ve ark. 2012; Frecska ve ark. 2013; Carbonaro ve Gatch 2016).

2.3.3. DMT'nin Merkezi Sinir Sistemine Taşınma ve Depolanma Mekanizması

Yapılan çalışmalardan elde edilen bulgulara dayanarak, DMT'nin yüksek konsantrasyonlarda beyine ulaşip nöronlara alınmasını ve depolanmasını açıklayan 3 aşamalı bir süreç tanımlanmıştır (Frecska ve ark. 2013; Carbonaro ve Gatch 2016). İlk basamakta, DMT kan beyin bariyerini geçer ve aktif taşıma ile endotelial plazma membranından Mg^{+2} ve ATP bağımlı bir alım sistemi ile geçiş yapar (Cozzi ve ark. 2009; Barker ve ark. 1982; Sitaram ve ark. 1987; Yanai ve ark. 1986). İkinci basamakta, DMT'nin nöronlara alımı gerçekleşir. DMT'nin nöronlara alımı, nöronal plazma membranındaki serotonin taşıyıcıları (SERT) aracılığı ile meydana gelir (Berge ve ark. 1983; Whipple ve ark. 1983; Nagai ve ark. 2007). Üçüncü ve son basamakta ise DMT, vesiküler monoamin taşıyıcısı 2 (VMAT2) ile sitoplazmadan sinaptik vesiküllerin içine aktarılır (Cozzi ve ark. 2009).

DMT'nin SERT ve VMAT2 aracılığı ile nöronlarda sinaptik vesiküllere alındıktan sonra depo edilerek saklandığı da gösterilmiştir (Nagai ve ark. 2007; Cozzi ve ark. 2009; Vitale ve ark. 2011). Beyinde nöronlara alınıp depolanma basamakları tamamlandıktan sonra, DMT 1 hafta süre ile daha sonra salınmak üzere nöronlarda depo edilebilmektedir (Vitale ve ark. 2011). DMT'nin beyine aktif yollarla alınması, onu kan-beyin bariyerini geçemeyen ve belli bir mesafeden merkezi sinir sistemine etki edemeyen diğer nörotransmitterlerden tamamen farklı kılmaktadır. (Jacob ve Presti 2005; Frecska ve ark. 2013). Eser aminler (oktopamin, feniletilamin, tiramin, triptamin ve türevleri) organizmada genellikle düşük konsantrasyonda bulunurlar, ancak yıkım süreçlerinin inhibe edildiği (Su et al. 2009) ya da fizyolojik stresin olduğu özel koşullarda, belli bölgelerde yüksek miktarda depo edilirler (Frecska ve ark. 2013). DMT'de stres koşullarında beyindeki üretimi arttığı bilinen ve aktif yollarla taşınarak yüksek konsantrasyonda beyinde depo edilebilen bir bileşik olmasından dolayı eser amin olarak kabul edilmiştir (Wallach 2009; Frecska ve ark. 2013).

DMT'nin merkezi sinir sistemine taşınarak ve nöronlara alınarak hücre içi sinyal iletim sistemlerini düzenleyebileceği ve merkezi sinir sistemi fonksiyonlarını etkileyebileceği öne sürülmektedir (Frecska ve ark. 2013; Carbonaro ve Gatch 2016). Frecska ve ark. (2013)'na göre, detayları verilen taşıma ve hücre içine alım mekanizmaları "DMT'nin beyinde birikimi ve depolanması için önemli bir fizyolojik çabanın ortaya konduğunu göstermekte ve DMT'nin hayati ya da yaşamsal bir fizyolojik önemi olduğu fikrini akla getirmektedir. Çünkü sadece aminoasitler ve glikoz gibi birkaç molekül dokularda aktif olarak taşınmaları ve depolanmaları açısından bu şekilde bir önceliğe sahiptir. Bu kapsamlı ve özel süreçlerin DMT molekülünün sadece halusinojenik veya psikedelik etkilerinin ortaya konması için gelişmiş olmayabileceğini düşündürmektedir".

2.3.4. DMT'nin Bilinen Klinik Fizyolojik Etkileri

Strassman 1994 yılında sağlıklı gönüllüler üzerinde gerçekleştirdiği klinik araştırmalarda, intravenöz DMT uygulamasından sonra kişilerin bazı fizyolojik parametrelerini incelemiş ve raporlamıştır (Strassman ve ark. 1994a; 1994b). Elde edilen verilere göre, saf DMT, kan basıncı, kalp frekansı, rektal vücut sıcaklığı gibi parametrelerde artışa ve midriyazise yol açmaktadır. DMT'nin bu etkilerine karşı tolerans gelişip gelişmediğini araştırmak amacıyla araştırmaya katılan gönüllüler

üzerinde yapılan çalışmalarda, saf DMT'nin aralıklı olarak uygulanmasının kalp atım hızında azalmaya yol açtığı ancak kan basıncında düşüşün gerçekleşmediği gözlenmiştir (Strassman ve ark. 1996). Ayahuasca ile yapılan çalışmalarda da benzer şekilde semptomimetik etkiler ve midriyazis rapor edilmiştir (Riba ve ark. 2003; dos Santos ve ark. 2011). Bununla birlikte, saf DMT'nin intravenöz yolla uygulandığı çalışmalarda belirgin kardiyovasküler etkilerin aksine, ayahuasca sistolik ve diyastolik kan basıncında sadece orta derecede artışlara yol açar ve kalp hızında değişikliğe neden olmaz (Domínguez-Clavé ve ark. 2016). Öte yandan, tekrarlayıcı doz şeklinde ayahuasca alımının sistolik basıncı ve kalp atım hızını düşürdüğü rapor edilmiştir (Dos Santos ve ark. 2012). Ayahuasca gibi DMT içeren karışımların uzun süreli kullanımının sıçanlarda aort yapısını değiştirerek aort duvarının kalınlaşmasına neden olduğu da gösterilmiştir (Pitol ve ark. 2015).

DMT ayrıca endokrin sistem üzerinde de etkilidir. DMT kanda endorfin, kortikotropin, kortizol, prolaktin ve büyüme hormonu değerlerinde de yükselişe neden olmaktadır. (Strassman ve ark. 1994a; 1994b; Jacob ve Presti 2005; Carbonaro ve Gatch 2016). DMT, tekrar eden dozlar halinde uygulandığında ise kortikotropin, prolaktin ve kortizol hormonlarının yükselişine karşı tolerans geliştiği gözlemlenmiştir (Strassman ve ark. 1996). Benzer şekilde, insanlarda ayahuasca kullanımının da prolaktin ve kortizol seviyelerini yükselttiği (Dos Santos ve ark. 2011; 2012), öte yandan tekrarlayan dozlarının ise büyüme hormonu sekresyonunu azalttığı bildirilmiştir (Dos Santos ve ark. 2012).

DMT'nin immünmodülatör etkisinin olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. DMT ve türevlerinin, insan monosit kökenli dendritik hücrelerinde proenflamatuvar sitokinlerin üretimini inhibe ettiği, anti-enflamatuvar sitokin sekresyonunu arttırdığı ayrıca dendritik hücrelerin T hücre aktivasyonu etkisini inhibe ettiği gösterilmiştir (Szabo ve ark. 2014). Yüksek miktarda DMT içeren ayahuasca kullanımı insanlarda (1 mg/kg DMT), dolaşımdaki doğal öldürücü (NK) hücrelerin sayısını artırır (Dos Santos ve ark. 2011). DMT uygulamasının ise NK hücreleri ve dendritik hücrelerden güçlü anti-kanser faktörler olan interferonların sekresyonunu arttırdığı bilinmektedir (Carbonaro ve Gatch 2016). Uzun süreli ayahuasca kullanımının kanserde iyileştirici bir rolü olduğu ve remisyonu sağladığı ile ilgili raporlar da bulunmaktadır (McKenna 2004). Tüm bu veriler değerlendirildiğinde DMT'nin immün

regülasyonda ve karsinogenesis süreçlerinde rol oynayabileceği düşünülmektedir (Frecka ve ark. 2013; Carbonaro ve Gatch 2016).

2.3.5. Endojen Halusinojen Madde Olarak DMT'nin Etkileri

DMT ile ilgili olarak insanlar üzerinde yapılan ilk çalışmalarda öncelikle DMT'nin psikoaktif etkileri rapor edilmiştir. Kısa süre sonra sıçan ve insan beyinde DMT'nin varlığı gösterilmiş ve böylece DMT bir endojen halusinojen olarak tanımlanmıştır (Frecka ve ark. 2013). DMT'nin insanlarda bir endojen molekül olduğunun keşfedilmesinden sonra, aşırı miktarda endojen DMT üretiminin psikoz semptomlarına yol açabileceği, bu durumun şizofreni ile ilişkili olabileceği hatta DMT'nin bir şizotoksin olduğu öne sürülerek bu konuda psikiyatrik çalışmalar başlatılmıştır (Jacob ve Presti 2005; Carbonaro ve Gatch 2016). Ancak, DMT'nin şizofrenide rol oynadığına dair kesin kanıtlar elde edilememiştir (Carbonaro ve Gatch 2016). Daha sonraki yıllarda ise, şizofreninin beyindeki dopaminerjik nöronlardaki aşırı aktiviteden kaynaklandığının gösterilmesi ile DMT'nin şizotoksin olduğu ile ilgili hipotezler gölgede kalmıştır. Öte yandan son çalışmalar DMT'nin bir nörotoksin olmadığını hatta nöroprotektif etkileri olduğunu göstermektedir. Ayrıca DMT'nin bir nörotransmitter ya da nöromodulator olarak görev alabileceği de öne sürülmüştür. (Frecka ve ark. 2013; Szabo ve ark. 2016). Halen DMT'nin nöropsikiyatrik hastalıklarda ve psikotik semptomlarda rol oynayabileceği düşünülmektedir (Daumann ve ark. 2010; Warren ve ark. 2013; Frecka ve ark. 2013; Carbonaro ve Gatch 2016). DMT ile ilgili yapılan çalışmaların büyük kısmı onun psikoaktif özelliklerini anlamak üzerine yoğunlaşmıştır ancak bu endojen halusinojenin insanlarda fizyolojik süreçlerdeki rolü halen tam olarak bilinmemektedir (Frecka ve ark. 2013).

DMT'nin halusinojenik etkilerinin serotonin/5-hidroksitriptamin (5-HT) reseptörü alt tipleri üzerinden gerçekleştiği düşünülmektedir (Frecka ve ark. 2013; Carbonaro ve Gatch 2016). DMT'nin başta 5-HT_{2A} olmak üzere 5-HT₂ ve 5-HT₁ reseptörü alt tiplerine özellikle halusinojenik etki için önemli olduğu düşünülen 5-HT_{1A} ve 5-HT_{2C} reseptörlerine agonist olarak bağlanabildiği bilinmektedir (Frecka ve ark. 2013). Genellikle DMT'nin halusinojenik etkilerinin serotonin reseptörü alt tipleri üzerinden gerçekleştiğine inanılsa da halusinojenik etki için tek başına yeterli olmadıkları düşünülmektedir (Su ve ark. 2009; Frecka ve ark. 2013).

Serotonin reseptörleri dışında DMT'nin, memeli merkezi ve periferik sinir sistemi dokularında bulunan, emosyonel davranışlarla ilgili beyin bölgeleri ile ilişkili olduğu bilinen ve birçok psikiyatrik durum ile olası bağlantıları gösterilen eser amin ile ilişkili reseptörler (TAARs) sistemine afinitesi olduğu bilinmektedir. TAARs reseptörlerinin keşfi ile psikoza eser aminlerin potansiyel rolüne olan ilgi yenilenmiştir. DMT'nin G proteini ile eşleşen reseptörler sınıfına ait olan TAARs reseptörleri ile etkileşimi keşfedildikten sonra, DMT'nin endojen anksiyolitik bir bileşik olabileceği de düşünülmüştür (Jacob ve Presti 2005; Su ve ark. 2009). Günümüzde bu fikir DMT ile ilgili merak uyandırmış ve DMT'nin halusinojenik etkileri sıkça araştırılmıştır (Carbonaro ve Gatch 2016). Ayrıca, DMT'nin TAARs reseptöründe aktivite göstermesi, beyinde sinaptosomal membranlar için çok yüksek bir afiniteye sahip olması ve aktif geri alım mekanizmaları ile taşınması onun bir nörotransmitter olarak işlev görebileceğini de düşündürmektedir (Wallach, 2009; Carbonaro ve Gatch 2016). Ek olarak, insan TAAR1 reseptörü mRNA'sının midede orta derecede ve beyinde amigdalada daha düşük düzeylerde mevcut olduğu bulunmuştur. Sıçanlarda ise TAAR1 reseptörü mRNA'sının beyinde, periferik organlarda ve gastrointestinal kanalda yaygın olarak bulunduğu gösterilmiştir. Bu veriler, DMT'nin hem beyinde hem de bağırsakta bir nörotransmitter olarak rol oynayabileceğini özellikle de duyuşsal algıda yer alan santral sinir sistemi bölgelerinde bir nörotransmitter olarak görev yapabileceğini akla getirmektedir (Wallach, 2009; Carbonaro ve Gatch 2016).

Strassman'ın klinik araştırmasında (1994b) halusinojen değerlendirme ölçeği kullanılarak DMT'nin zihinsel durum üzerindeki sübjektif etkileri rapor edilmiştir. DMT intravenöz 0.2 ve 0.4 mg/kg'lık dozlarda, devam eden zihinsel deneyimlerin yerini alan ve ani başlangıçlı görsel halüsinasyonlara, bedensel ayırışma hissine ve duygu durumunda aşırı değişimlere yol açar. Ancak, psikedelik etkilere yol açan dozların çoğu endojen DMT aktivitesinin anlaşılması için çok yüksek olabilir. Bununla birlikte, Strassman ve ark. (1994b) çalışmalarında, düşük doz DMT'yi (0.05 mg / kg), fizyolojik parametrelerde ölçülebilir değişikliklere yol açmayan ancak bireylerin mental durumlarındaki değişikliklerin farkında olduğu doz olarak tespit etmiştir. Ayrıca, düşük doz intravenöz DMT uygulamasının insan deneklerde sakin bir ruh haline yol açtığı da rapor edilmiştir (Strassman ve Qualls 1994; Strassman ve ark. 1994b). Yakın zamanda, Jacob ve Presti (2005), düşük dozda uygulanan DMT'nin rapor edilmiş bu sübjektif etkilerine dayanarak, endojen DMT'nin anksiyolitik bir rol oynayabileceğini öne

sürmüşlerdir. Araştırmacılar, düşük dozlarda uygulanan DMT'nin, endojen DMT'nin konsantrasyonu ve biyolojik etkisine benzer bir etki oluşturacağını düşünmüşler ve TAAR reseptörleri üzerinden antianksiyolitik ve antipsikotik etkilere sahip olabileceğini öne sürmüşlerdir. Düşük dozlarda endojen DMT'nin anksiyolitik bir etki gösterirken, yüksek doz DMT seviyelerinin psikedelik ve halusinojenik etkiler göstererek bilinç durumunda ani değişimlere yol açabileceği de düşünülmektedir (Jacob ve Presti 2005).

Buharlaştırılmış serbest baz şeklinde inhalasyon yoluyla ya da suda çözünmüş tuz formunda intravenöz enjeksiyon ile uygulanması durumunda DMT'nin etki süresi kısadır. Başlangıç deneyiminin ortaya çıkışı çok hızlıdır, çok kuvvetli bir etkiye sahiptir ve uygulamayı takiben 2 dakika içinde tam etki kaydedilmiştir (Gallimore ve Strassman 2016). DMT'nin subjektif etkileri intravenöz uygulamasından (tipik doz 0,1-0,4 mg/kg) yaklaşık 5 dakika sonra en üst seviyeye ulaşır ve 30 dakika içinde sona erer (Strassman ve ark. 1996). DMT kas içi enjeksiyon yolu ile uygulandığında ise (rapor edilen doz 0,2-1 mg/kg) etkileri 2-5 dakika içinde hızlı bir başlangıç gösterir, 30-60 dakika kadar sürebilir ve etkiler genellikle intravenöz veya inhalasyon yolu ile uygulanmasından daha düşük yoğunluktadır (Szára, 2007). İnhalasyon yolu ile alınan DMT'nin halusinojenik etkileri (tipik doz 40-50 mg/kg) ise intravenöz yolla uygulandığı durumda olduğu gibi hızlı ve ani başlangıçlı olmakla beraber etkisi daha kısa sürede sona erer (Carbonaro ve Gatch 2016). DMT'nin ayahuasca (0.6-0.85 mg/kg) (Riba ve ark., 2003) formülasyonu şeklinde kullanılması ile halüsinojenik etkileri genellikle 60 dakika içinde ortaya çıkar, 90 dakika içinde en üst seviyeye ulaşır ve yaşanan deneyim yaklaşık 4 saat sürebilir (Cakic ve ark. 2010). MAO inhibitörü kullanılmadan yaşanan DMT deneyimleri yaklaşık 20 dk sürmektedir ki bu süre diğer triptamin türevi halusinojenlerle kıyaslandığında çok daha kısa sürelidir. DMT deneyimi tipik olarak çok renkli kaleodoskopik görüntülerin görülmesi ile uğultu ya da vızıltı şeklinde yüksek bir sesin işitilmesi ile başlar. Yeterli yüksek doza ulaşılmasıyla, liserjik asit dietilamid (LSD) ve psilosibin gibi bilinen halusinojen maddelerin aksine DMT, yalnızca algıda bozulmalara değil, tam bir duyusal halusinasyonun yaşanmasına yol açmaktadır ve bu özelliği ile çok farklı bir psikoaktif madde olarak tanımlanmaktadır. Dahası, DMT deneyimi yaşayanların ifadelerine göre; tam bir halüsinasyon üreten psikoaktif maddelerin içinde DMT, en canlı ve sıra dışı tecrübeyi sunmaktadır (Rodriguez 2007). Dolaylı kanıtlara ve DMT kullanıcılarının ifadelerine dayanarak bazı araştırmacılar, DMT'nin psikoz, rüyalar, yaratıcılık, hayal gücü, dini ya da ruhani olaylar, manevi

deneyimler ve ölüme yakın deneyim gibi değişen bilinç durumlarında rol oynadığına dair bir çok fikir ileri sürmüşlerdir (Callaway 1988; Strassman 2001 pp. 221-246; Carbonaro ve Gatch 2016).

Ayahuasca, saf DMT'den daha çok çalışılmış ve daha kapsamlı araştırmalarda yer almıştır. Öte yandan, oral olarak aktif olabilmesi için ayahuasca hem DMT içeren bir bitkiyi hem de DMT'nin dolaşımında yıkılmasını engellemek için harmalin gibi bir beta-karbolin MAO inhibitörü içermek zorundadır (McKenna ve ark. 1984). Beta karbolinlerin kendilerinin psikoaktif etkilere sahip olmaları ve diğer psikoaktif alkaloidlerin gücünü arttırabildikleri için ayahuasca'nın subjektif etkileri aynı dozdaki saf DMT'den farklıdır (Gallimore ve Strassman 2016). Ayahuasca kullananların büyük kısmı görsel deneyimler yaşarlar. Görüntüler genellikle hayallerindeki kişilerle karşılaştırılır, karmaşık sahnelerden oluşur, zaman zaman tanıdıkları yerleri ve insanları veya geçmiş olayları içerir. Tüm canlılıklarına rağmen, bu görüntüler gerçek halüsinasyonlardan farklıdır. Bireyler bu görüntülerin ayahuasca kaynaklı olduğunun farkındadır, genellikle gözlerin açık olduğu ve dikkatin dış dünyaya yönlendirildiği zaman bu görüntüler ortadan kaybolur (Riba ve ark. 2001; Domínguez-Clavé ve ark. 2016). Ayahuasca ayrıca düşünce hızını artırır ve yeni çağrışımları kolaylaştırır. Ayahuasca tarafından başlatılan iç gözlem durumu, kişisel sorunlar üzerinde düşünmeye yol açar. Ayahuasca deneyimi yaşayan kişiler bu deneyimin kişiye yeni bakış açıları kazandırdığını ve ayahuasca kaynaklı deneyimin psikoterapötik tedavilerle benzer şekilde sonuç verdiğini ifade etmektedir (Riba ve ark. 2001; Domínguez-Clavé ve ark. 2016). Ayahuasca ve benzeri DMT içeren karışımlar çeşitli psikiyatrik bozukluklar için alternatif bir tedavi olarak önerilmiştir ve ayahuasca çoğunlukla iyi tolere edilmektedir (Carbonaro ve Gatch 2016). 1970'lerde yapılan ilk çalışmalarda, anksiyete ve agresyon modelinde DMT'nin deney hayvanlarındaki dövüşme yanıtını baskıladığı gösterilmiştir (Walters ve ark. 1978). Depresyon modeli oluşturularak deney hayvanları ile yapılan başka bir çalışmada, DMT'nin antidepresan etkilerinin olduğu gözlemlenmiştir (Pic-Taylor ve ark. 2015). Daha sonra insanlar üzerinde yapılan iki büyük ölçekli çalışmada, ayahuasca kullanımının depresif bozukluğu olan hastalarda anksiyeteyi azalttığı (Osorio ve ark. 2015), uzun süreli ayahuasca kullanıcılarında ise panik seviyesini düşürdüğü (Santos ve ark. 2007), antidepresan etki gösterdiği ve depresif semptomlarda iyileşme sağladığı bildirilmiştir (Santos ve ark. 2007; Osorio ve ark. 2015). Ayrıca, uzun süreli ayahuasca kullanıcılarının, ayahuasca kullanmayan şahıslara kıyasla daha az

psikopatoloji yaşadığı ve nöropsikolojik testlerde daha iyi performans gösterdiği (Bouso ve ark. 2012), madde bağımlılığı ile ilgili sorunları daha az yaşadığı ve psikiyatrik ya da psikososyal sorunlarla daha az karşılaştıkları da bilinmektedir (Fábregas ve ark. 2010).

2.3.6. DMT ve Sig-1R

2009 yılında DMT'nin bir endojen Sig-1R ligandı olduğu keşfedilmiştir (Fontanilla ve ark. 2009). Bu keşiften bu yana DMT'nin Sig-1R üzerinden gerçekleşebilecek olası fizyolojik etkileri hakkında birçok hipotez öne sürülmüştür (Frecka ve ark. 2013). Bu hipotezlere göre; sitozolik DMT, MAM'da lokalize olan Sig-1R ile etkileşime girebilir ya da nöronlarda vesiküler olarak depo edilen DMT stres koşulları altında sinapslardan mikro molar konsantrasyonlarda salınabilir ve hücre membranındaki ya da komşu hücrelerin intraselüler lokalizasyondaki Sig-1R'leri ile etkileşime girebilir. DMT, Sig-1R ile etkileşime girdikten sonra agonist etki göstererek Sig-1R aracılığı ile nöroprotektif etki gösterebilir, nöronal plastisiteyi ve neurite oluşumunu uyarabilir. DMT'nin Sig-1R üzerinden başlattığı sinyal yollarının açıklanmasının, DMT molekülünün fizyolojik etkilerine ışık tutacağı düşünülmektedir (Frecka ve ark. 2013).

Sig-1R spesifik ligandlar ile yapılan reseptöre bağlanma yarışma analizleri sonucunda, metillenmemiş işaretli aminlerin (triptamin, fenetilamin, tiramin) Sig-1R'ne zayıf olarak bağlandığı gösterilmiştir. Buna karşın, bu aminlerin N-metil ve N,N-dimetillenmiş formlarının ise Sig-1R'ne çok daha sıkı bağlandığı ve yüksek affinite gösterdikleri belirlenmiştir (Fontanilla ve ark. 2009). Sıçan karaciğeri homojenatlarında triptamin, N-metil-triptamin ve DMT'nin Sig-R'ne bağlanma affinitelerinin araştırıldığı çalışmada, en yüksek affinitenin beklendiği gibi dimetillenmiş bileşik olan DMT'de gerçekleştiği, 10 μ M dozdan başlayarak etkinin giderek arttığı ve DMT'nin 100 μ M konsantrasyonda reseptöre bağlanma affinitesinin en yüksek olduğu (%100) tespit edilmiştir (Fontanilla ve ark. 2009).

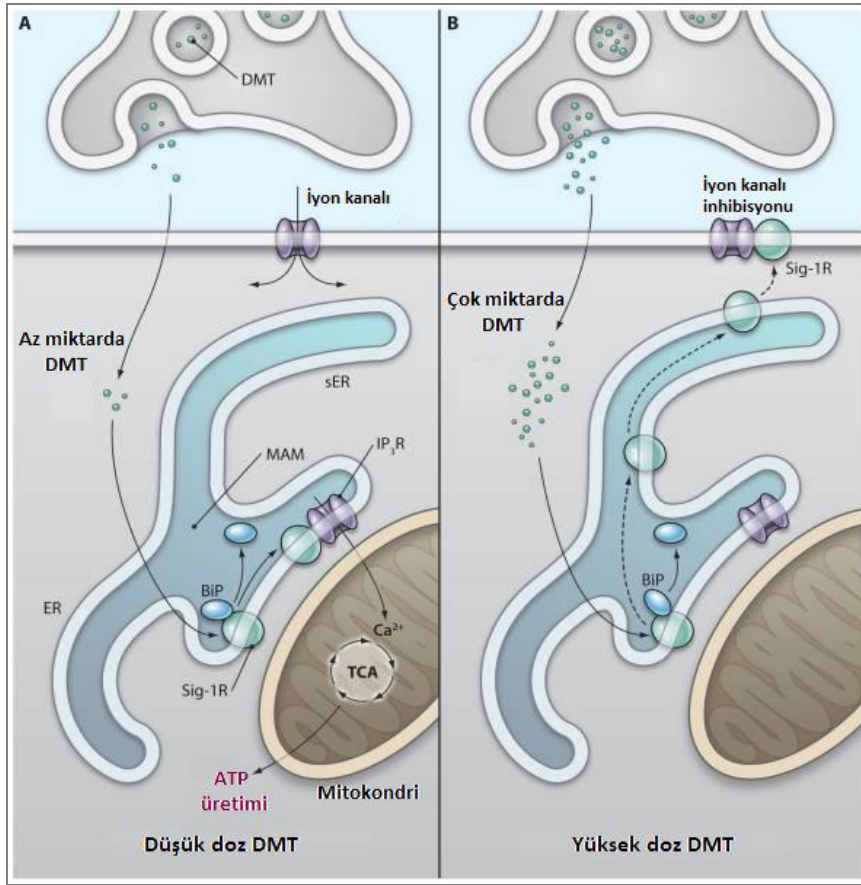
Sig-1R aktivasyonunun önemli biyolojik aktivitelerinden biri iyon kanallarını inhibe etmesidir ve bu inhibisyonu G proteinleri ya da protein kinazlar aracılığı ile değil direkt protein-protein etkileşimi ile gerçekleştirmektedir. Sig-1R'nün çeşitli tiplerde voltaj kapılı K^+ kanallarını, sıçanlarda sempatik ve parasempatik nöronlarda N, L, P/Q ve R tipi Ca^{+2} kanallarını modüle ettiği bildirilmiştir. Sig-1R ligandlarının ayrıca insan

embriyonik böbrek hücrelerinde ve yeni doğan fare kardiyak miyositlerinde voltaj kapılı Na^+ kanallarını inhibe ettiği de gösterilmiştir (Fontanilla ve ark. 2009).

DMT'nin Sig-1R üzerinden gerçekleştirebileceği fizyolojik etkiyi araştırmak için DMT'nin voltaj kapılı iyon kanallarındaki Na^+ akımı üzerine etkisi incelenmiş ve 100 μM DMT uygulamasının insan embriyonik böbrek hücrelerinde ve yeni doğan fare kardiyak miyositlerinde voltaj kapılı Na^+ kanallarını inhibe edebildiği yama kısacı kayıtları ile belirlenmiştir (Fontanilla ve ark. 2009). DMT'nin farelerde hipermobilityyi Sig-1R üzerinden uyardığı ve Sig-1R ifade etmeyen farelerde ise bu etkisinin ortadan kalktığı da bildirilmiştir (Fontanilla ve ark. 2009). DMT'yi sentezleyen INMT enzimi ile Sig-1R arasında da bir ilişki tespit edilmiştir (Frecska ve ark. 2013). INMT ve Sig-1R'nün spinal motor nöronların C terminalinde birlikte lokalize oldukları ve C terminallerinin, stresli koşullar altında, ön boynuz nöronlarının eksitabilitesini modüle ettiği gösterilmiştir (Mavlyutov ve ark. 2012). Bu bilgi, motor nöronlarda Sig-1R'nü aktive etmek için yeterli düzeyde endojen DMT'nin olabileceğini düşündürmektedir (Carbonaro ve Gatch 2016).

DMT Sig-1R'ne düşük mikromolar konsantrasyonda (yaklaşık 14 μM) bağlanmaktadır ve agonist olarak etki etmektedir. Bu afinite değeri Sig-1R'ne nanomolar konsantrasyonlarda afiniteye sahip olan başka agonistler ile karşılaştırıldığında çok zayıf kalmaktadır (Fontanilla ve ark. 2009; Su ve ark. 2009). Bilinmektedir ki Sig-1R esas olarak ER'da bulunsa da Sig-1R agonistinin yüksek konsantrasyonları örneğin; afinite değerlerinin yaklaşık 10 kat yüksek değerleri ile uyarıldığında ER'dan ayrılarak plazma membranına transloke olmakta ve çeşitli iyon kanallarının aktivasyonunu regüle etmektedir. Bu, DMT'nin kanal inhibe edici konsantrasyonunun niçin afinite konsantrasyonundan yaklaşık 10 kat daha yüksek olduğunu (100 μM) açıklamaktadır (Fontanilla ve ark. 2009; Su ve ark. 2009).

DMT'nin Sig-1R aracılığıyla gerçekleştirdiği olası etki için varsayılan moleküler mekanizma (Şekil 2.15) şu şekildedir: Diğer Sig-1R agonistleri gibi, DMT afinite konsantrasyonlarında (10-14 μM) uygulandığında, Sig-1R bağlı olduğu BiP kompleksinden ayrılarak ER'da etki gösterir. Daha yüksek konsantrasyonlarda yani afinite konsantrasyonunun yaklaşık on katı kadar (100 μM) uygulandığında Sig-1R ER'dan ayrılarak plazma membranına transloke olur ve burada çeşitli iyon kanalları, reseptörler ve kinazlarla etkileşime girer (Su ve ark. 2009).



Şekil 2-15: DMT'nin Sig-1R üzerinden gösterdiği düşünülen olası etki mekanizması. - Su ve ark. (2009)'dan.

Sig-1R endojen ligandı ve agonisti olduğu düşünülürse DMT, nöroprotektif süreçler, nöronal plastisite, immün sistemin regülasyonu ve tümör proliferasyonu üzerinde önemli rol oynayabilir (Frecska ve ark. 2013). DMT'nin, Sig-1R ile etkileşime girdikten sonra Sig-1R üzerinden hücrede sitozolik Ca^{2+} akışını, antiapoptotik/proapoptotik ve antioksidan genlerin ekspresyonlarını düzenleyebileceği ve bu yollar üzerinden stresli ya da patolojik koşullarda hücreler üzerinde koruyucu bir etki gösterebileceği düşünülmektedir (Frecska ve ark. 2013). Szabo ve arkadaşlarının (2016) yaptığı çalışma bu fikri destekler niteliktedir. Çalışmada, DMT'nin insan pluripotent kök hücrelerinden farklılaştırılmış kortikal nöronlarda ayrıca dendritik hücrelerde ve makrofajlarda hipoksik strese karşı koruyucu etki gösterdiği ve hücrelerde canlılığı arttırdığı gösterilmiştir.

Sig-1R reseptörleri sadece periferik ve merkezi sinir sisteminde değil aynı zamanda bazı immün sistem hücrelerinde de eksprese edilmektedir (Gekker ve ark. 2006). Ayrıca Sig-1R reseptörlerinin bazı kanser dokularında da ifade edildiği ve Sig-1R agonistlerinin enflamatuvar yanıtı düzenlediği de bilinmektedir. Bu açıdan bakılırsa, DMT'nin Sig-1R üzerinden immün sistemi düzenleyici etkiler gösterebileceği düşünülmektedir (Frecka ve ark. 2013). Son yıllarda yapılmış bir çalışmada, DMT'nin Sig-1R üzerinden insan monosit kökenli dendritik hücrelerinde enflamatuvar sitokin üretimini ve salınımını azalttığı, antienflamatuvar sitokin üretimini ve sekresyonunu arttırdığı ve T lenfosit aktivasyonunu inhibe ettiği böylece enflamasyonu anlamlı şekilde azalttığı da gösterilmiştir (Szabo ve ark. 2014).

DMT'nin, beynin sağ kalımını uzatmaya yardımcı olduğu speküle edilmiştir. Kardiyopulmoner arestin yaşandığı durumlarda, akciğerlerin büyük miktarda DMT sentezleyebileceği ve DMT'nin saniyeler içinde arteriyel kan içine bırakılabileceği düşünülmektedir (Frecka ve ark. 2013). DMT bir kez kan dolaşımına geçiş yaptığında, dolaşımında yıkılmadan beyine ulaşabilir. Aktif taşıma mekanizmaları ile kan beyin bariyerini geçen DMT'nin, kalbin son sistolik kontraksiyonunu yaptığı esnada beyine ulaşarak beynin daha uzun süre canlı kalmasını sağlayabileceği ileri sürülmektedir (Frecka ve ark. 2013). Ekzojen DMT'nin oluşturduğu psikedelik etkiler, klinik ölüm ve ölüme yakın deneyimlerinden sonra rapor edilen subjektif deneyimlere oldukça benzemektedir. Bu nedenle, DMT'nin büyük olasılıkla klinik ölüm sürecine katıldığı düşünülmektedir (Strassman, 2001 pp. 220-221).

DMT'nin perinatal gelişimde de rol oynayabileceği düşünülmektedir. INMT seviyesi plasentada yetişkinlerden daha yüksektir. Bu farkın fetal akciğerlerin aktivitesi tarafından oluşturulduğuna dair spekülasyonlarda bulunulmuştur. INMT aktivitesinin tavşan akciğerinde fetüslerde daha yüksek olduğu, doğumdan sonra hemen hızla ani bir şekilde arttığı ve 15 günlük iken en yüksek seviyeye ulaştığı gösterilmiştir (Lin ve ark. 1974). Eğer INMT seviyesindeki yükselişle birlikte DMT üretimi de artıyorsa, DMT Sig-1R üzerinden yeni doğanlarda görülen nöronal plastisiteyi uyarabilir (Carbonaro ve Gatch 2016). Selektif Sig-1R agonistlerinin eksitotoksik perinatal beyin hasarına ve neonatal striatumda iskemik nörodejenerasyona karşı nöroprotektif etki gösterdiği bilinmektedir (Yang ve ark. 2010; Griesmaier ve ark. 2012; Frecka ve ark. 2013).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma için T.C. İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alındı (Etik kurul tarihi-karar no: 20/04/2016-39). Tüm deneysel protokoller T.C. İstanbul Medipol Üniversitesi, Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi (REMER) bünyesindeki araştırma laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

3.1. Deney Hayvanları

Bu tez çalışmasında, T.C. İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırma Merkezi (MEDİTAM) bünyesindeki Deney Hayvanları Birimi'nden temin edilen sağlıklı, her iki cinsiyetten 20 adet yeni doğan (Postnatal 0 ve 1) Balb-C fare kullanılmıştır. Bu merkezde 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık uygulanmış, farelerin standart kafeslerde barındırılmasına, ortamın iyi havalandırılmasına ve temizliğine dikkat edildi. Farelere su ve yem (standart laboratuvar yemi) ad libitum olarak sağlandı ve yeni doğan fareler deney başlangıcında teslim alınana kadar anne fareler ile birlikte tutuldu. Deney protokolü öncesinde yeni doğan fareler etik kurallara uygun olarak önce %4 izofluoran inhalasyonu ile genel anestezi altına alındı ve ardından dekapitasyon ile sakrifiye edildi.

3.2. Deney Grupları

Çalışmada, DMT molekülünün merkezi sinir sistemi nöronlarında aksonal ve dendritik yapıların (neurite) oluşumu ve nöronal canlılık üzerindeki etkileri incelendi ve bu doğrultuda çalışma neurite deneyleri ve canlılık deneyleri olarak iki bölüme ayrıldı.

Canlılık ve neurite oluşumu deneyleri için DMT, yüksek ve düşük doz olmak üzere (10 μ M ve 100 μ M) literatürde etkinliği belirlenmiş olan iki dozda uygulandı (Fontanilla ve ark. 2009; Szabo ve ark. 2014; Szabo ve ark. 2016). Endojen Sig-1R ligandı olan DMT'nin etkilerinin kıyaslanacağı sentetik selektif Sig-1R agonisti SA4503 ise (Tocris Bioscience, katalog no: 4951) neurite deneylerinde 10 μ M dozda, H₂O₂ toksisite modelinin kullanıldığı canlılık deneylerinde ise 10 μ M ve 100 μ M dozlarda kullanıldı (Nishimura ve ark. 2008; Tuerxun ve ark. 2010; Li ve ark. 2017). Sig-1R selektif antagonisti NE100 (Tocris Bioscience, katalog no: 3133) tüm deneylerde 10 μ M dozda kullanıldı (Senda ve ark. 1998; Nishimura ve ark. 2008). IP3R

antagonisti Xestespongine C (Tocris Bioscience, katalog no: 1280) ise 1 μ M dozda uygulandı (Nishimura ve ark. 2008; Ishima ve Hashimoto 2012).

Neurite deneyleri için yeni doğan farelerden hipokampal nöronlar izole edildikten sonra her bir deney grubuna neurite oluşumu üzerindeki etkileri test edilecek maddeler eklendi ve petripler inkübatöre (37°C, %5 CO₂) kaldırılarak deney sonuna kadar inkübasyona bırakıldı. Sig-1R antagonisti NE100 ve IP3R antagonisti Xestespongine C, antagonistik etkilerinin ortaya çıkması için DMT ve SA4503 uygulamasından önce kültür ortamına eklendi.

Neurite deneyleri için deney grupları şu şekilde oluşturuldu:

1. Kontrol
2. DMT 10 μ M
3. DMT 10 μ M-NE100
4. DMT 10 μ M-Xest.C
4. DMT 100 μ M
5. DMT 100 μ M-NE100
6. DMT 100 μ M-Xest.C
8. SA4503
9. SA4503-NE100
10. SA4503-Xest.C

Canlılık deneyleri için insan nöroblastoma hücre hattı (SHSY-5Y) kullanıldı. Nöroblastoma hücrelerine kültür ortamında nöroprotektif etkilerinin gözlemlenmesi için önce DMT ve SA4503 uygulaması yapıldı ardından hücrelerde hidrojen peroksit (H₂O₂) hasarı oluşturuldu. Sig-1R antagonisti NE100 ise antagonistik etkisinin ortaya çıkması için, DMT ve SA4503'ten önce kültür ortamına eklendi.

Canlılık deneyleri için deney grupları şu şekilde oluşturuldu:

1. Kontrol (H₂O₂ toksisitesi uygulanmamış sağlıklı hücreler)
2. H₂O₂ (H₂O₂ toksisitesi uygulanmış hücreler)
3. DMT 10 μ M
4. DMT 100 μ M
5. DMT 10 μ M-NE100
6. DMT 100 μ M-NE100

7. SA4503 10 μ M
8. SA4503 10 μ M-NE100
9. SA4503 100 μ M
10. SA4503 100 μ M-NE100

3.3. DMT Molekülünün Sentez Protokolü

DMT molekülünün sentezi, kimyasal yapısının tayini ve saflık analizi, T.C. İstanbul Medipol Üniversitesi REMER laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Organik bir bileşik olan DMT'nin kimyasal yapısının tayini ve ürünün saflık analizi nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi ve ultra performans sıvı kromatografisi kütle spektrometresi (UPLC-MS) metodları ile yapıldı. NMR spektroskopisi için Xevo TQ-S sistemi, UPLC-MS için Acquity UPLC I-Class sistemi kullanıldı.

DMT molekülünün sentez protokolü şu şekilde gerçekleştirildi; Triptaminin (1 g, 6,24 mmol/l, 1eq) 30 ml tetrahidrofurandaki çözeltisine sodyum triasetoksi borhidrür (5,29 g, 24,96 mmol, 4eq) ilave edildi ve oda sıcaklığında karıştırıldı. Sodyum triasetoksi borhidrürün bir kısmı çözündükten sonra, reaksiyon karışımına paraformaldehit (2,5 ml, 2,53 g, 31,2 mmol) eklendi. İnce tabaka kromatografisi yöntemi ile ürün oluşumu gözlendi. Reaksiyon karışımı diklorometan (%80-100) : metanol (%0-20) çözücü karışımında kolon kromatografisi kullanılarak saflaştırıldı. Beyaz katı, verim: %89. 500 mg DMT 10 ml asetonda ve 200 mg fumarik asit 50 ml asetonda ayrı ayrı kaplarda çözüldükten sonra fumarik asit çözeltisi, DMT çözeltisinin içine damla damla eklendi. Oluşan DMT, fumarat asetonda çözülmediği için beyaz katı halinde çöktü ve çöken ürün filtre edilerek ayrıldı.

NMR spektroskopisi için DMT dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözüldü. UPLC-MS için DMT metanolde çözüldü ve mobil fazlar %1'lik formik asit içerecek şekilde su ve asetonitrilli olarak hazırlandı.

3.4. Yeni Doğan Fare Primer Hipokampal Nöron Kültürü Protokolü

Hipokampal nöronların izolasyonu ve kültürü için postnatal 0 (Farelerin doğduğu gün) ve postnatal 1. gündeki yeni doğan farelerden disekte edilen hipokampus dokuları kullanıldı. Yeni doğan fare primer hipokampal nöron kültürü, daha önce literatürde tanımlanmış olan metodlarda bazı değişiklikler yapılarak yeniden oluşturuldu

ve detayları aşağıda verilen protokol uygulandı (Brewer 1997; Barbari ve ark. 2007; Narita ve ark. 2011; Beaudoin ve ark. 2012; Xu ve ark. 2015).

3.4.1. Yeni Doğan Fare Hipokampus Diseksiyonu

%4 izofluoran (Isoflurane USP, Adeka İlaç San. ve Tic. A.Ş.) inhalasyonu ile genel anestezi altına alınan yeni doğan fareler dekapitasyon ile sakrifiye edildi. Yeni doğan farenin kafası, dekapitasyon sonrası kontaminasyon riskine karşı %70'lik etanol ile dezenfekte edildi ve -20°C'de soğutulmuş, 2 mM Glutamax (Thermo Fisher Scientific, katalog no: 35050061), 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin ve 250 ng/ml amfoterisin (Sigma Aldrich, katalog no: A5955) ilave edilen Hibernate A medium (Thermo Fisher Scientific, katalog no: A1247501) içine hızlıca transfer edildi. Hipokampus diseksiyonu, mikrocerrahide kullanılan stereomikroskop altında yapıldı. Diseksiyonun yapılacağı bölgede kafatası üzerindeki deri üzerine median hatta bir insizyon yapıldı, deri iki yana doğru açılarak uzaklaştırıldı. Ardından kafatası yine orta hattan kesildi ve iki yana doğru açılarak beyin dikkatlice çıkarıldı ve yine -20°C'de soğutulmuş, 2 mM Glutamax, 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin, 250 ng/ml amfoterisinli Hibernate A medium içeren yeni bir petriye aktarıldı. Beyine bulbus olfactorius bölgesinden enine bir kesi yapılarak bu kısım ayrıldı. Ardından hemisferlerin serebellum ile olan bağlantısı kesildi ve sagittal bir insizyonla hemisferler birbirinden ayrıldı. Korteks tabakası alta gelecek şekilde hemisferler besi yeri içinde ters çevrildi ve meningeal doku ince uçlu forseps yardımıyla dikkatlice temizlendi. Bu işlem sonunda her iki temporal bölgeden hipokampuslar dokuya hasar vermemeye özen gösterilerek dikkatlice ayrıldı.

3.4.2. Hücre Kültürü Petrilerinin Hazırlanması

Hücrelerin ekileceği 35 mm çaplı cam tabanlı petriler hücre kültürü protokolünden önce %10'luk poly-D-lysin (Sigma Aldrich, katalog no: P6407) ile kaplandı. Bunun için petrilere, hücrelerin ekileceği cam taban kısmını kaplayacak kadar poly-D-lysin çözeltisi eklendi ve 2 saat boyunca oda sıcaklığında bekletildi. 2 saat sonunda petriler 3'er kez steril distile su ile yıkandı ve ardından hücre ekimine kadar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

3.4.3. Hipokampus Dokusundan Hücre İzolasyonu ve Nöron Kültürü Protokolü

Dokunun diseksiyonundan sonra hücre kültürü protokolü boyunca besi yeri olarak Leibovitz's medium (L15) (Sigma Aldrich, katalog no: L5520) kullanıldı. Çıkarılan hipokampus dokusu küçük parçalara bölündükten sonra doku parçaları 2 mM Glutamax, 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin, 250 ng/ml amfoterisin ve %2 B27 (Thermo Fisher Scientific, katalog no: 17504044) ilave edilen L15 medium (L15-B27) bulunan yeni bir tüpe aktarıldı ve bu tüpe 6 U/ml papain enzimi (Sigma Aldrich, katalog no: P4762) ve 50 µg/mL DNase enzimi (Sigma Aldrich, katalog no: D4513) eklenerek hücreler 45 dakika boyunca +4°C'de enzimatik inkübasyona bırakıldı. Enzimle inkübasyon sonunda doku, önce 1 ml'lik sonra 100 µl'lik pipet uçları ve son olarak da dikkatlice ucu ateşten geçirilerek yumuşatılan pasteur pipeti ile pipetaj yapılarak mekanik olarak parçalandı. Doku homojenatı 800 RPM'de +4°C'de 3 dk sanrifüj edildikten sonra üst sıvı atıldı ve hücreler 50 µg/mL DNase enzimi içeren L15-B27 mediumu içinde oda ısısında 10 dk daha inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tekrar 800 RPM'de +4°C'de 3 dk sanrifüj edildi ve üst sıvı uzaklaştırıldı. Kalan enzimatik aktiviteyi tamamen durdurmak için hücrelerin üzerine %10 fetal sığır serumu (FBS) (Thermo Fisher Scientific, katalog no: 10500064) içeren L15-B27 medium ilave edildi ve 10 dk oda ısısında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından hücreler son olarak 800 RPM'de +4°C'de 3 dk sanrifüj edildi. Sanrifüj sonunda üst sıvı uzaklaştırıldı ve hücrelerin hücre kültürü petrilere ekilmesi aşamasına geçildi. Bu aşamada besi yeri olarak Neurobasal A medium (NBA) (Thermo Fisher Scientific, katalog no: 10888022) kullanıldı. İzole edilen hücrelerin üzerine 2 mM Glutamax, 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin, 250 ng/ml amfoterisin içeren %2 B27 ilaveli NBA medium (NBA-B27) ilave edildi. Hücre süspansiyonundan örnek alınarak hemositometre ile invert mikroskop (AxioZoom invert mikroskop, Zeiss) altında hücre sayımı yapıldı. Hücreler, aksonal ve dendritik oluşumların inceleneceği neurite deneyleri için petri başına 25×10^3 hücre olacak şekilde, western blot çalışması için ise 6 kuyulu hücre kültürü plakalarının her bir kuyusuna 25×10^4 hücre olacak şekilde önceden %10'luk Poly-D-lysin ile kaplanmış olan 35 mm çaplı cam tabanlı hücre kültürü petrilere ekildi.

Hücreler petrilere ekildikten sonra petri tabanına yapışmaları için 1 saat boyunca inkübatörde (37°C, %5 CO₂) tutuldu ve inkübasyon sonunda hücrelerin durumu invert mikroskopta incelenerek hücrelerin petri tabanına tutunup tutunmadığı kontrol edildi. 1 saat sonunda petri tabanına tutunduğu tespit edilen hücreler, aksonal ve dendritik

uzantıların inceleneceği neurite deneyleri için 20 saat (37°C, %5 CO₂) inkübasyona bırakıldı. Petri tabanına tutunan hücreler ekimden 1 saat sonra ve inkübasyon sonunda invert mikroskop ile (AxioZoom invert mikroskop, Zeiss) görüntülenerek morfolojileri takip edildi.

3.5. İnsan Nöroblastoma Hücre Hattı (SHSY-5Y) Kültür Protokolü

SHSY-5Y hücreleri American Type Culture Collection (ATCC)'den temin edildi. Hücrelerin kültüründe besi yeri olarak %10 FBS (Biosera, katalog no: FB-1001H) ve 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin (Biosera, katalog no: XC-A4122) ilaveli Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) (Biosera, katalog no: LM-D1110) kullanıldı ve hücreler ekimden sonra deneyler için 24 saat hücre kültürü inkübatöründe (37°C, %5 CO₂) tutuldu (Tang ve ark. 2005; Xiao ve ark. 2013). Dondurucuda -80 °C'de saklanan hücre stoğu, 37 °C'lik su banyosunda çözündürüldü. Çözündürülen hücreler hızlıca %10 FBS ve 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin ilaveli DMEM (tamamlanmış DMEM) besi yeri içerisine alınarak 1500 RPM'de +4 °C'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası besi yeri üst sıvısı atıldıktan sonra hücre pelleti 15 ml tamamlanmış besi yeri içerisinde çözündürüldü ve 75 cm² yüzey alanına sahip kültür şişesine konularak hücre kültürü inkübatörüne (37°C, %5 CO₂) kaldırıldı. Kültür şişesinde tek katmanlı olacak şekilde büyütülen hücreler, invert mikroskopta takip edildi ve yoğunlukları tüm kültür yüzey alanının %85'ini kapladığında pasaj yapıldı.

Pasaj protokolü için ilk olarak eski besi yeri ortamdan uzaklaştırıldı. Kültür şişesi, 5 ml magnezyum ve kalsiyum içermeyen steril fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile yıkandı ve PBS ortamdan uzaklaştırıldı. Kültür şişesine 3 ml Tripsin-etilendiamintetraasetik asit (EDTA) solüsyonu (Gibco, katalog no: 25200056) eklenerek 3 dk hücre kültürü inkübatörüne (37°C, %5 CO₂) kaldırıldı. Inkübasyon sonunda invert mikroskopta bakılarak yüzeyden kalktığı gözlemlenen hücrelerin üzerine 5 ml tamamlanmış DMEM besi yeri eklenerek hücrelerin birbirinden ayrışması için pipetleme yapıldı. Elde edilen hücre süspansiyonu 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılarak 1500 RPM'de +4 °C'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda üst sıvı çekilerek atıldı. Santrifüj tüpü içerisindeki hücre pelleti üzerine 10 ml tamamlanmış DMEM besi yeri eklenerek pipetleme ile hücrelerin homojen olarak dağılması sağlandı. Hücre süspansiyonundan örnek alınarak hemositometre ile invert mikroskop altında hücre

sayımı yapıldı. Hücreler canlılık deneyleri için 96 kuyulu düz tabanlı hücre kültürü mikro plakalarının her bir kuyusuna 10×10^3 hücre, western blot çalışması için ise 6 kuyulu hücre kültürü plakalarının her bir kuyusuna 25×10^4 hücre olacak şekilde ekildi. Hücreler ekildikten sonra inkübatöre (37°C , %5 CO_2) kaldırıldı ve deney başlangıcına kadar 24 saat fizyolojik inkübasyonda tutuldu.

3.6. İmmünositokimya Protokolü ve Konfokal Mikroskop Görüntülemeleri

Çalışmada yeni doğan fare hipokampal nöron kültüründe, neurite yapılarının incelenmesi, nöron glia ayrımının yapılması ve Sig1-R'nün varlığının mikroskopik yöntemle gösterilmesi amacıyla hücrelere immünositokimya protokolü uygulandı ve indirekt immünofloresan işaretleme metodu kullanıldı.

Görüntülemeler konfokal mikroskopta (LSM 780 NLO konfokal mikroskop, Zeiss) 20X ve 40X objektifler ile gerçekleştirildi. İmmünositokimya protokolü bazı modifikasyonlar yapılarak değiştirildi ve aşağıda detayları verilen metod ile gerçekleştirildi (Tuerxun ve ark. 2010; Enünlü ve ark. 2011; Kimura ve ark. 2013; Li ve ark. 2017).

3.6.1. Fiksasyon

Cam tabanlı petrilere ekilmiş olan hücreler besi yeri uzaklaştırıldıktan sonra PBS (Thermo Fisher Scientific, katalog no: 10010023) ile yıkandı ve ardından %4' lük paraformaldehid (Sigma Aldrich, katalog no: 158127) ile 20 dk oda sıcaklığında fikse edildi. Fiksasyon sonunda 1X PBS ile 3 kez yıkama yapıldı ve hücrelerin permeabilizasyonuna geçildi.

3.6.2. Permeabilizasyon ve Bloklama

Permeabilizasyon için hücreler PBS'te hazırlanmış %0,3'lük Triton X-100 (Sigma Aldrich, katalog no: T8787) ile 20 dk oda sıcaklığında muamele edildi ve işlem sonunda yine 1X PBS ile 3 kez yıkama yapıldı. Yıkama işlemi ardından bloklama aşamasına geçildi, bu aşamada %10 serum içeren PBS ile petrilere 2 saat oda sıcaklığında bloklandı. Bloklamada spesifik olmayan antikor bağlanmalarının önlenmesi için, kullandığımız sekonder antikorların üretildiği hayvana uygun olan keçi serumu (Thermo Fisher Scientific, katalog no: 16210064) kullanılmıştır.

3.6.3. Primer Antikor Uygulaması

Bloklama sonunda blok solusyonu petrilere uzaklaştırılarak PBS ile uygun konsantrasyonda dilüe edilmiş olan primer antikorlar petrilere eklendi. Sig-1R primer antikor (Tavşan poliklonal) (Santa Cruz Biotechnology, katalog no: sc-20935) 1:100, beta tubulin III primer antikor (Fare monoklonal) (Abcam, katalog no: ab7751) 1:500, glial fibriler asidik protein (GFAP) primer antikor (Tavşan poliklonal) (Abcam, katalog no: ab7260) ise 1:2500 oranlarında dilüe edilerek kullanıldı. Primer antikorların eklenmesinin ardından petrilere bir gece +4°C’de nemli ortamda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun sonunda, petrilere 3’er kez 1X PBS ile yıkandı.

3.6.4. Sekonder Antikor Uygulaması

Primer antikor uygulamasının ardından petrilere PBS ile uygun konsantrasyonda dilüe edilmiş olan sekonder antikorlar eklendi. Alexa Fluor® 488 (Keçi anti-fare) (Abcam, katalog no: ab150113) ve Alexa Fluor® 594 (Keçi anti-tavşan) (Abcam, katalog no: ab150080) sekonder antikorlar 1:500 oranında dilüe edilerek uygulandı. Sekonder antikor eklenen petrilere oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda sekonder antikorlar petrilere uzaklaştırıldı ve petrilere her biri 5 dk sürecek şekilde toplam 3 kez 1X PBS ile yıkandı. Son yıkamadan sonra petrilereki PBS çekildi ve yerine 1 ml PBS konuldu.

Hücre nükleuslarının işaretlenmesi için ise görüntülemelerden önce her petriye DAPI (Sigma Aldrich, katalog no: D9542) çekirdek boyası ilave edildi ve 10 dk karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra görüntülemelere geçildi.

3.6.5. Yeni Doğan Fare Hipokampal Nöron Kültüründe Nöron ve Glia Ayırımının Konfokal Mikroskopisi ile Gösterilmesi

Hipokampal nöronlara kültürün 20. saatinde immünohistokimya protokolü uygulandı, indirekt immünofloresan işaretleme ardından konfokal mikroskopisi ile örneklerin görüntülemeleri 20X ve 40X objektifler ile gerçekleştirildi.

Hücre kültüründeki nöronlar, nöronal hücre iskeletine spesifik beta III tubulin primer antikor ile, glial hücreler ise yine bu hücrelerin hücre iskeletine spesifik GFAP primer antikor ile işaretlendi ve petrilere toplamda en az 100 hücre olacak şekilde rastgele seçilen 10 farklı alan 20X objektifle görüntülenerek analiz edildi ardından sayım yapılarak nöron ve glia yüzdeleri hesaplandı.

3.6.6. Yeni Doğan Fare Hipokampal Nöronlarında Sig-1R Varlığının Konfokal Mikroskopi ile Gösterilmesi

Yenidoğan fare hipokampal nöron kültüründe, nöronlarda Sig-1R'nün varlığı ve hücrelerdeki lokalizasyonu indirekt immüno Floresan metod ile tayin edildi.

Hipokampal kültür yapıldıktan 20 saat sonra hücrelere immüno sitokimya protokolü uygulanarak nöronlar nöronal hücre iskeletine spesifik beta III tubulin primer antikoru ve Sig-1R primer antikoru ile işaretlendi. Ardından konfokal mikroskopta 40X objektif ile görüntüleme yapıldı, böylece hipokampal nöronlarda Sig-1R varlığı mikroskopik yöntemle gösterildi.

3.7. Yeni Doğan Fare Hipokampal Nöronlarında ve İnsan Nöroblastoma Hücrelerinde Sig-1R Varlığının Western Blot Tekniği ile Gösterilmesi

Yeni doğan fare hipokampal nöronlarında ve SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde Sig-1R'nün varlığı western blot tekniği ile gösterildi. Western blot çalışması için hücreler, 6 kuyulu hücre kültürü plakasının her bir kuyusuna 25×10^4 hücre olacak şekilde ekildi ve 24 saat inkübasyonda (37°C , %5 CO_2) bırakıldı. İnkübasyon sonunda hücrelerden protein izolasyonu yapılarak western blot protokolüne geçildi. Bu amaçla literatürde belirtilen metod (Yamac ve ark. 2016) üzerinde bazı modifikasyonlar yapılarak aşağıda detayları verilen protokol uygulandı.

3.7.1. Protein İzolasyonu

Deney sonunda, kontrol ve deney gruplarının besi yeri üst sıvıları çekilerek uzaklaştırıldı ve hücreler $+4^\circ\text{C}$ 'de önceden soğutulmuş kalsiyum ve magnezyum içermeyen 1X PBS ile yıkandı. Yıkamanın ardından, önceden soğutulmuş kalsiyum ve magnezyum eklentisi olmayan 1 ml 1X PBS ile pipetaj yapılarak hücrelerin 6 kuyulu hücre kültürü plakası kuyusunun tabanından kalkması sağlandı. Kalkan hücreler, hızlıca kırık buza gömülü 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve ardından 1500 RPM'de 5 dk $+4^\circ\text{C}$ 'de santirifüj edildi. Santrifüj sonrası üst sıvısı atıldıktan sonra hücre pelletleri, 1X proteaz/fosfotaz inhibitör kokteyli (Cell Signaling Technology, katalog no: 5872) içeren lizis tamponu (1M Tris-HCl, 5M NaCl, %0.1 Triton-X-100, 0,5M EDTA) içerisinde çözdürüldü ve kırık buz üzerinde 20 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon esnasında 5 dk'da bir vorteks ile karıştırıldı. İnkübasyon sonunda örnekler 14000 RPM'de 15 dk $+4^\circ\text{C}$ 'de santirifüj edildi ve üst sıvılar kırık buz üzerindeki yeni 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve ölçüm için -20°C dondurucuda saklandı.

3.7.2. Protein konsantrasyonlarının ölçülmesi ve örneklerinin hazırlanması

Protein izolasyonu sonrasında -20°C 'de saklanan örnekler kırık buz üzerinde çözdürüldü. Pipetleme ile homojenize edilen örnekler 1:10 oranında steril ultra saf su ile seyreltilti. Implen nanofotometre cihazı kullanılarak örneklerden protein miktar tayini yapıldı. Miktar tayini sonrası örnekler $10\ \mu\text{l}$ 'de $40\ \mu\text{g}$ protein içerecek şekilde hesaplandıktan sonra Invitrogen NuPAGE (Invitrogen, katalog no: NP0335BOX) kiti protokolüne uygun olarak kit içinde yer alan LDS sample buffer (4x), reducing agent (10x) ve steril ultra saf su ile karıştırıldı. Ardından, 70°C 'de 10 dk ısı bloğunda inkübe edilerek denatürasyon işlemi gerçekleştirildi. İnkübasyon sonunda örnekler hızlıca kırık buza gömüldü.

3.7.3. Western Blot Protokolü

Hazırlanan protein örnekleri, NuPAGE %4-12 Bis-Tris jel ($1\ \text{mm} \times 10\ \text{well}$) (Invitrogen, katalog no: NP0321BOX) jelinin her bir kuyucuğuna $40\ \mu\text{g}/10\ \mu\text{l}$ olacak şekilde yüklenerek $110\ \text{V}$ 'da 15 dk ve sonrasında $150\ \text{V}$ 'da 40 dk olarak yürütülerek elektroforez yapıldı. Elektroforez işlemi bitiminde iBlot (Invitrogen, ABD) cihazı ve iBlot Gel Transfer Stacks transfer kiti (Invitrogen, katalog no: IB401001) kullanılarak jellerdeki proteinlerin poliviniliden diflorit (PVDF) membranlara transferi gerçekleştirildi. PVDF membranlar jel boyutlarında kesildikten sonra, 1X tris borik asit salin-Triton-X-100 (TBS-T) tamponu ile hazırlanmış %5'lik yağsız süt tozu çözeltisinde (ChemCruz, katalog no: sc-2325) 1 saat blokladı. Bloklama sonunda, Sig-1R reseptörü primer antikoru (Tavşan poliklonal) (Santa Cruz Biotechnology, katalog no: sc-20935) 1:250 ve beta aktin primer antikoru (Fare monoklonal) (Cell Signaling Technology, katalog no: 3700) 1:1000 oranında bloklama solüsyonu içerisinde dilüe edilerek membrana uygulandı ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bir gece karıştırıcıda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda membranlar, 1X TBS-T solüsyonu ile 3 kez 5'er dk yıkandı. Yıkama işleminin ardından, bloklama solüsyonu içerisinde 1:2500 oranında seyreltilerek hazırlanan HRP konjuge anti-tavşan (Cell Signaling Technology, katalog no: 7074) ve HRP konjuge anti-fare (Cell Signaling Technology, katalog no: 7076) sekonder antikolar membranlara uygulanarak oda sıcaklığında ve karanlıkta 1 saat inkübasyona bırakıldı.

Bantların görüntülenmesinde Novex ECL HRP Chemiluminescent Substrate Reagent Kit deteksiyon solüsyonu (Invitrogen, katalog no: WP20005) kullanıldı ve

ChemIDoc MP (Biorad, ABD) görüntüleme sistemi kullanılarak görüntülendi. Western blot sonunda elde edilen görüntüleme sonuçları ImageJ programı kullanılarak analiz edildi.

3.8. Hipokampal Nöronlarda Neurite Oluşumu Deneylerinin Protokolü

Hipokampal nöron kültürü yapıldıktan sonra hücreler hemositometre ile invert mikroskop altında sayıldı ve hücreler neurite deneyleri için petri başına 25×10^3 hücre olacak şekilde önceden Poly-D-lizin ile kaplanmış olan 35 mm çaplı cam tabanlı petrilere ekildi. Hücreler petrilere ekildikten sonra petri tabanına yapışmaları için 1 saat boyunca inkübatörde (37°C , %5 CO_2) tutuldu. Neurite deneyi için, hücreler kültür edilip petrilere ekildikten ve petri tabanına yapıştıktan hemen sonra, her bir deney grubuna neurite oluşumu üzerindeki etkileri test edilecek DMT veya etkisinin karşılaştırılacağı Sig-1R selektif sentetik agonist SA4503 eklendi ve petrilere inkübatöre (37°C , %5 CO_2) kaldırılarak 20 saatlik inkübasyona bırakıldı (Kimura ve ark. 2013). Sig-1R antagonisti NE100 ve IP3R antagonisti Xestesspongin C, antagonistik etkilerinin ortaya çıkması için deney gruplarına DMT ve Sig-1R agonisti SA4503 uygulamasından 30 dk önce eklendi (Li ve ark. 2017). 30 dk'lık antagonist uygulamasından sonra deney gruplarına DMT molekülü veya SA4503 eklenerek hücreler inkübatöre (37°C , %5 CO_2) kaldırıldı.

İnkübasyonun 20. saatinde deney sonlandırıldı ve hücreler fikse edilerek immünositokimya protokolüne geçildi. Neurite oluşumunu gözlemlediğimiz deney, tüm gruplar için toplam 5 kez tekrar edildi.

3.9. Yeni Doğan Fare Hipokampal Nöronlarında Neurite Oluşumunun Analiz Edilmesi

Neurite deneyi sonunda hücrelere immünositokimya protokolü uygulandı ve neurite yapıları, nöronal hücre iskeletine spesifik bir markır olan ve neurite yapılarının gösterilmesi ve analizinde sıklıkla kullanılan beta III tubulin primer antikoru ile indirekt immünofloresan metod kullanılarak işaretlendi. Görüntülemeler konfokal mikroskopta 20X objektif ile gerçekleştirildi. Her deney grubu için toplamda en az 100 hücre sayılmak üzere her petriden rastgele seçilen 10 farklı alandan görüntü alındı. Sadece hücre gövdesi boyunda ve daha uzun olan neurite yapıları sayıma dahil edildi, boyu hücre gövdesinden daha kısa olanlar sayım dışında bırakıldı.

Neurite içeren hücrelerin yüzde cinsinden değeri, tüm gruplar için her bir görüntüde neurite yapısı oluşturmuş olan hücrelerin sayılarak toplam hücre sayısına

oranlanması ile hesaplandı (Ishima ve ark. 2008; Nishimura ve ark. 2008; Kimura ve ark. 2013; Li ve ark. 2017). Hücre gövdesi ve neurite boyu ölçümleri, konfokal mikroskopi görüntülemelerinde kullanılan yazılım ile (Zen 2.3 blue edition, Carl Zeiss Microscopy) yapıldı. Neurite oluşumu analizlerinde hesaplama için kullanılan formül şu şekildedir: Neurite içeren hücrelerin yüzdesi = [Neurite içeren hücre sayısı / Toplam hücre sayısı] x 100

3.10. Canlılık Deneyi Protokolü ve Hidrojen Peroksit Toksikite Modeli

3.10.1. Toksik Hidrojen Peroksit Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Kültür yapıldıktan sonra SHSY-5Y hücreleri pasaj protokolüne alındı. Hücreler hemositometre ile invert mikroskop altında sayıldı ve 96 kuyulu düz tabanlı hücre kültürü mikro plakalarının her bir kuyusuna 10×10^3 hücre olacak şekilde ekildi. Hücreler ekildikten sonra inkübatöre (37°C, %5 CO₂) kaldırıldı ve 48 saat fizyolojik inkübasyonda tutuldu. İnkübasyon sonunda hücrelerin üzerine, 50 µM, 100 µM, 200 µM, 300 µM, 400 µM ve 500 µM dozlarda H₂O₂ (Merck, katalog no: 108597) eklendi. Kontrol grubuna ise H₂O₂ eklenmedi. H₂O₂ dozları %30'luk H₂O₂ stoğundan taze olarak hazırlandı. 24 saat H₂O₂ ile inkübe edilen hücrelerin canlılığı bu sürenin sonunda laktat dehidrogenaz (LDH) kiti (Sigma Aldrich, katalog no: 11644793001) ile ölçüldü ve kontrol grubuna göre toksisiteyi %50 arttıran toksik H₂O₂ dozu belirlendi.

3.10.2. Deneyde Kullanılan Moleküllerin ve Dozlarının Tek Başına Toksik Etkilerinin Değerlendirilmesi

H₂O₂ toksisitesi modelinde DMT'nin nöroprotektif etkileri araştırılmadan önce, deneylerde kullanılacak DMT, Sig-1R selektif sentetik agonisti SA4503 ve Sig-1R selektif antagonisti NE100'ün deneylerde kullanılacak olan dozlarının hücreler üzerinde toksik bir etkisinin olup olmadığını araştırmak adına bir ön çalışma yapıldı. Bu amaçla, SHSY-5Y hücreleri 96 kuyulu düz tabanlı hücre kültürü mikro plakalarının her bir kuyusuna 10×10^3 hücre olacak şekilde ekildi. Hücreler ekildikten sonra inkübatöre (37°C, %5 CO₂) kaldırıldı ve 48 saat fizyolojik inkübasyonda tutuldu. İnkübasyon sonunda hücrelerin üzerine, 10 ve 100 µM dozlarda DMT, 10 ve 100 µM dozlarda Sig-1R selektif agonisti SA4503 ve 10 µM dozda Sig-1R selektif antagonisti NE100 eklendi ve hücreler 24 saat boyunca bu moleküller ile fizyolojik inkübasyona bırakıldı. Hücrelerin canlılığı bu sürenin sonunda LDH testi ile ölçüldü ve toksik etkileri değerlendirildi.

3.10.3. Canlılık Deneyi ve Hidrojen Peroksit Toksikite Modeli Protokolü

Hidrojen peroksit toksisitesinin oluşturulması için literatürde daha önce belirtilen metodlar referans alınarak yeni bir protokol oluşturuldu (Tuerxun ve ark. 2010; Feng ve ark. 2016; Cheng ve ark. 2017). Kültür yapıldıktan sonra SHSY-5Y hücreleri pasaj protokolüne alındı. Hücreler hemositometre ile invert mikroskop altında sayıldı ve canlılık deneyleri için 96 kuyulu düz tabanlı hücre kültürü mikro plakalarının her bir kuyusuna 10×10^3 hücre ekildi. Hücreler ekildikten sonra inkübatöre (37°C , %5 CO_2) kaldırıldı ve 24 saat fizyolojik inkübasyonda tutuldu. Kültürdeki 24 saat sonunda antagonist eklenecek deney gruplarına, antagonistik etkisinin ortaya çıkması için Sig-1R antagonisti NE100 eklendi. 30dk'lık antagonist uygulamasından sonra tüm deney gruplarına DMT veya SA4503 belirlenen dozlarda eklenerek hücreler tekrar 24 saat inkübasyona (37°C , %5 CO_2) bırakıldı. DMT ve SA4503 ile 24 saatlik inkübasyonun sonunda, hücrelere uygun toksik dozu ön çalışmalarda belirlenmiş olan $400 \mu\text{M}$ dozda H_2O_2 eklenerek 24 saat boyunca tekrar inkübe edildiler. 24 saatlik H_2O_2 toksisitesine maruz bırakılan hücrelerin canlılığı bu sürenin sonunda LDH testi ile ölçüldü. Kontrol ve deney ve grupları, hücre kültürü mikro plakalarında 3'er tekrarlı gruplar halinde oluşturuldu ve deney toplamda 3 kez tekrar edildi.

3.11. Hücre Canlılığının Invert Mikroskop ile Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi

Kontrol ve deney gruplarının H_2O_2 toksisitesine maruz bırakılmadan önce ve sonra invert mikroskop kullanılarak 20X objektif ile görüntülemeleri yapıldı ve SHSY5Y hücrelerinin morfolojileri bu görüntüler üzerinden değerlendirildi.

3.12. LDH Testi ile Hücre Canlılığının Analizi

Çalışmada hücrelerin canlılığı ticari olarak satılan LDH kiti (Sigma Aldrich, katalog no: 11644793001) kullanılarak tayin edildi. LDH testi kit içinde belirtilen protokole göre gerçekleştirildi. LDH testi ölen ve membranı hasarlanmış hücrelerden, hücre kültürü besi yerine salınan LDH miktarını kolorimetrik olarak ölçmeye dayalı bir yöntemdir. LDH, tüm hücrelerde bulunan stabil bir sitoplazmik enzimdir. Plazma zarının hasar görmesi ile birlikte hücre kültüründeki besi yerine salınır ve besi yerindeki LDH aktivitesinin ölçümü ile hücre canlılığı tespit edilir. Bu test ile LDH aktivitesi, hücre kültürü besi yerinde kolorimetrik yöntem kullanılarak bir mikropilaya okuyucu (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay/ELISA okuyucu) cihaz kullanılarak ölçülür.

Canlılık deneyi sonunda, hücre kültüründe her deney grubundan hücre içermeyecek şekilde dikkatlice pipet yardımı ile çekilen besi yeri üst sıvısı, yeni bir 96 kuyulu düz tabanlı mikro plakanın kuyularına transfer edildi. Her bir deney ve kontrol grubundan alınan besi yeri üst sıvısı 3 tekrar olacak şekilde 3'er li gruplar halinde kuyulara ekildi. Ardından kit içerisinde bulunan katalist ve boya solüsyonları kitte belirtilen oranlarda karıştırılarak reaksiyon karışımı hazırlandı. Taze olarak hazırlanan reaksiyon karışımı mikro plakaya aktarılmış olan besi yeri üst sıvılarının üzerine eklenerek 30 dakika boyunca oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda LDH aktivitesi ELISA okuyucuda (Chromate Reader 4300, ABD) 492 nm dalga boyuna karşı okutulmuş absorptans değerleri analiz edildi ve yüzde toksisite değerleri hesaplandı.

Üçer tekrarlı kontrol ve deney gruplarının absorptans değerlerinin ortalamaları alındıktan sonra bu ortalama absorptans değerlerinden hücre içermeyen saf besi yerinin absorptansı çıkarılarak değerler normalize edildi ve yüzde toksisite değerleri hesaplandı. Yüzde toksisite değerlerinin hesaplanmasında, [Deney grubu ortalama absorptansı - Saf besi yeri absorptansı / Kontrol grubu ortalama absorptansı - Saf besi yeri absorptansı] X 100 formülü kullanıldı. Kontrol grubunda bazal seviyedeki toksisite %100 kabul edilerek, diğer deney gruplarının toksisitesi kontrol grubuna göre hesaplandı.

3.13. Total Oksidan Kapasite Ölçümü

Çalışmada total oksidan kapasite (TOS) ölçümü için ticari olarak satılan Total Oxidant Status Assay Kit (Rel Assay Diagnostic, katalog no: RL0024) kullanıldı. TOS analizi kit içinde belirtilen protokole göre gerçekleştirildi. Total oksidan kapasite ölçümü için, 96 kuyulu düz tabanlı mikro plakalar, kontrol ve deney grupları için 3 tekrar olacak şekilde 3'er li gruplar halinde dizayn edilerek, her kuyucuğa önce assay buffer eklendi. Ardından tüm kuyulara kite uygun olarak hazırlanan çalışma solüsyonundan ya da hücre içermeyecek şekilde dikkatlice pipet yardımı ile kontrol ve deney gruplarından çekilen besi yeri üst sıvısı koyularak pipetleme ile karıştırıldı. Karıştırma işleminden sonra tüm kuyucuklara kromojen solüsyonu eklenerek tekrar pipetleme yapıldı. Karanlıkta ve oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildikten sonra ELISA okuyucu ile 530 nm dalga boyunda absorptans ölçümü yapıldı.

Total oksidan kapasite değerlendirmesi için, üçer tekrarlı deney ve kontrol gruplarının absorptans değerlerinin ortalamaları alındıktan sonra bu ortalama absorptans

değerlerinden değerlerinden hücre içermeyen saf besi yerinin absorbanı çıkarılarak değerler normalize edildi ve bu değerler analizlerde kullanıldı.

3.14. Verilerin İstatistiksel Analizi

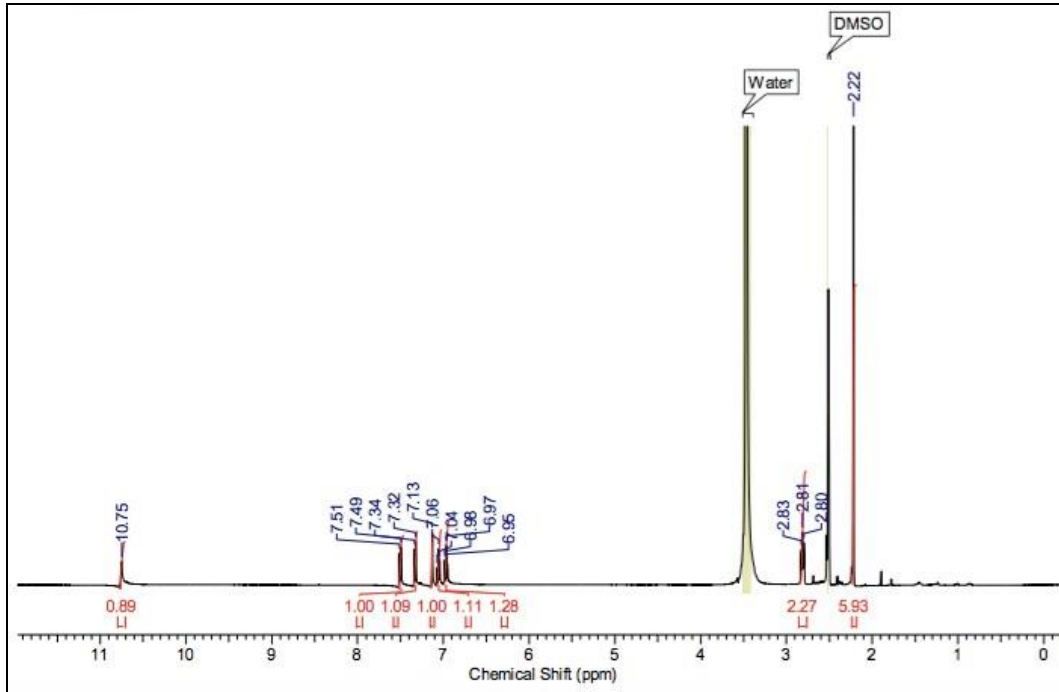
Tüm veriler ortalama \pm standart sapma şeklinde ifade edildi. İstatistiksel analizler tek-yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) ile post hoc Bonferroni testi kullanılarak yapıldı. Analizler SPSS (version 18, IBM, ABD) programı ile gerçekleştirildi. Tüm deney grupları için $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



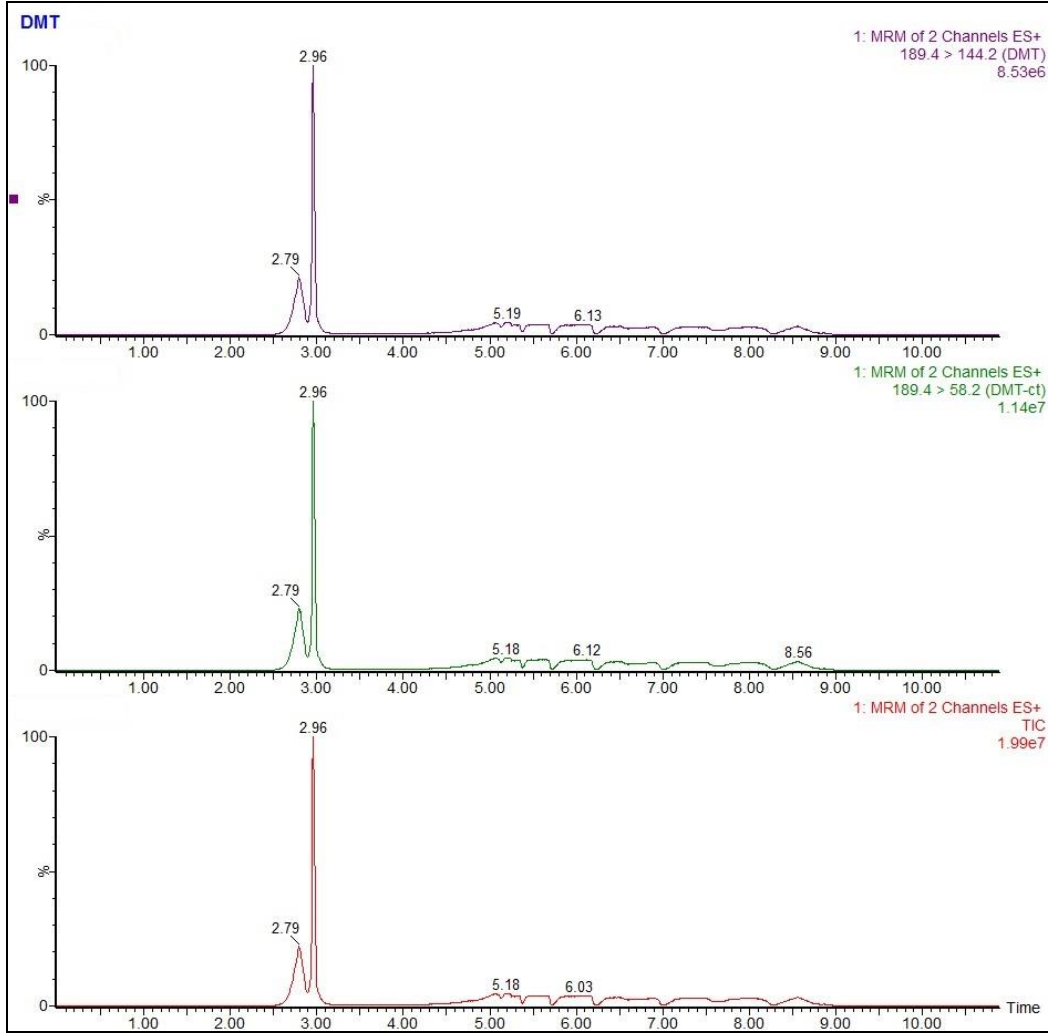
4. BULGULAR

4.1. DMT Molekülünün Nükleer Magnetik Rezonans Spektroskopisi (NMR) ve Ultra-performans Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometrisi (UPLC-MS) Bulguları

Sentez sonrasında DMT molekülünün kimyasal yapısı ve saflığı NMR ve UPLC-MS metodları ile tespit edildi ve DMT'nin saf olarak elde edildiği görüldü. DMT'nin NMR spektrumu Şekil 4.1'de ve UPLC-MS kromatogramı Şekil 4.2'de verilmiştir.



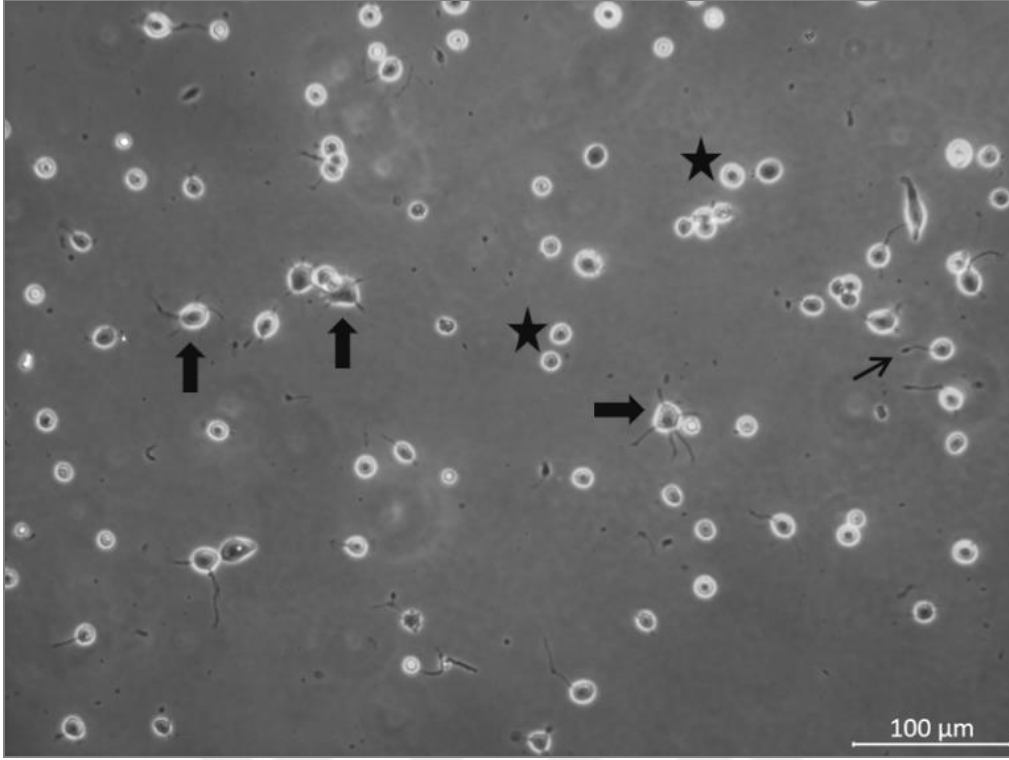
Şekil 4-1: DMT'nin NMR Spektrumu.



Şekil 4-2: DMT'nin UPLC-MS Kromatogramı.

4.2. Yeni Doğan Fare Hipokampal Nöronlarının Invert Mikroskopta Morfolojik Olarak Değerlendirilmesine Ait Bulgular

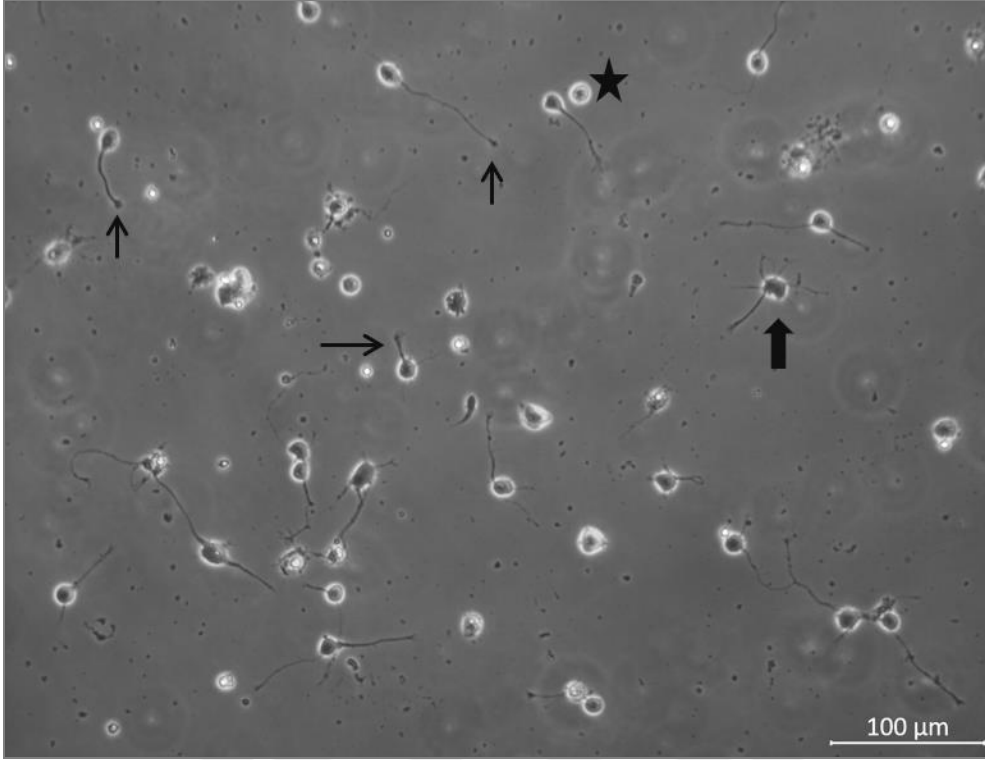
Hipokampal nöronların kültürdeki 1. saatlerinde cam tabanlı hücre kültürü petrisinin tabanına tutunduğu tespit edildi. Bazı hücrelerin henüz neurite yapısı oluşturmadığı ve sessiz olduğu gözlemlendi. Nöronların bazılarının yaklaşık eş boylarda ve birden fazla neurite yapısına sahip olduğu görüldü. Neurite yapılarının ucunda bulunan büyüme konileri de (Şekil 4.3) gözlemlendi.



Şekil 4-3: Hipokampal nöronların kültür ortamına ekildikten 1 saat sonraki morfolojileri.

Yıldız neurite yapısı içermeyen nöronları, kalın ok eş boyda birden fazla neurite içeren nöronları, ince ok ise neurite ucunda bulunan büyüme konisini göstermektedir. Büyütme: X20; bar=100 μ m

Kültürdeki 20. saatlerinde hipokampal nöronların büyük bir kısmının neurite yapılarına sahip olduğu, az miktarda hücrenin sessiz kalarak henüz neurite yapısı uzatmadığı gözlemlendi. Nöronların bazıları birden fazla ve yaklaşık eş boydaki neurite yapılarına sahipken, bazı nöronlarda muhtemel akson yapısını oluşturacak olan bir neurite yapısının diğerlerine göre çok daha fazla uzamış olduğu tespit edildi. Kültürdeki 1. saatte olduğu gibi 20 saatlik hücrelerde de neurite yapılarının uç kısmında bulunan büyüme konileri (Şekil 4.4) görüldü.

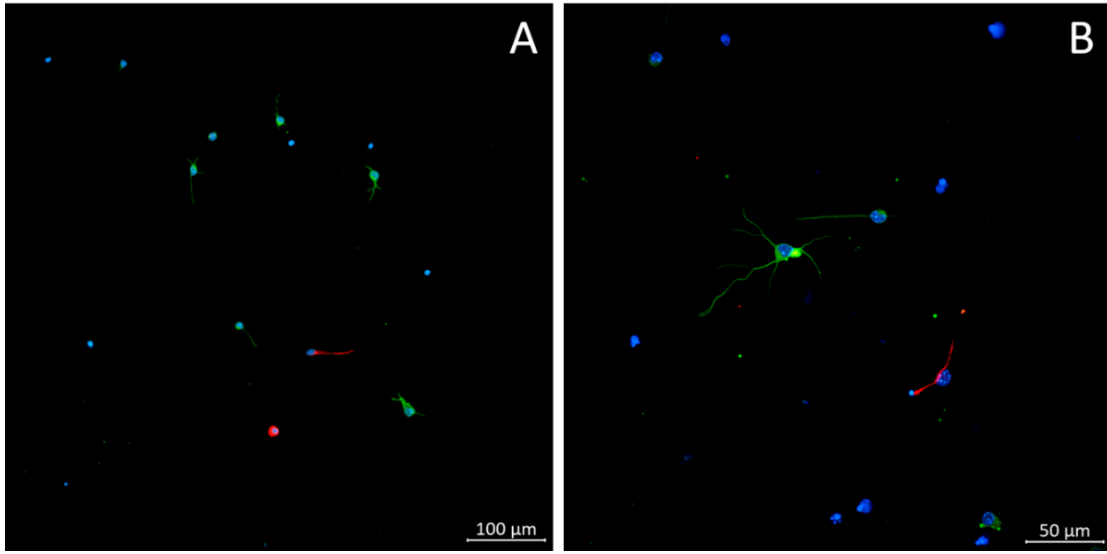


Şekil 4-4: Hipokampal nöronların kültür ortamına ekildikten 20 saat sonraki morfolojileri.

Yıldız neurite yapısı içermeyen nöronları, kalın ok birden fazla neurite içeren nöronları, ince ok ise neurite ucunda bulunan büyüme konisini göstermektedir. Büyütme: X20; bar=100 μm

4.3. Yeni Doğan Fare Hipokampal Nöron Kültüründe Nöron ve Glia Ayrımının Konfokal Mikroskopi ile Gösterilmesine Ait Bulgular

Nöronlara ve glial hücrelere spesifik primer antikorların kullanılması ile hazırlanan örnekler konfokal mikroskopta incelendiğinde, kültürün yüksek oranda nöron ve çok az sayıda glia içerdiği (Şekil 4.5) gözlemlendi. Konfokal mikroskopi görüntüleri üzerinden yapılan sayımların sonucunda kültürün %98 oranında nöron içerdiği tespit edildi.

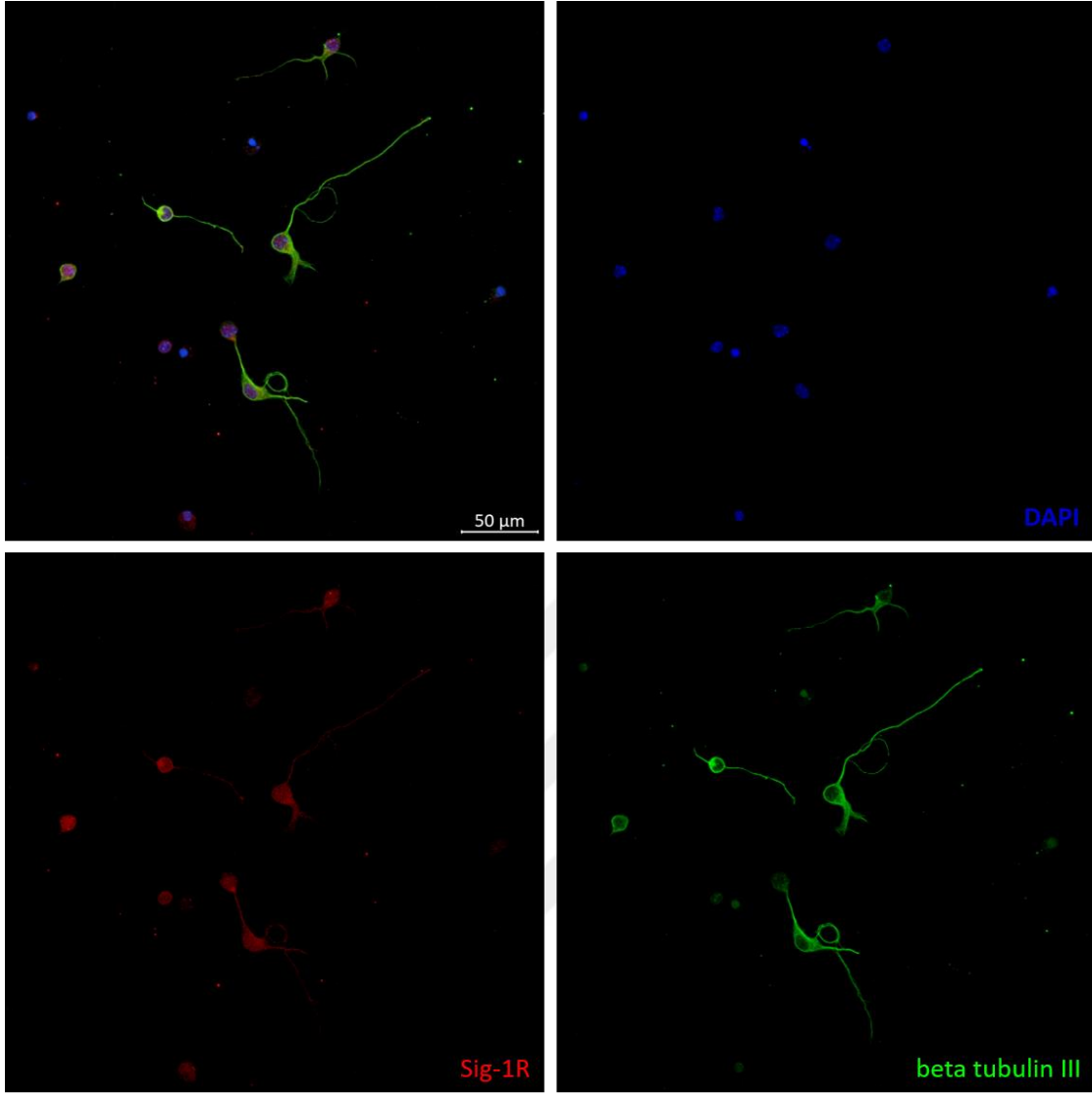


Şekil 4-5: Hipokampal kültürün 20. saatinde indirekt immünohistokimya metodu ile işaretlenen nöron ve glialar.

Nöronal hücre iskeletine spesifik beta III tubulin primer antikoruna ile işaretlenen nöronlar yeşil, glial hücre iskeletine spesifik GFAP primer antikoruna ile işaretlenen glial hücreler ise kırmızı renkte görülmektedir. Mavi renkte görülen hücre çekirdekleri DAPI ile işaretlenmiştir. (A) Büyütme: X20; bar=100 µm. (B) Büyütme: X40; bar=50 µm

4.4. Yeni Doğam Fare Hipokampal Nöronlarında Sig-1R'nün Konfokal Mikroskopisi ile Gösterilmesine Ait Bulgular

Yenidoğan fare hipokampal nöronlarında Sig-1R'nün varlığı ve hücrelerdeki lokalizasyonu indirekt immüno Floresan metod ile tayin edildi. Sig-1R'nün nöronlarda hücre gövdesi ve neurite yapılarında yaygın olarak lokalize olduğu Şekil 4.6'da görülmektedir.

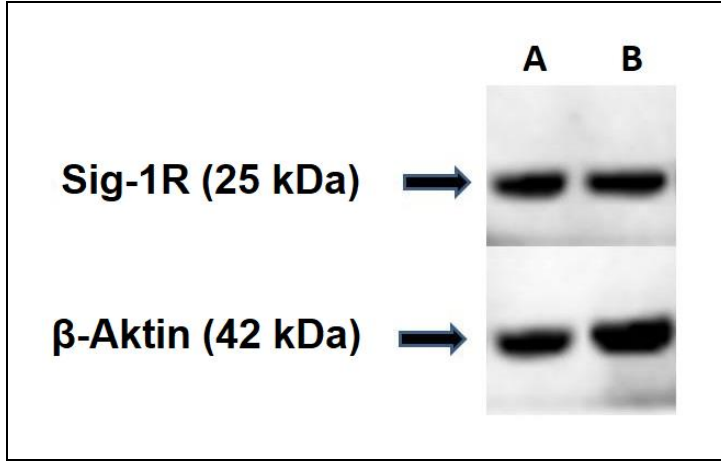


Şekil 4-6: Hipokampal nöronlarda Sig-1R'nün indirekt immünohistokimya metodu ile gösterilmesi.

Nöronal hücre iskeletine spesifik beta III tubulin ile işaretli nöronlar yeşil, Sig-1R kırmızı ve DAPI ile işaretli hücre çekirdekleri mavi renkte görülmektedir. Büyütme: X40; bar=50 μ m.

4.5. Yeni Doğan Fare Hipokampal Nöronlarında ve İnsan Nöroblastoma Hücrelerinde Sig-1R'nün Western Blot Tekniği ile Gösterilmesine Ait Bulgular

Hücrelerde Sig-1R'nün varlığı, western blot tekniği ile gösterildi. Primer hipokampal nöronlara ve insan nöroblastoma hücrelerine ait Sig-1R protein bantları Şekil 4.7.'de görülmektedir.



Şekil 4-7: Yenidoğan fare hipokampal nöronlarında ve insan nöroblastoma hücrelerinde Sig-1R'nün varlığının western blot tekniği ile gösterilmesi.

Hipokampal nöronlarda (A) ve insan nöroblastoma hücrelerinde (SH-SY5Y hücre hattı) (B) Sig-1R ve β -aktin protein bantlarının görüntüsü görülmektedir.

4.6. Yeni Doğan Fare Hipokampal Nöronlarında Neurite Oluşumunun Değerlendirilmesine Ait Bulgular

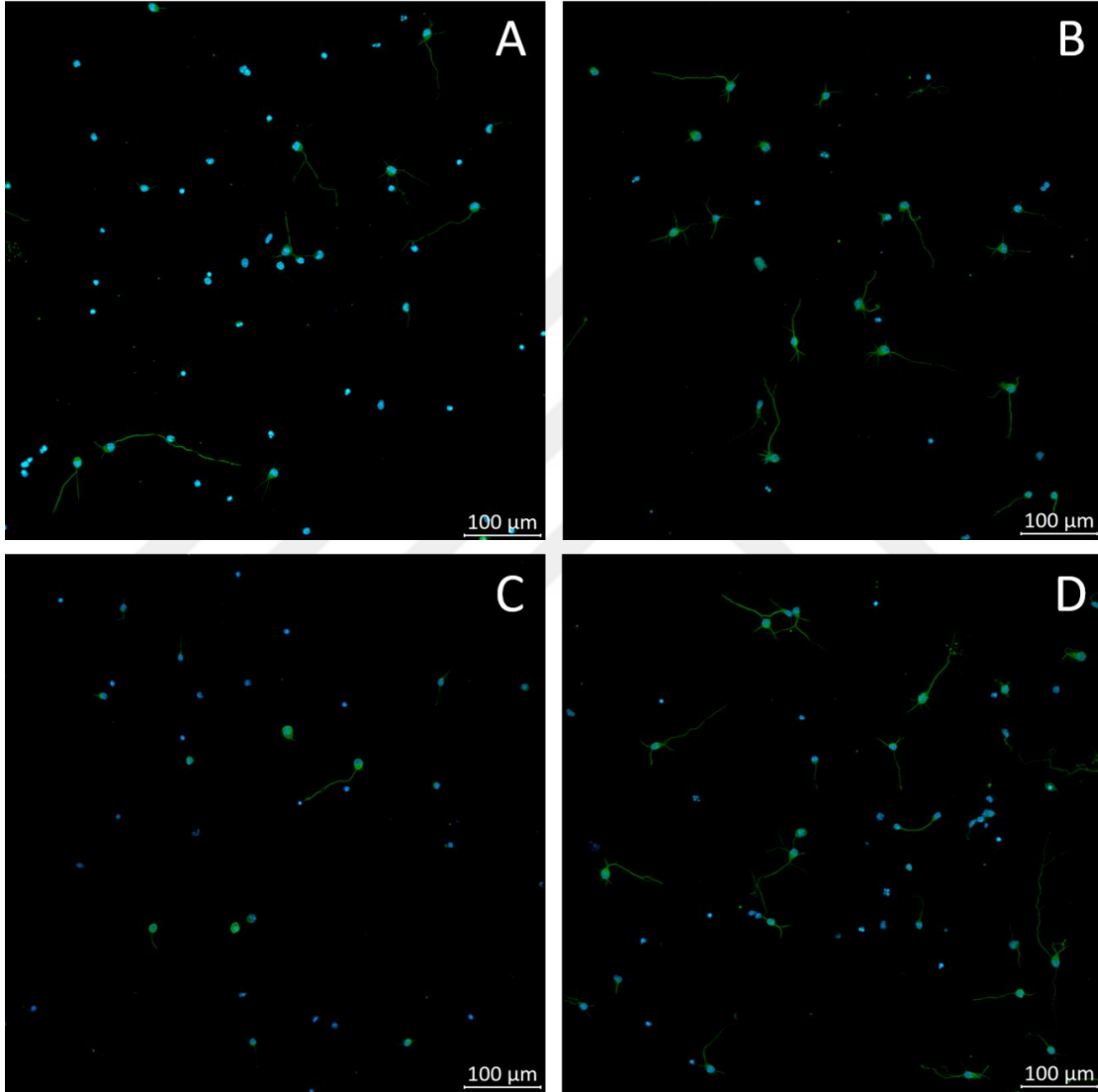
Kontrol grubu ile kıyaslandığında DMT'nin 10 μ M dozda uygulanmasının neurite oluşumunu anlamlı derecede arttırdığı (Şekil 4.12) gözlemlendi ($p < 0,05$). Sig-1R selektif sentetik agonisti SA4503 uygulamasının da kontrol grubuna göre neurite oluşumunu anlamlı derecede arttırdığı (Şekil 4.12) gözlemlendi ($p < 0,001$). DMT'nin 100 μ M dozda uygulanmasının ise neurite oluşumunu kontrole göre anlamlı derecede düşürdüğü (Şekil 4.12) görüldü ($p < 0,001$). Kontrol grubu, DMT 10 μ M, DMT 100 μ M grubu ve SA4503 gruplarına ait konfokal mikroskop görüntüleri Şekil 4.8'de görülmektedir.

DMT'nin 10 μ M dozu ve SA4503'ün aynı dozda neurite oluşumu üzerindeki etkisi birbiriyle kıyaslandığında, DMT'nin bu dozda bir endojen ligand olarak sentetik Sig-1R ligandı kadar etkili olduğu ancak iki grup arasında istatistik olarak anlamlı bir fark olmadığı (Şekil 4.12) tespit edildi.

Sig-1R antagonisti NE100'ün ve IP3R antagonisti Xestospongine C'nin, DMT'nin 10 μ M dozdaki neurite oluşumunu artırıcı etkisini anlamlı derecede azalttığı (Şekil 4.9 ve Şekil 4.12) görüldü ($p < 0,001$). DMT'nin 100 μ M dozda uygulandığı grupta da, Sig-1R antagonisti NE100'ün neurite oluşumunu anlamlı derecede azalttığı öte yandan IP3R antagonisti Xestospongine C'nin ise anlamlı bir değişikliğe yol

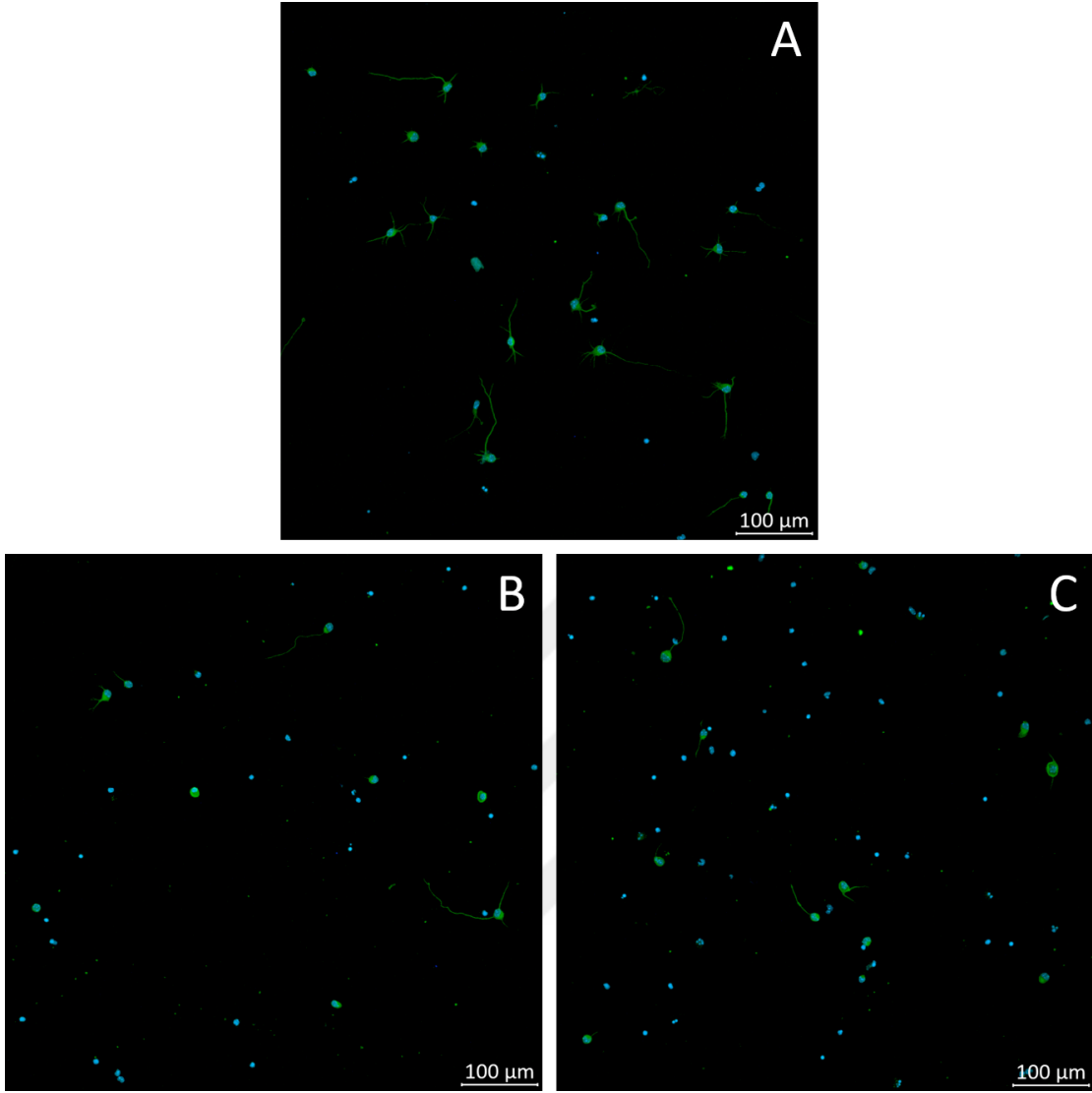
açmadığı (Şekil 4.10 ve Şekil 4.12) tespit edildi. NE100 ve Xestospongin C uygulamasının sentetik agonist SA4503 uygulanan grupta da neurite oluşumunu anlamlı derecede azalttığı (Şekil 4.11 ve Şekil 4.12) gözlemlendi ($p<0,001$).

Tüm veriler Tablo 4.1’de ortalama ve \pm standart sapma şeklinde verilmiştir.



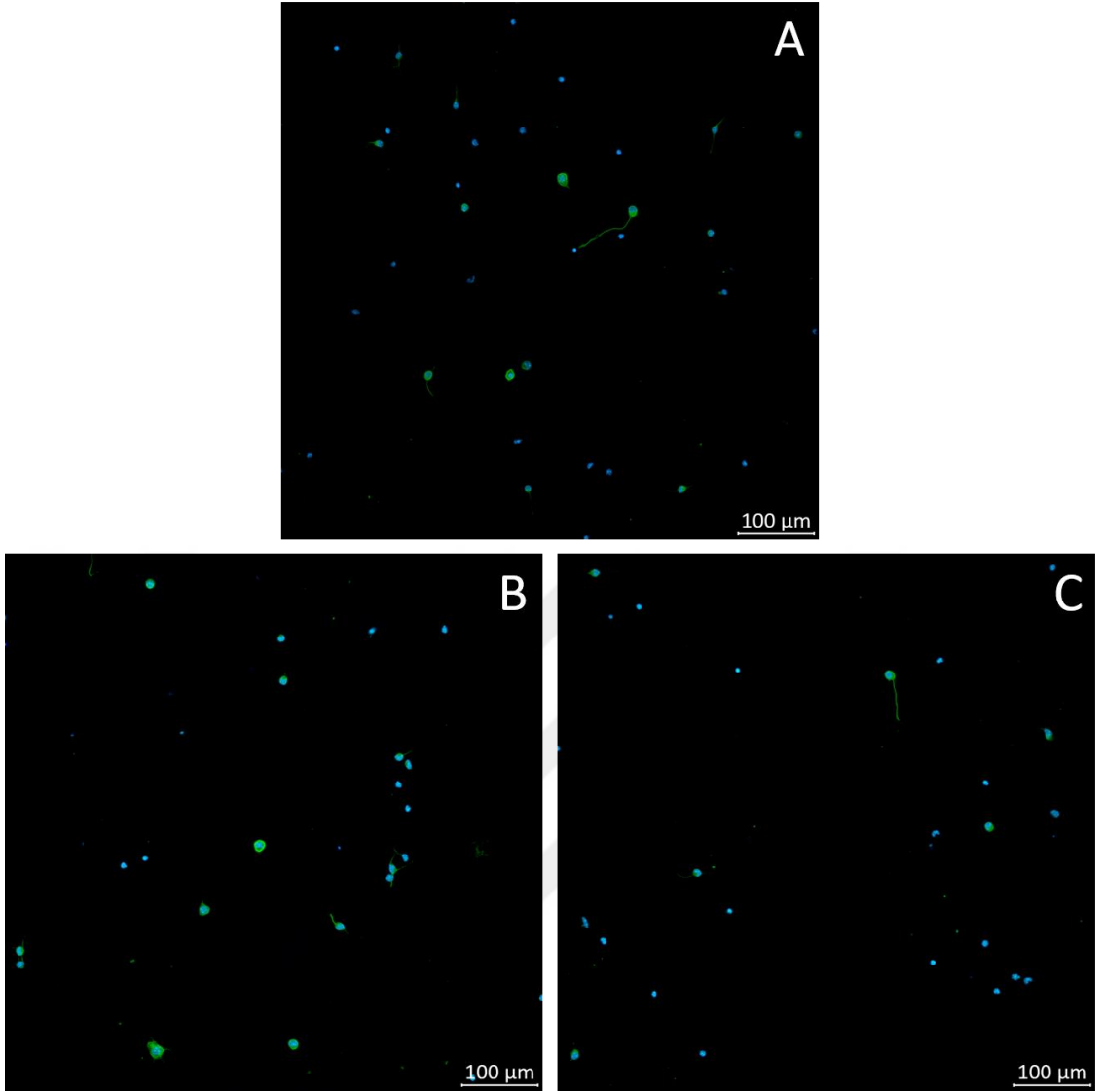
Şekil 4-8: Kontrol, DMT 10 µM, DMT 100 µM ve SA4503 gruplarında hipokampal nöronların neurite yapılarını gösteren konfokal mikroskop görüntüleri

Beta III tubulin ile işaretli nöronlar ve neurite yapıları yeşil, DAPI ile işaretli hücre çekirdekleri mavi renkte görülmektedir. Büyütme: X20; bar=100 µm. (A) Kontrol grubu (B) DMT 10 µM grubu (C) DMT 100 µM grubu (D) SA4503 grubu



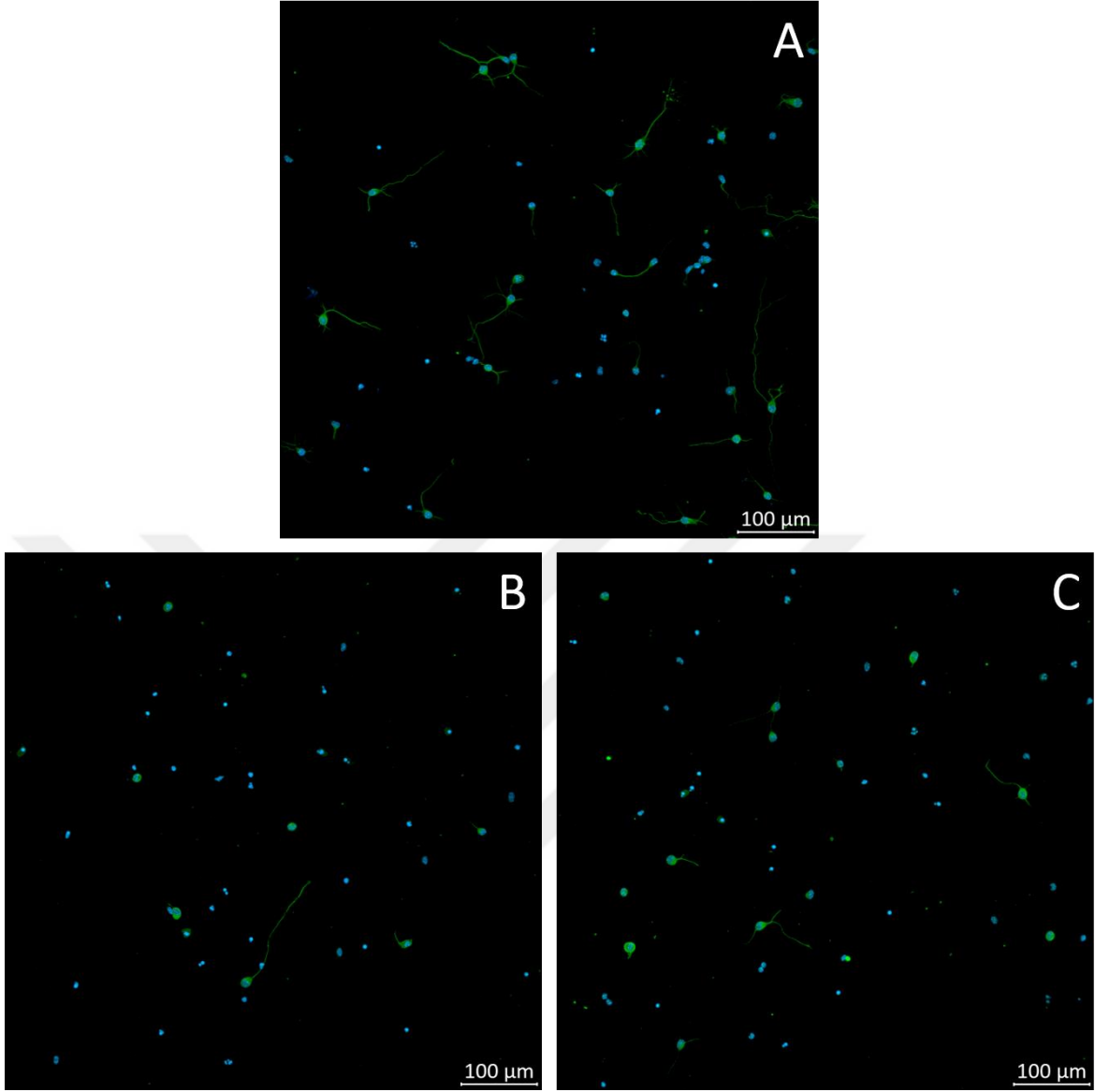
Şekil 4-9: DMT 10 μM, DMT 10 μM-NE100 ve DMT 10 μM-XEST.C gruplarında hipokampal nöronların neurite yapılarını gösteren konfokal mikroskop görüntüleri

Beta III tubulin ile işaretli nöronlar ve neurite yapıları yeşil, DAPI ile işaretli hücre çekirdekleri mavi renkte görülmektedir. Büyütme: X20; bar=100 μm. (A) DMT 10 μM grubu (B) DMT 10 μM-NE100 grubu (C) DMT 10 μM-XEST.C grubu



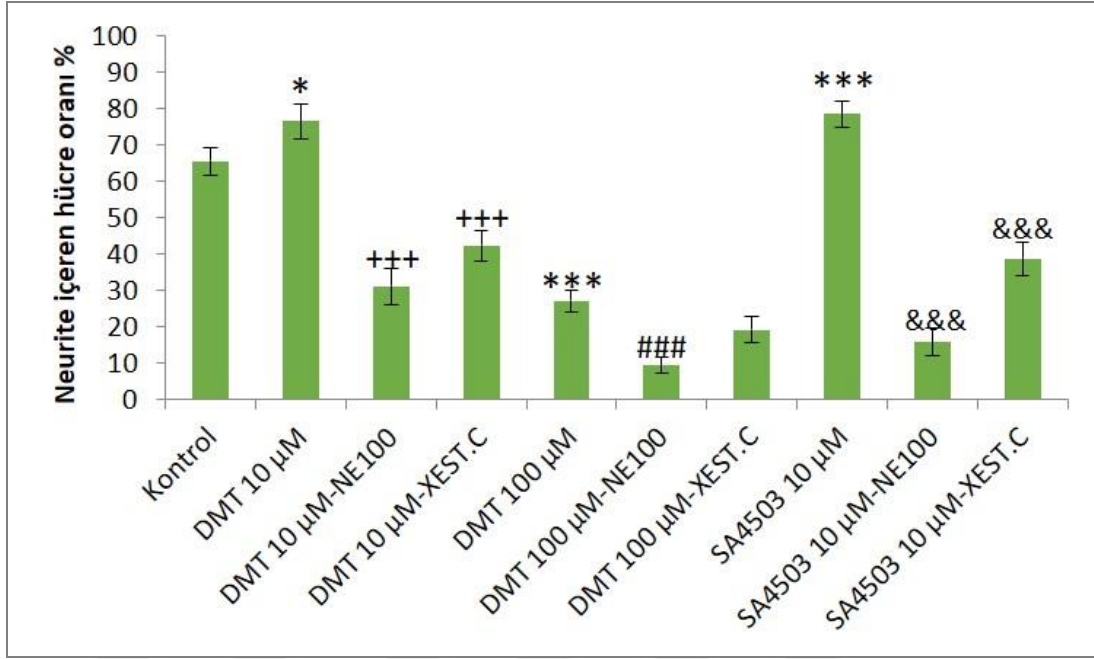
Şekil 4-10: DMT 100 µM, DMT 100 µM-NE100 ve DMT 100 µM-XEST.C gruplarında hipokampal nöronların neurite yapılarını gösteren konfokal mikroskop görüntüleri

Beta III tubulin ile işaretli nöronlar ve neurite yapıları yeşil, DAPI ile işaretli hücre çekirdekleri mavi renkte görülmektedir. Büyütme: X20; bar=100 µm. (A) DMT 100 µM grubu (B) DMT 100 µM-NE100 grubu (C) DMT 100 µM-XEST.C grubu



Şekil 4-11: SA4503, SA4503-NE100 ve SA4503-XEST.C gruplarında hipokampal nöronların neurite yapılarını gösteren konfokal mikroskop görüntüleri

Beta III tubulin ile işaretli nöronlar ve neurite yapıları yeşil, DAPI ile işaretli hücre çekirdekleri mavi renkte görülmektedir. Büyütme: X20; bar=100 µm. (A) SA4503 grubu (B) SA4503-NE100 grubu (C) SA4503-XEST.C grubu



Şekil 4-12: Yeni doğan fare hipokampal nöronlarında DMT'nin neurite oluşumu üzerine etkisinin değerlendirilmesi.

Deneyler tüm deney grupları için beşer kez tekrar edildi (n=5). Kontrol grubuna kıyasla * p<0,05, ***p<0,001. DMT 10 µM grubuna kıyasla +++ p<0,001. DMT 100 µM grubuna kıyasla p<0,001. SA4503 grubuna kıyasla &&& p<0,001.

Tablo 4-1: Neurite oluşumu deneylerinin ortalama ve standart sapma değerleri.

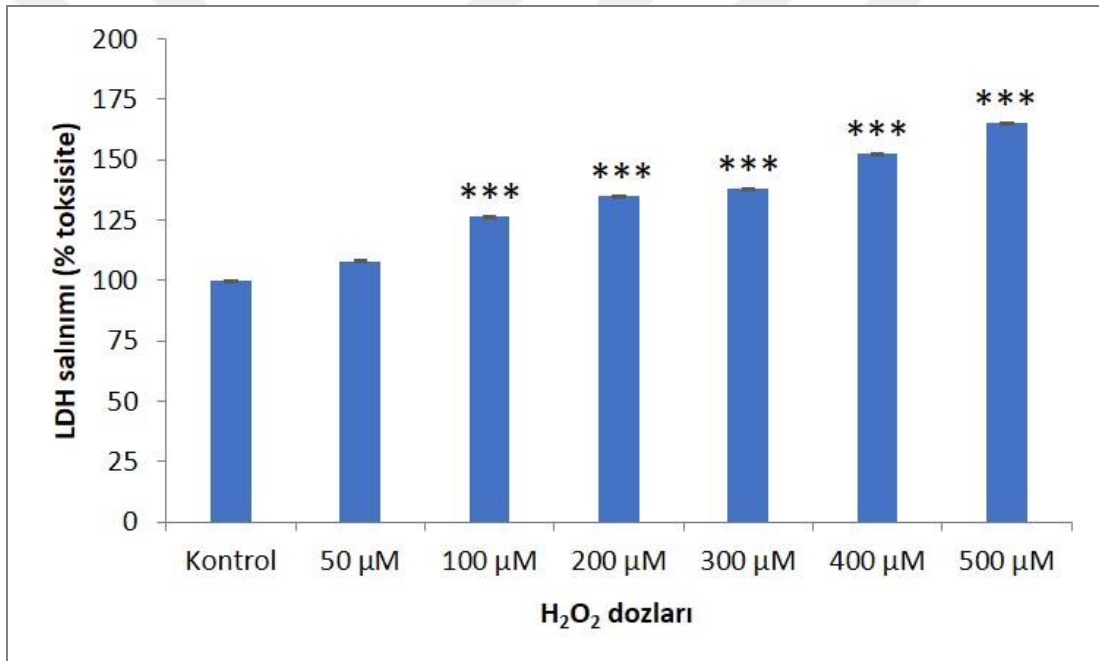
Deney Grupları	Ortalama ±SD
Kontrol	65,5 ± 3,69
DMT 10 µM	76,5 ± 4,72*
DMT 10 µM-NE100	31 ± 5,16 ⁺⁺⁺
DMT 10 µM-XEST.C	42,33 ± 4,16 ⁺⁺⁺
DMT 100 µM	27 ± 2,94 ^{***}
DMT 100 µM-NE100	9,25 ± 2,21 ^{###}
DMT 100 µM-XEST.C	19 ± 3,6
SA4503	78,5 ± 3,69 ^{***}
SA4503-NE100	15,75 ± 3,77 ^{&&&}
SA4503-XEST.C	38,66 ± 4,61 ^{&&&}

Kontrol grubuna kıyasla * p<0,05, ***p<0,001. DMT 10 µM grubuna kıyasla +++ p<0,001. DMT 100 µM grubuna kıyasla ###p<0,001. SA4503 grubuna kıyasla &&& p<0,001.

4.7. Canlılık Deneyi ve Hidrojen peroksit Toksikite Modeli ile İlgili Ön Çalışmalara Ait Bulgular

4.7.1. Toksik Hidrojen Peroksit Konsantrasyonunun Belirlenmesine Ait Bulgular

DeneySEL modelin oluşturulması ve toksik etki gösteren uygun H₂O₂ dozunun belirlenmesi için yapılan ön çalışmalarda, 50 µM dozu dışında uygulanan tüm H₂O₂ dozlarının toksisiteyi kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttırdığı (Şekil 4.13) gözlemlendi (p<0,001). H₂O₂ toksisite modeli için uygun toksik dozun, kontrol grubuna kıyasla toksisiteyi yaklaşık %50 oranında arttıran 400 µM olduğu (Şekil 4.13) tespit edildi. Tüm veriler ortalama ve ± standart sapma şeklinde Tablo 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4-13: Toksik hidrojen peroksit konsantrasyonunun belirlenmesi.

Deneyler toplamda üç kez tekrar edildi (n=3) ve her deney grubu için üçerli tekrarlar şeklinde yapıldı. Kontrol grubuna kıyasla *** p<0,001.

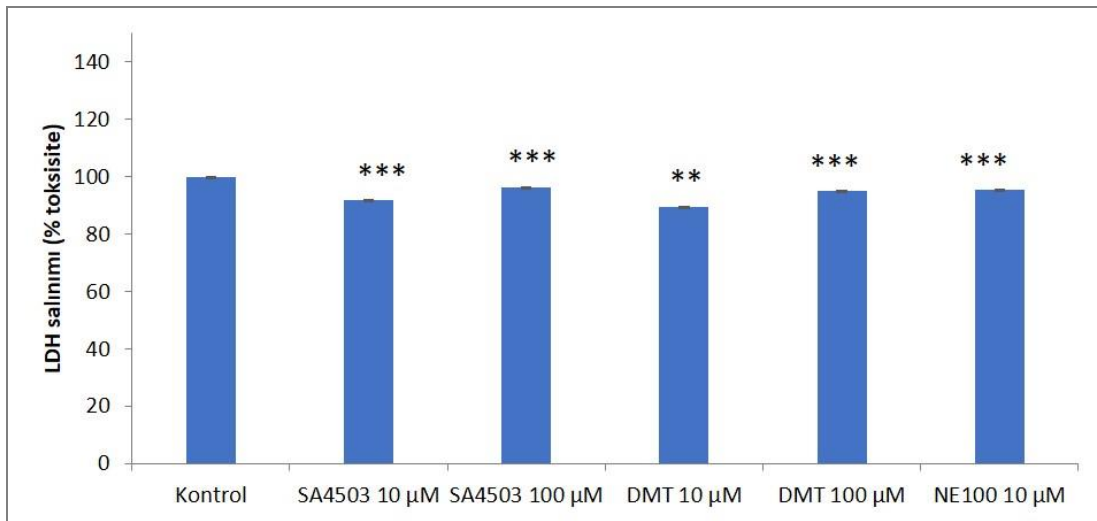
Tablo 4-2: Deneysel model için uygun toksik hidrojen peroksit konsantrasyonunun belirlenmesine ait ortalama ve standart sapma değerleri.

Deney Grupları	Ortalama \pm SD
Kontrol	100 \pm 0
50 μM H₂O₂	108,09 \pm 0,041
100 μM H₂O₂	126,78 \pm 0,019***
200 μM H₂O₂	134,87 \pm 0,051***
300 μM H₂O₂	137,88 \pm 0,003***
400 μM H₂O₂	152,28 \pm 0,013***
500 μM H₂O₂	165 \pm 0,001***

Kontrol grubuna kıyasla *** p<0,001.

4.7.2. Deneyde Kullanılan Moleküllerin ve Dozlarının Tek Başına Toksik Etkilerinin Değerlendirilmesine Ait Bulgular

Kontrol grubu ile kıyaslandığında, Sig-1R selektif agonisti SA4503'ün ve DMT'nin deneylerde kullanılan 10 μ M ve 100 μ M dozlarının toksik bir etki göstermediği ve kontrol grubuna göre LDH salınımını anlamlı derecede düşürdüğü (Şekil 4.14) belirlendi. Benzer şekilde Sig-1R selektif antagonisti NE100'ün deneylerde kullanılan 10 μ M dozunun da hücreler üzerinde toksik bir etki oluşturmadığı (Şekil 4.14) tespit edildi. Tüm veriler ortalama ve \pm standart sapma şeklinde Tablo 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4-14: Deneyde kullanılan moleküllerin ve dozlarının tek başına toksik etkilerinin değerlendirilmesi.

Deneyler toplamda üç kez tekrar edildi (n=3) ve her deney grubu için üçerli tekrarlar şeklinde yapıldı. Kontrol grubuna kıyasla *** p<0,001, **p<0,01.

Tablo 4-3: Deneyde kullanılan moleküllerin ve dozlarının tek başına toksik etkilerinin değerlendirilmesine ait ortalama ve standart sapma değerleri.

Deney Grupları	Ortalama \pmSD
Kontrol	100 \pm 0,002
SA4503 10 μM	91,67 \pm 0,002***
SA4503 100 μM	96,29 \pm 0,002***
DMT 10 μM	89,36 \pm 0,002**
DMT 100 μM	94,91 \pm 0,002***
NE100 10 μM	95,22 \pm 0,003***

Kontrol grubuna kıyasla *** p<0,001, **p<0,01.

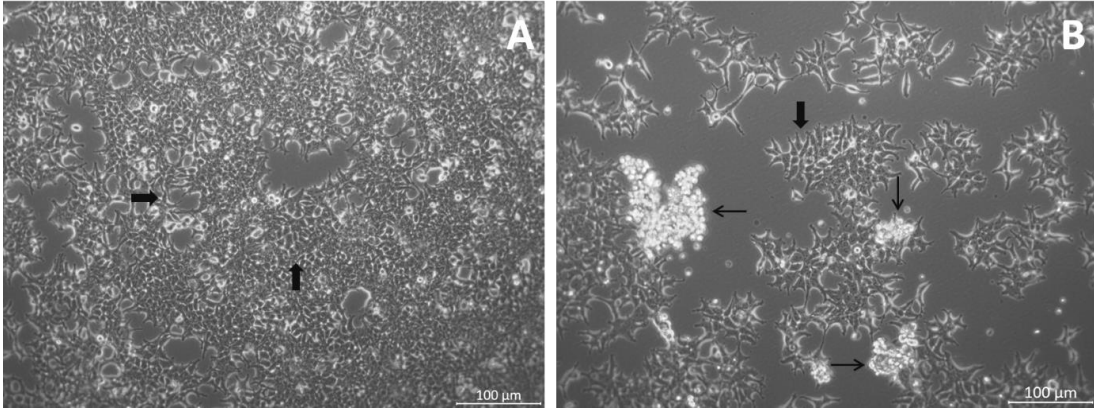
4.8. LDH Testi ve Morfolojik Analizler ile Hücre Canlılığının Değerlendirilmesine Ait Bulgular

H₂O₂ uygulamasının kontrol grubuna kıyasla LDH salınımını anlamlı derecede arttırdığı (Şekil 4.18) görüldü (p<0,001). Kontrol grubu ve H₂O₂ toksisitesi grubuna ait invert mikroskop görüntüleri Şekil 4.15'te görülmektedir.

H₂O₂ toksisitesinden önce DMT'nin 10 μ M ve 100 μ M dozlarda uygulanmasının hücreleri toksisite hasarından koruyarak LDH salınımını anlamlı derecede azalttığı (Şekil 4.20) ve dozun yükselmesi ile protektif etkinin de arttığı tespit edildi (p<0,001). Sig-1R selektif agonisti SA4503'ün 10 μ M dozda uygulandığı grupta da toksisitenin anlamlı derecede azaldığı (p<0,001) (Şekil 4.20) ancak 100 μ M dozda uygulandığında H₂O₂ toksisitesinden koruyucu etkinin ortadan kalktığı ve LDH salınımının anlamlı derecede arttığı (Şekil 4.20) gözlemlendi (p<0,001). Sig-1R selektif antagonisti NE100 uygulamasının deney gruplarında toksisiteyi arttırdığı ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı (Şekil 4.20) görüldü.

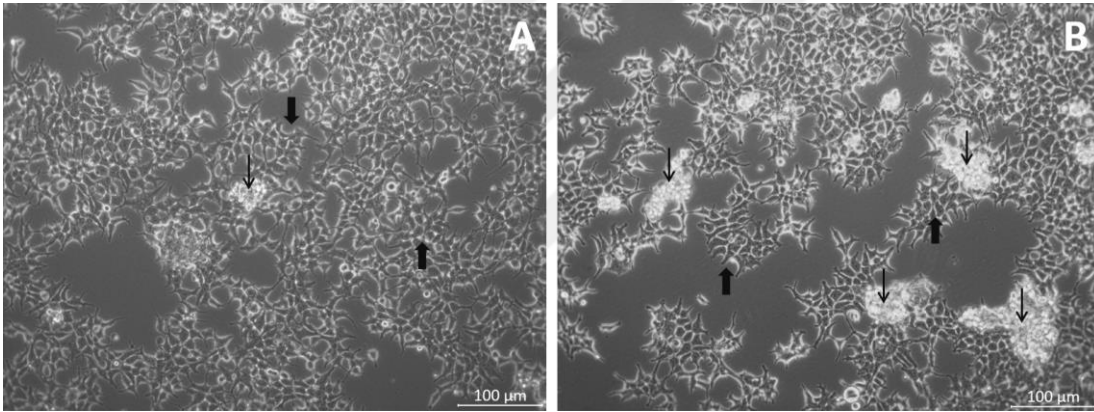
DMT'nin 10 μ M dozdaki protektif etkisi SA4503'ün aynı dozu ile kıyaslandığında etkileri birbirine yakın olmakla birlikte SA4503'ün DMT'den biraz daha etkili olduğu ve iki grup arasında istatistik olarak anlamlı bir fark bulunduğu (p<0,01) (Şekil 4.20) tespit edildi.

DMT 10 μ M ve DMT 100 μ M gruplarına ait invert mikroskop görüntüleri Şekil 4.16 ve Şekil 4.17'de, SA4503 10 μ M ve SA4503 100 μ M gruplarına ait invert mikroskop görüntüleri ise Şekil 4.18 ve Şekil 4.19'da görülmektedir. Tüm veriler ortalama ve \pm standart sapma şeklinde Tablo 4.4'te verilmiştir.



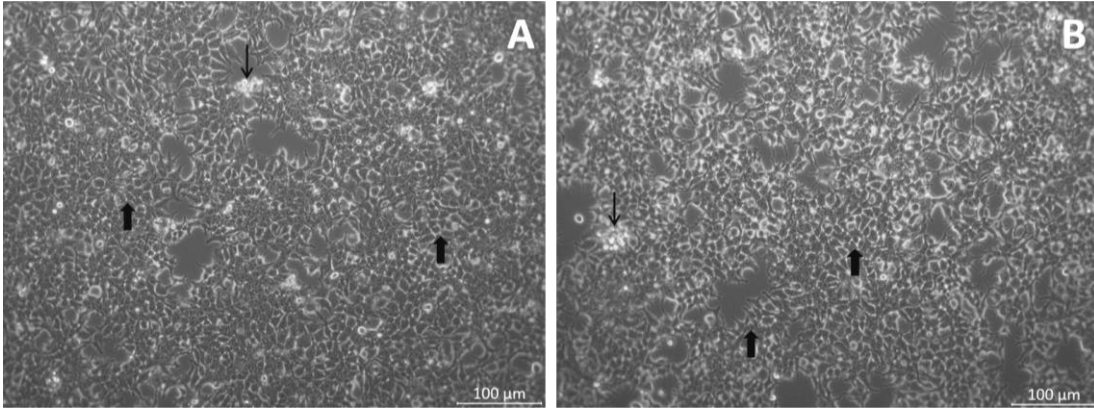
Şekil 4-15: Kontrol grubundaki sağlıklı hücrelerin ve H₂O₂ toksisitesine maruz kalmış hücrelerin morfolojisi.

(A) Kontrol grubuna ait sağlıklı hücreler. (B) H₂O₂ toksisitesine maruz kalmış hücreler. Kalın ok sağlıklı hücreleri, ince ok ise H₂O₂ toksisitesi ile hasarlanan ve ölen hücreleri göstermektedir. Büyütme: X20; bar=100μm



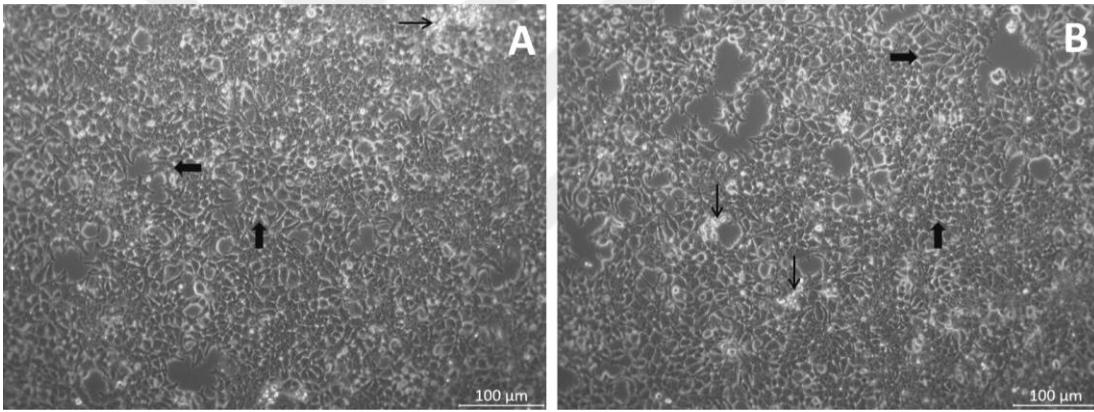
Şekil 4-16: H₂O₂ toksisitesi öncesinde 10 μM DMT ve 10 μM DMT ile NE100 uygulanmış hücrelerin morfolojisi.

(A) H₂O₂ toksisitesi öncesinde 10 μM DMT uygulanmış hücreler. (B) H₂O₂ toksisitesi öncesinde 10 μM DMT ve NE100 uygulanmış hücreler. Kalın ok sağlıklı hücreleri, ince ok ise H₂O₂ toksisitesi ile hasarlanan ve ölen hücreleri göstermektedir. Büyütme: X20; bar=100μm



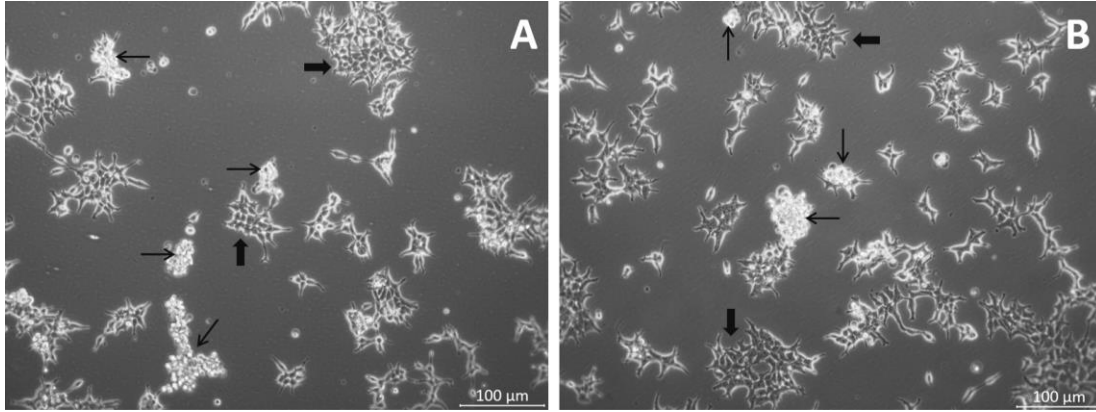
Şekil 4-17: H₂O₂ toksisitesi öncesinde 100 µM DMT ve 100 µM DMT ile NE100 uygulanmış hücrelerin morfolojisi.

(A) H₂O₂ toksisitesi öncesinde 100 µM DMT uygulanmış hücreler. (B) H₂O₂ toksisitesi öncesinde 100 µM DMT ve NE100 uygulanmış hücreler. Kalın ok sağlıklı hücreleri, ince ok ise H₂O₂ toksisitesi ile hasarlanan ve ölen hücreleri göstermektedir. Büyütme: X20; bar=100µm



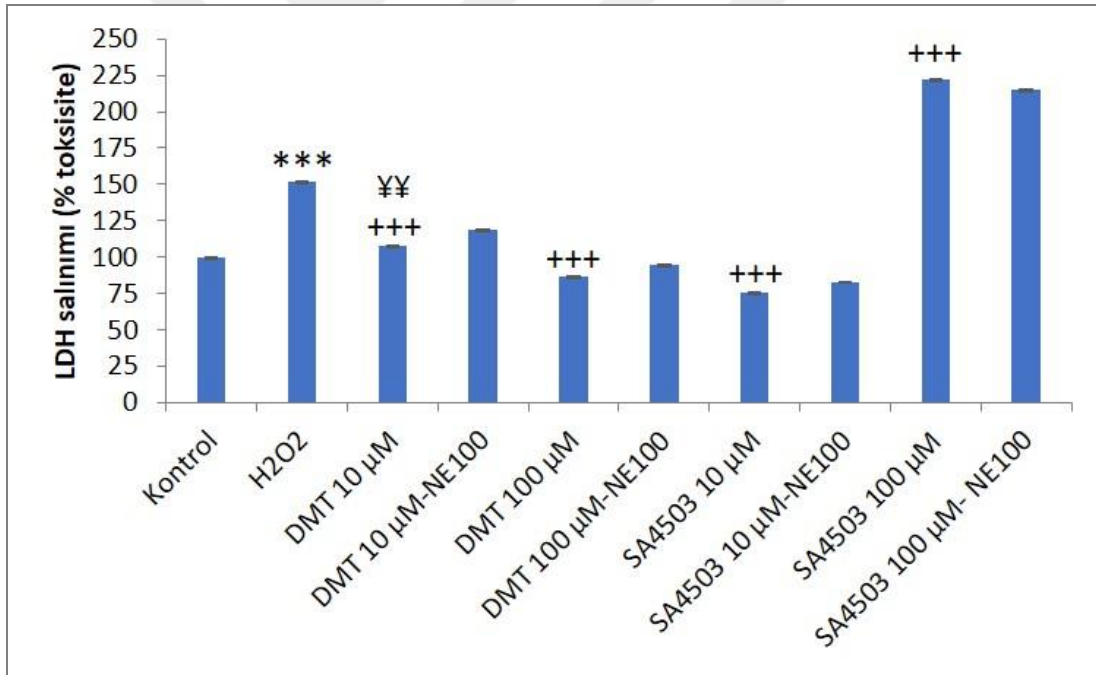
Şekil 4-18: H₂O₂ toksisitesi öncesinde 10 µM SA4503 ve 10 µM SA4503 ile NE100 uygulanmış hücrelerin morfolojisi.

(A) H₂O₂ toksisitesi öncesinde 10 µM SA4503 uygulanmış hücreler. (B) H₂O₂ toksisitesi öncesinde 10 µM SA4503 ve NE100 uygulanmış hücreler. Kalın ok sağlıklı hücreleri, ince ok ise H₂O₂ toksisitesi ile hasarlanan ve ölen hücreleri göstermektedir. Büyütme: X20; bar=100µm



Şekil 4-19: H₂O₂ toksisitesi öncesinde 100 μM SA4503 ve 100 μM SA4503 ile NE100 uygulanmış hücrelerin morfolojisi.

(A) H₂O₂ toksisitesi öncesinde 100 μM SA4503 uygulanmış hücreler. (B) H₂O₂ toksisitesi öncesinde 100 μM SA4503 ve NE100 uygulanmış hücreler. Kalın ok sağlıklı hücreleri, ince ok ise H₂O₂ toksisitesi ile hasarlanan ve ölen hücreleri göstermektedir. Büyütme: X20; bar=100μm



Şekil 4-20: LDH testi ile hücre canlılığının analizi.

Deneyler toplamda üç kez tekrar edildi (n=3) ve her deney gurubu için üçerli tekrarlar şeklinde yapıldı. Kontrol grubuna kıyasla *** p<0,001. H₂O₂ grubuna kıyasla +++ p<0,001. SA4503 10 μM grubuna kıyasla ¥¥p<0,01.

Tablo 4-4: LDH testi ile hücre canlılığı analizlerinin ortalama ve standart sapma değerleri.

Deney Grupları	Ortalama \pm SD
Kontrol	100 \pm 0
H ₂ O ₂	152,14 \pm 0,013***
DMT 10 μ M	107,46 \pm 0,027 ⁺⁺⁺ , ^{¶¶}
DMT 10 μ M-NE100	118,93 \pm 0,044
DMT 100 μ M	86,12 \pm 0,027 ⁺⁺⁺
DMT 100 μ M-NE100	94,45 \pm 0,013
SA4503 10 μ M	75,98 \pm 0,013 ⁺⁺⁺
SA4503 10 μ M-NE100	82,98 \pm 0
SA4503 100 μ M	222,47 \pm 0,006 ⁺⁺⁺
SA4503 100 μ M-NE100	214,92 \pm 0,028

Kontrol grubuna kıyasla *** p<0,001. H₂O₂ grubuna kıyasla ⁺⁺⁺ p<0,001. SA4503 10 μ M grubuna kıyasla ^{¶¶}p<0,01.

4.9. Total Oksidan Kapasite Ölçümlerine Ait Bulgular

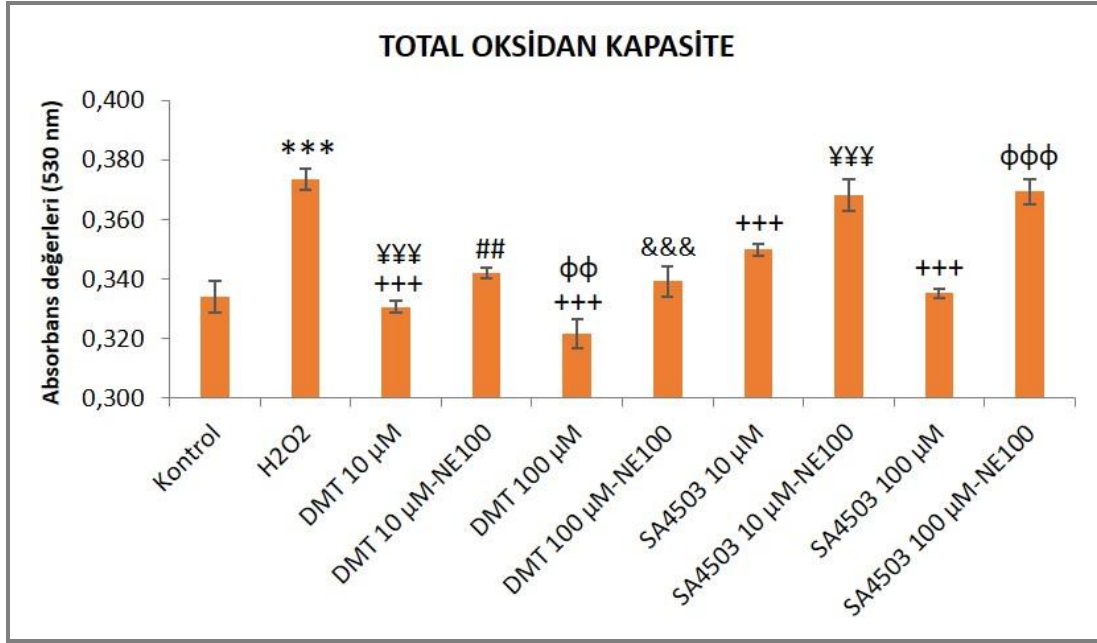
H₂O₂ uygulamasının kontrol grubuna kıyasla total oksidan kapasiteyi anlamlı derecede arttırdığı (Şekil 4.21) görüldü (p<0,001).

H₂O₂ toksisitesinden önce 10 μ M ve 100 μ M dozlarda uygulanan DMT'nin her iki dozunun da total oksidan kapasiteyi anlamlı derecede düşürdüğü (p<0,001) ve dozun yükselmesi ile oksidan kapasiteyi düşürücü etkinin de arttığı (Şekil 4.21) gözlemlendi. Sig-1R selektif antagonisti NE-100 uygulamasının ise DMT 10 μ M (p<0,05) ve DMT 100 μ M gruplarında (p<0,001) total oksidan kapasiteyi anlamlı derecede arttırdığı (Şekil 4.21) görüldü.

DMT'ye benzer şekilde H₂O₂ toksisitesinden önce Sig-1R selektif agonisti SA4503 uygulamasının da hem 10 μ M hem de 100 μ M dozda oksidan kapasiteyi anlamlı derecede düşürdüğü (p<0,001) ve dozun yükselmesi ile bu etkinin arttığı (Şekil 4.21) gözlemlendi. NE-100 uygulaması ile Sig-1R antagonize edildiğinde ise SA4503 10 μ M ve SA4503 100 μ M gruplarında oksidan kapasitenin anlamlı derecede arttığı (p<0,001) (Şekil 4.21) görüldü.

DMT ve SA4503'ün 10 μ M ve 100 μ M dozları birbiri ile kıyaslandığında, total oksidan kapasiteyi azaltmakta DMT'nin SA4503'e kıyasla daha güçlü bir etki gösterdiği ve iki grup arasında anlamlı fark olduğu (p<0,001, p<0,01) (Şekil 4.21) gözlemlendi.

Tüm veriler ortalama ve \pm standart sapma şeklinde Tablo 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4-21: Total oksidan kapasite ölçümlerinin değerlendirilmesi.

Deneyler toplamda üç kez tekrar edildi (n=3) ve her deney grubu için üçerli tekrarlar şeklinde yapıldı. Kontrol grubuna kıyasla *** p<0,001. H₂O₂ grubuna kıyasla +++ p<0,001. DMT 10 µM grubuna kıyasla ##p<0,05. DMT 100 µM grubuna kıyasla &&&p<0,001. SA4503 10 µM grubuna kıyasla ¥¥¥p<0,001. SA4503 100 µM grubuna kıyasla φφφp<0,001. SA4503 100 µM grubuna kıyasla φφp<0,01.

Tablo 4-5: Total oksidan kapasite ölçümlerinin ortalama ve standart sapma değerleri.

Deney Grupları	Ortalama ±SD
Kontrol	0,334 ± 0,005
H ₂ O ₂	0,374 ± 0,004***
DMT 10 µM	0,331 ± 0,002+++ , ¥¥¥
DMT 10 µM-NE100	0,342 ± 0,002##
DMT 100 µM	0,322 ± 0,005+++ , φφ
DMT 100 µM-NE100	0,339 ± 0,005&&&
SA4503 10 µM	0,350 ± 0,002+++
SA4503 10 µM-NE100	0,368 ± 0,005¥¥¥
SA4503 100 µM	0,335 ± 0,002+++
SA4503 100 µM-NE100	0,369 ± 0,004φφφ

Kontrol grubuna kıyasla *** p<0,001. H₂O₂ grubuna kıyasla +++ p<0,001. DMT 10 µM grubuna kıyasla ##p<0,05. DMT 100 µM grubuna kıyasla &&&p<0,001. SA4503 10 µM grubuna kıyasla ¥¥¥p<0,001. SA4503 100 µM grubuna kıyasla φφφp<0,001. SA4503 100 µM grubuna kıyasla φφp<0,01.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda, sıklıkla psikoaktif etkileri araştırılmış olan ancak merkezi sinir sistemi nöronları üzerindeki fizyolojik etkileri tam olarak bilinmeyen endojen bir halusinojenik madde olan DMT'nin, merkezi sinir sistemi nöronlarında neurite yapılarının oluşumu ve nöronal canlılık üzerindeki olası protektif etkileri araştırıldı. DMT'nin agonist etki gösterdiği bilinen Sig-1R üzerinden, yeni doğan fare hipokampal nöronlarında neurite oluşumunu anlamlı derecede arttırdığı gözlemlendi. DMT'nin neurite oluşumunu uyarıcı etkisinin Sig-1R ve IP3R antagonize edildiğinde ise anlamlı derecede azaldığı tespit edildi. Öte yandan endojen Sig-1R ligandı olan DMT'nin bu etkisi, sentetik Sig-1R ligandı SA4503 ile kıyaslandı ve etkisinin sentetik ligand kadar güçlü olduğu görüldü. Ayrıca, DMT'nin insan nöroblastoma hücrelerinde H₂O₂ ile oluşturulan toksisite modelinde protektif bir etki göstererek hücreleri oksidatif stres hasarından koruduğu, hücresel canlılığı arttırdığı ve total oksidan kapasite değerlerini anlamlı derecede azalttığı gözlemlendi. DMT'nin antioksidan etkisinin Sig-1R'nün antagonize edilmesi ile anlamlı derecede azaldığı tespit edildi. DMT'nin nöroprotektif ve antioksidan etkisi Sig-1R sentetik agonisti SA4503 ile kıyaslandı ve sentetik agonist kadar etkili olduğu, antioksidan etkisinin ise SA4503'ten daha güçlü olduğu görüldü.

Neurite çalışmalarında, primer nöronlar ile deneysel modellerin oluşturulmasındaki karmaşıklık ve hücre kültüründeki teknik zorluklar nedeniyle genellikle daha basit modeller olan hazır hücre hatları kullanılmaktadır. Oysa hazır hücre hatları nöron benzeri hücrelerdir ve bu hücrelerde gözlenen uzantılar gerçek neurite yapıları değildir. Kültür ortamına düşük yoğunlukta ekilerek yaşatılan primer hipokampal ve kortikal nöronlar gerçek neurite yapıları oluşturular ve *in vivo* koşullardaki neurite oluşumu sürecini daha iyi yansıtır (Dehmelt ve Halpain 2004; Kiryushko ve ark. 2004; Sainath ve Gallo 2015). Bu nedenle çalışmamızda neurite deneyleri için yeni doğan fare primer hipokampal nöron kültürü yapıldı ve gerçek nöronlar ile deneyler gerçekleştirildi.

In vitro kültür ortamında hipokampal nöronlarda neurite oluşumu süreci araştırmacılar tarafından iyi tanımlanmıştır ve 5 evreyi içermektedir (Dehmelt ve Halpain 2004; Kiryushko ve ark. 2004; Sainath ve Gallo 2015). İlk evrede nöronlarda hücre gövdesinin etrafına yayılan aktinden zengin lamellipodia ve filopodia yapıları

oluşur. Bu aşamada nöronlar, neurite içermeyen, olgunlaşmamış küresel hücreler şeklindedir. Ardından, yuvarlak şekilli nöronların gövdesinden, aynı boyda ve tam gelişmemiş olan immatür kısa uzantılar yani ilk neurite yapıları gelişmeye başlar. İmmatür neurite yapılarının uç kısımlarında ise neurite uzaması ve yönlenmesini sağlayan büyüme konileri bulunur. Bir sonraki aşamada, yaklaşık eş boydaki immatür neurite yapılarından büyük ve aktif büyüme konisine sahip olan bir neurite hızla uzamaya başlar ve daha sonra aksona farklılaşır. Bir sonraki evrede akson dışında kalan diğer küçük neurite yapıları dendritlere dönüşür. Son evrede ise akson ve dendritlerin fonksiyonel polarizasyonu tamamlanır, dendritik dikenler oluşur ve sinaptik bağlantıların kurulması gerçekleşir (Dotti ve ark. 1988; Yoshimura ve ark. 2006; Thirovic ve Bradke 2009; Flynn 2013; Lestanova ve ark. 2016).

Çalışmamızda yeni doğan fare hipokampal nöronlarında akson ve dendrit farklılaşmasından önce oluşan immatür neurite yapılarını gözlemleyebilmemiz için, deneylerde kültürdeki 20. saatinde olan nöronlar kullanıldı. Literatürle uyumlu olarak bizim çalışmamızda da primer hipokampal nöronlarda neurite oluşumu sürecine ait ilk 3 evredeki nöronlar ve immatür neurite yapıları mikroskop görüntüleri üzerinden gerçekleştirilen morfolojik analizlerde tespit edildi. Kültürdeki 20. saatinde yeni doğan fare hipokampal nöronlarının bazılarının henüz neurite yapısı içermedikleri ve yuvarlak şekilli oldukları, bazı nöronların hücre gövdesinden çıkan eş sayıda immatür neurite yapısı içerdikleri, bir grup nöronda ise neurite yapılarından birinin çok daha fazla uzamış olduğu görüldü. Ayrıca, nöronlardaki immatür neurite yapılarının uç kısımlarında bulunan büyüme konileri de gözlemlendi.

Sig-1R'leri, agonistlerinin düşük dozları ile yani yaklaşık olarak afinite değerlerine eşit ya da afinite değerlerinin 10 katından daha az dozlarında uyarıldıklarında aktive olur ve IP3R'leri ile etkileşime girer. Aktive olan Sig-1R, ER'dan mitokondriye Ca^{+2} akışını, ATP üretimini, apoptoz sürecini ve hücrenin ROS ve antioksidan enzim seviyelerini regüle eder (Hayashi ve Su 2007; Su ve ark. 2010; Pabba 2013). Ancak Sig-1R'leri, agonistlerinin yüksek dozları yani afinite değerlerinin yaklaşık 10 katından daha yüksek dozları ile uyarılırsa ya da hücrenel stres gibi faktörler ile aktive olursa Sig-1R MAM'dan ayrılarak hücrenin başta hücre membranı olmak üzere farklı bölgelerine transloke olur ve bu bölgelerde protein-protein etkileşimi üzerinden çeşitli iyon kanalları, kinazlar ve reseptörlerin fonksiyonlarını düzenler. Bu

yollarla Sig-1R, nöronal canlılık, neurite oluşumu ve plastisite gibi süreçlerde rol oynar ve agonistin uygulandığı doza bağlı olarak farklı yollar ile etki gösterir. (Hayashi ve Su 2007; Su ve ark. 2010; Pabba 2013).

DMT'nin, Sig-1R'ne düşük mikromolar konsantrasyonda (yaklaşık 14 μM) bağlandığı ve agonist olarak etki ettiği bilinmektedir. Ayrıca, sıçan karaciğeri homojenatlarında, Sig-1R'ne bağlanma affinitesinin araştırıldığı bir çalışmada, DMT'nin 10 μM dozdan başlayarak agonistik etkisinin giderek arttığı, 100 μM konsantrasyonda ise reseptöre bağlanma affinitesinin en yüksek düzeyde olduğu ve bu dozda voltaj kapılı Na^+ kanallarını inhibe ettiği gösterilmiştir (Fontanilla ve ark. 2009). DMT'nin diğer Sig-1R agonistleri gibi, afinite konsantrasyonlarında uygulandığında (10 μM), Sig-1R'nü aktive ederek reseptörün ER'da etki göstermesine yol açacağı, daha yüksek konsantrasyonlarda yani afinite konsantrasyonunun yaklaşık on katı kadar (100 μM) uygulandığında ise Sig-1R'nün ER'dan ayrılmasına ve plazma membranına taşınarak burada çeşitli iyon kanalları, reseptörler ve kinazlarla etkileşime girmesine neden olacağı ileri sürülmüştür (Su ve ark. 2009).

Çalışmamızda, DMT'nin yüksek ve düşük dozlarda uygulandığında Sig-1R üzerinden gerçekleştireceği agonistik etkisinin nasıl olacağını incelemek amacıyla; literatürde DMT'nin Sig-1R'ne karşı bilinen afinite değeri olan 10 μM düşük doz olarak ve bunun on katı olan bilinen en yüksek afinite değeri 100 μM ise yüksek doz olarak kabul edildi ve bu iki doz tüm deneylerde kullanıldı.

Sig-1R'nün neurite oluşumu, uzaması ve nöronal plastisite süreçlerinde rol oynadığı, ayrıca hipokampal nöronlarda dendrit uzaması, dallanması ve dendritik diken oluşumunu uyardığı bilinmektedir. Sig-1R agonistleri ile yapılan çalışmalarda, Sig-1R aktivasyonunun neurite oluşumunu arttırdığı ve neurite uzamasını uyardığı gösterilmiştir (Tsai ve ark. 2009; Kimura ve ark. 2014; Ruscher ve Wieloch 2015).

Sig-1R reseptörünün neurite oluşumu üzerindeki rolünü inceleyen ve primer nöronlar ile yapılan çalışmalar çok az sayıdadır ve bu çalışmalarda Sig-1R agonistlerinin neurite oluşumu üzerindeki etkisi değil neurite uzaması ve boyu üzerine etkileri incelenmiştir. Primer nöronlarla yapılan çalışmalarda, serebellar granül nöronları, hipokampal nöronlar, kortikal nöronlar, spinal motor nöronlar ve arka kök ganglion nöronlarında Sig-1R agonistlerinin neurite uzamasını arttırdığı ve Sig-1R antagonisti uygulaması ile

neurite boyundaki artışın azaldığı rapor edilmiştir (Guzman-Lenis ve ark. 2009; Ruscher ve ark. 2011; Kimura ve ark. 2013; Li ve ark. 2017).

Sig-1R'nün neurite oluşumu üzerindeki etkisini araştıran çalışmalar ise genellikle NGF ile uyarılan neurite oluşumu modelleri üzerinde ve hazır hücre hatları kullanılarak yapılmıştır. Bu konuda yapılan öncü bir çalışmada Sig-1R agonisti pentazosinin ve Sig-1R agonisti olduğu bilinen antidepresanlar imipramin ve fluvoxaminin, NGF ile uyarılan neurite oluşumu modelinde PC12 hücrelerinde neurite içeren hücre sayısını arttırdığı ve bu etkinin selektif Sig-1R antagonisti NE-100 uygulaması ile bloke edildiği gösterilmiştir (Takebayashi ve ark. 2002). Yine PC12 hücrelerinde NGF ile uyarılan neurite oluşumu modelinde yapılan iki ayrı çalışmada, Sig-1R üzerinde agonistik etkisi olduğu bilinen asetilkolin esterase inhibitörü donepezil'in (Ishima ve ark. 2008) ve serebral vazodilatör ifenprodil'in (Ishima ve Hashimoto 2012), Sig-1R üzerinden NGF ile uyarılan neurite oluşumunu uyardığı ve iki çalışmada da bu etkinin selektif Sig-1R antagonisti NE-100 ve IP3R antagonisti Xestospongin C uygulaması ile anlamlı derecede azaldığı gösterilmiştir. Benzer bir çalışmada Nishimura ve ark. (2008), antidepresan fluvoxaminin, endojen Sig-1R ligandı olan DHEA-S'in, selektif Sig-1R agonisti SA4503 ve PPBP'nin NGF ile uyarılan neurite oluşumunu yani neurite içeren hücre sayısını arttırdığını ve selektif Sig-1R antagonisti NE-100'ün ise bu etkiyi inhibe ettiğini bildirmiştir. Aynı çalışmada Sig-1R selektif agonisti SA4503'ün neurite oluşumunu uyarıcı etkisinin IP3R antagonisti uygulaması ile anlamlı derecede azaldığı da gösterilmiştir (Nishimura ve ark. 2008).

Çalışmamız, DMT'nin ve endojen agonisti olduğu Sig-1R'nün primer nöronlarda neurite oluşumu üzerindeki etkisini gösteren ilk çalışmadır. Çalışmamızda, Sig-1R endojen agonisti olan DMT'nin 10 µM dozda primer hipokampal nöronlarda neurite oluşumunu anlamlı şekilde arttırdığı bulundu. Ayrıca, endojen Sig-1R ligandı olan DMT'nin etkisini kıyasladığımız selektif Sig-1R agonisti SA4503'ün de aynı dozda neurite oluşumunu anlamlı derecede arttırdığı görüldü. DMT'nin neurite oluşumunu uyarıcı etkisinin, aynı dozdaki sentetik agonist SA4503'ün etkisi ile hemen hemen aynı düzeyde olduğu gözlemlendi ancak iki agonistin etkisi arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi. Bu veriler, endojen Sig-1R ligandı DMT'nin primer hipokampal nöronlarda neurite oluşumu sürecini uyardığını ve aynı dozdaki selektif agonist kadar etkili olduğunu göstermektedir. DMT ve SA4503, 10 µM dozlarda uygulanmadan

önce, nöronlar Sig-1R selektif antagonisti NE100 ve IP3R antagonisti ile muamele edildiğinde ise hem DMT'nin hem de SA4503'ün neurite oluşumu üzerindeki uyarıcı etkisinin anlamlı şekilde azaldığı görüldü. DMT'nin neurite oluşumu üzerindeki uyarıcı etkisinin Sig-1R ve IP3R'nün antagonize edilmesi ile azalması, DMT'nin bu etkisini Sig-1R üzerinden gerçekleştirdiğini ve bu etkide Sig-1R'nün IP3R ile olan etkileşiminin dolayısıyla ER-mitokondri arasındaki Ca^{+2} sinyalinin önemli rol oynadığını göstermektedir. Çalışmamızla ilgili bu bulguların yukarıda bahsi geçen literatürler ile uyumlu olduğu görülmektedir.

Öte yandan DMT'nin 100 μ M dozda uygulanmasının ise hipokampal nöronlarda neurite oluşumunu anlamlı derecede azalttığı ve neurite oluşumunu baskılayan bu etkinin Sig-1R selektif antagonisti NE100 ve IP3R antagonisti uygulaması ile anlamlı olarak arttığı gözlemlendi.

100 μ M dozda DMT'nin, insan embriyonik böbrek hücrelerinde ve yeni doğan fare kardiyak miyositlerinde voltaj kapılı Na^{+} kanallarını inhibe ettiği yama kısacı kayıtları ile gösterilmiştir (Fontanilla ve ark. 2009). George ve ark. (2009) ise yaptıkları çalışmada, embriyonik fare primer kortikal nöronlarında membrandaki voltaj kapılı Na^{+} kanallarının aktivasyonunun, neurite, akson ve dendrit gelişimi ile sinaptik plastisite gibi süreçlerde önemli rol oynadığı bilinen NMDR'nün aktivitesini ve Ca^{+2} sinyalini güçlendirdiğini, hücre içine Ca^{+2} akışını arttırdığını ve bu yollarla nöronlarda neurite uzamasının arttığını tespit etmiştir. Aynı çalışmada, Na^{+} kanallarının ve NMDR'nün ayrı ayrı antagonize edilmesinin ise neurite boyundaki artışı anlamlı derecede azalttığı ve neurite uzamasını uyarıcı etkinin tamamen ortadan kalktığı gösterilmiştir (George ve ark. 2009).

Bizim çalışmamızda da 100 μ M yüksek dozda DMT uygulaması ile görülen neurite oluşumunu baskılayıcı etki, DMT'nin Sig-1R üzerinden membrandaki voltaj kapılı Na^{+} kanallarının inhibisyonuna yola açması ile ortaya çıkmış olabilir. Yüksek dozda bu etkiye yol açan mekanizmanın Na^{+} kanalı inhibisyonundan kaynaklanıp kaynaklanmadığını araştırmak için yama kısacı tekniğinin, Na^{+} kanal aktivatörleri ya da blokerlerinin kullanıldığı, daha detaylı fizyolojik çalışmalar yapılabilir. Öte yandan yüksek dozda DMT, Sig-1R'nün aktive olarak hücre membranında etkileşimi henüz gösterilmemiş başka bir reseptör, iyon kanalı ya da kinazın fonksiyonunu düzenleyerek de bu etkinin oluşmasına yol açabilir.

Oksidatif stres, biyolojik sistemlerde ROS üretimi ile ROS detoksifikasyonu arasındaki dengesizliklerden kaynaklanan bir süreçtir. Hücrelerde oluşan serbest radikallerin yeterince temizlenememesi ROS artışına ve oksidatif strese yol açar. Oksidatif stres, hücre membranına, proteinlere, lipidlere, lipoproteinlere ve DNA gibi hücre için önemli birçok yapıya ciddi biçimde zarar verir ve hücre ölümüyle sonuçlanır. Nöronlar oksidatif stresten çok fazla etkilenir. Özellikle beyin, oksijen tüketiminin çok fazla olması, antioksidan sistemlerinin zayıf olması, ROS üretimini katalize eden metal iyonlarını barındırması ve peroksidasyona karşı duyarlı olan çoklu doymamış yağ asitlerinden zengin olması nedeniyle oksidatif hasara karşı çok hassastır (Uttara ve ark. 2009; Chen ve ark. 2012; Liu ve ark. 2017). Artmış ROS üretimi ve oksidatif stres hasarının alzheimer, iskemi, parkinson, ALS, hungtington, MS gibi birçok nörodejeneratif hastalığın patofizyolojisinde rol oynadığı gösterilmiştir. ROS üretiminin nörodejeneratif süreçlerde görülen mitokondri disfonksiyonu, glial aktivasyon, hatalı protein katlanması ve birikimi gibi nedenlerle arttığı da bildirilmiştir (Uttara ve ark. 2009; Chen ve ark. 2012; Liu ve ark. 2017).

İn vivo ve in vitro birçok nörotoksisite ve nörodejeneratif hastalık modelinde Sig-1R agonistlerinin nöroprotektif etki gösterdiği bilinmektedir (Kourich ve ark. 2012; Frecka ve ark. 2013; Nguyen ve ark. 2014a; 2014b). Sig-1R, mitokondrideki ROS üretimini kontrol eder. Ayrıca, nukleusta ARE ve Nrf2 gibi antioksidan genlerin ve transkripsiyon faktörlerinin ifadesini arttırarak, hücrelerde antioksidan enzimlerin ve proteinlerin üretimini arttırır. Bu yollarla Sig-1R agonistleri hücreleri oksidatif stres hasarından korur. Sig-1R agonistlerinin hücrelerde ROS üretimini azalttığı, antagonistlerinin ise ROS üretimini arttırdığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Mori ve ark. 2012; Pal ve ark. 2012). Sig-1R agonistlerinin iskemi, diyabet ve amiloid beta toksisitesinin neden olduğu ROS/RNS üretimini azaltabildiği de bilinmektedir (Smith ve ark. 2008; Yang ve ark. 2010; Behensky ve ark. 2013a).

Biz de çalışmamızda, endojen Sig-1R ligandı DMT'nin nöroprotektif etkilerini incelemek için birçok nörodejeneratif hastalıkla ilişkilendirilmiş olan oksidatif stres sürecini in vitro olarak oluşturmak amacıyla deneylerimizde H₂O₂ toksisite modelini kullandık.

Hyrskyluoto ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada, ROS üretiminin arttığı ve oksidatif stres hasarının görüldüğü bir nörodejeneratif hastalık olan hungtington

hastalığının in vitro modelinde, Sig-1R agonisti PRE084 uygulamasının nöronal hücrelerde intraselüler ROS miktarını anlamlı derecede azalttığını ve NF-kB sinyal yolu üzerinden hücrel antioksidan proteinlerin ve enzimlerin üretimini arttırdığını göstermiştir.

Tuerxun ve ark. (2010) ise H₂O₂ toksisitesi ile oluşturdukları oksidatif stres hasarı modelinde, H₂O₂ toksisitesinden önce uygulanan Sig-1R agonisti SA4503'ün, yeni doğan fare primer kortikal nöronlarını oksidatif stres hasarından koruyarak nöroprotektif etki gösterdiğini, hücrel canlılığı arttırdığını ve Sig-1R antagonisti BD1047 uygulaması ile nöroprotektif etkinin azaldığını göstermiştir. Çalışmada, Sig-1R agonistinin oksidatif stres hasarından koruyucu etkisinin, nöronlarda glutamat reseptörü ifadesinin azalması ve MAPK/ERK sinyal yolu üzerinden gerçekleştiği de belirtilmiştir (Tuerxun ve ark. 2010).

H₂O₂ toksisitesi modeli ile fare nöroblastoma hücrelerinde yapılan başka bir in vitro çalışmada, Sig-1R agonisti DHEA ve DHEA-S'in, ROS hasarının uyardığı apoptotik hücre ölümü ile ilgili sinyal yollarını baskılayarak protektif etki gösterdiği, Sig-1R antagonisti uygulamasının ise bu etkiyi baskıladığı bildirilmiştir (Su ve ark. 2016b).

Sig-1R ligandı olduğu keşfedildikten sonra DMT'nin, Sig-1R üzerinden gerçekleşebilecek olası nöroprotektif etkileri hakkında birçok hipotez öne sürülmüştür. Bu konuda Szabo ve arkadaşlarının öncü çalışması dışında yapılmış başka bir araştırma bulunmamaktadır. Szabo ve ark. (2016) yaptıkları in vitro çalışmada, insan pluripotent kök hücrelerinden farklılaştırılarak elde edilen kortikal nöronlarda, monosit-makrofajlar ve dendritik hücrelerde hipoksik hasara karşı DMT'nin protektif etkisini incelemiş ve hipoksi öncesinde 50 µM dozda uygulanan DMT'nin hücrel canlılığı anlamlı şekilde arttırdığını göstermiştir. Ek olarak, bu hücre tiplerinde Sig-1R genini susturduklarında ya da reseptörün seviyesini azalttıklarında DMT'nin protektif etkisinin anlamlı şekilde azaldığını da tespit etmiştir (Szabo ve ark. 2016).

Sig-1R endojen ligandı DMT'nin oksidatif stres hasarı ve total oksidan kapasite üzerindeki etkileri ise ilk kez bizim çalışmamızda gösterilmiştir. Ayrıca, Sig-1R selektif agonisti SA4503'ün insan nöroblastoma hücrelerinde H₂O₂ toksisitesine karşı nöroprotektif rolü ve total oksidan kapasite üzerindeki etkisi de ilk kez çalışmamızda incelenmiştir.

Çalışmamızda, H₂O₂ toksisitesinden önce DMT'nin 10 µM ve 100 µM dozlarda uygulanmasının hücreleri oksidatif stres hasarından koruyarak LDH salınımını anlamlı derecede azalttığı ve hücrel canlılığı arttırdığı hem LDH toksisite testi ile hem de morfolojik analizlerle gösterildi. Sig-1R selektif agonisti SA4503'ün 10 µM dozunun da toksisiteyi anlamlı derecede azalttığı gözlemlendi. Bu bulgularımızın literatür ile uyumlu olduğu saptandı. Sig-1R selektif antagonisti NE100 uygulamasının toksisiteyi arttırdığı ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. Öte yandan, SA4503'ün 100 µM dozda uygulandığında H₂O₂ toksisitesinden koruyucu etkinin ortadan kalktığı, toksisitenin anlamlı derecede arttığı ve hücrel canlılığın azaldığı gözlemlendi.

Bilinmektedir ki, nanomolar konsantrasyonlarda afiniteye sahip selektif Sig-1R agonistleri, düşük konsantrasyonlarda etkili olurken yüksek dozlarda etkileri ortadan kalkar. Sig-1R'leri bu nedenle "U şeklinde" olarak tanımlanan bir doz-cevap eğrisi çizerler (Hayashi ve Su 2008).

Maurice ve ark. (1994) yaptıkları çalışmada, Sig-1R agonisti PRE084'ün deney hayvanlarındaki anti-amnezik etkilerinin yüksek dozlarda ortadan kalktığını gözlemlemişlerdir. Maurice ve arkadaşlarının çalışmasına benzer şekilde, daha sonra Hayashi ve ark. (2000) da çalışmalarında, 100-1000 nM gibi çok dar bir etki dozu aralığına sahip olan Sig-1R agonisti pentazocine'in, 100 nM'da IP3R aktive ederek Ca⁺² akışını uyardığını ancak 10 µM gibi yüksek bir dozda uygulandığında bu etkisinin kaybolduğunu göstermiştir. Araştırmacılar, yüksek dozda Pentazocine etkisinin ortadan kalkmasının toksik bir etkiden kaynaklanmadığını ve IP3R inhibisyonuna yol açmadığını tespit etmiştir (Hayashi ve ark. 2000).

Bizim çalışmamızda da benzer şekilde, nanomolar afiniteye sahip olan Sig-1R selektif agonisti SA4503'ün, 100µM dozda nöroprotektif etkisinin ortadan kalkması yüksek dozda agonistin etkisiz olmasından kaynaklanmış olabilir. Toksikite deneylerinden önce yaptığımız ön çalışmalarda, DMT, SA4503 ve NE100'ün deneylerde kullanılacak dozlarını tek başına hücreler üzerinde test ederek SA4503'ün, 100 µM dozda hücrelerde toksik etki oluşturmadığını gösterdik. Dolayısıyla, literatürle uyumlu olarak Sig-1R agonistlerinin yüksek dozda etkisiz olmasının toksisiteden kaynaklanmadığını, bu durumun agonistin doz-cevap özelliğine bağlı olduğunu saptadık. Yüksek dozlarda agonist uygulamasının reseptör down-regülasyonuna yol açarak Sig-1R'nün etkisinin ortadan kalkmasına yol açabileceği de bu noktada ayrıca

akla gelmektedir. Ancak altta yatan mekanizmanın tam olarak netleştirilebilmesi için daha detaylı moleküler çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak, H₂O₂ toksisitesinden önce 10 µM ve 100 µM dozlarda uygulanan DMT'nin ve selektif Sig-1R agonisti SA4503'ün her iki dozunun da total oksidan kapasiteyi anlamlı derecede düşürdüğü ve dozun yükselmesi ile her iki molekülün de oksidan kapasiteyi düşürücü etkisinin arttığı gösterildi. Ayrıca, Sig-1R selektif antagonisti NE-100 uygulamasının DMT'nin ve SA4503'ün total oksidan kapasiteyi düşürücü etkisini anlamlı derecede azalttığı gözlemlendi. Bu bulgular, DMT'nin oksidatif stresi azaltıcı yöndeki etkisinin Sig-1R üzerinden gerçekleştiğini göstermektedir. DMT ve SA4503'ün aynı dozları birbiri ile kıyaslandığında, total oksidan kapasiteyi azaltmakta endojen ligand olarak DMT'nin SA4503'ten daha güçlü bir etki gösterdiği de tespit edildi.

Sig-1R agonistlerinin *in vivo* ve *in vitro* birçok nörodejeneratif hastalık modelinde güçlü nöroprotektif etkiler gösterdiği, ayrıca bu hastalıkların ardından plastisite ve onarım süreçlerini devreye soktuğu bilinmektedir. Bu nedenle son yıllarda klinikte kullanılabilecek etkili Sig-1R selektif agonistlerinin geliştirilmesi konusuna büyük bir ilgi vardır. DMT'nin olası fizyolojik etkilerini karşılaştırmak için çalışmamızda kullandığımız selektif Sig-1R agonisti SA4503, akut serebral iskemi ve majör depresyon hastalarında faz II klinik çalışmalarına dahil edilmiş bir moleküldür. Bu nedenle çalışmamızda SA4503'ün nöroprotektif, antioksidan ve neurite oluşumunu uyarıcı etkileri ile ilgili elde ettiğimiz bulgular hem bu molekülün hem de diğer Sig-1R agonistlerinin klinikte kullanımını açısından önemlidir.

Çalışmamızda DMT'nin Sig-1R üzerinden hem neurite oluşumunu uyardığını hem de oksidan yanıtı baskılayarak nöroprotektif etki gösterdiğini tespit ettik. Her iki etki, hem nöronların hem de fonksiyonel nöronal bağlantıların kaybedildiği ve oksidatif stres hasarının görüldüğü nörodejeneratif hastalıklar için DMT'yi yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde önemli bir noktaya getirebilecek etkilerdir. DMT'nin Sig-1R üzerinden gerçekleştireceği fizyolojik etkilerin aydınlatılması ileride bu molekülün klinik kullanımına olanak tanıyabilir.

Nöroprotektif etki ile birlikte neurite oluşumunun arttırılması, günümüzde nörodejenerasyonun ve sinaptik bağlantılarda hasarın olduğu hastalıklarda başta gelen tedavi stratejilerinden biridir. Sig-1R agonistlerinin hasarlanmış veya tamamen

kaybedilmiş nöronal bağlantıların yeniden kurulması açısından klinikte önemli rol oynayabileceği gösterilmiştir (Guzman-Lenis ve ark. 2009; Ruscher ve ark. 2011; Francardo ve ark. 2014; Peviani ve ark. 2014). Çalışmamızda DMT'nin Sig-1R üzerinden gerçekleştirdiğini tespit ettiğimiz neurite oluşumunu uyarıcı etkisinin de bu kapsamda önemli olduğunu düşünmekteyiz. DMT'nin bu etkisinde hangi sinyal yollarının devreye girdiğini anlamak için daha detaylı moleküler çalışmalar yapmayı amaçlamaktayız.

Oksidatif stres hasarının görüldüğü nörodejeneratif hastalıklarda antioksidan uygulamaları günümüzde kabul gören tedavi yaklaşımlarındandır. Ancak uygulanan antioksidanın kan beyin bariyerini geçerek beyine terapötik dozlarda ulaşması gerekmektedir (Chen ve ark. 2012). Bu açıdan ele alındığında DMT'nin, kan beyin bariyerini geçerek yüksek dozlarda beyine ulaşabilmesi ve nöronlara alınarak yüksek konsantrasyonlarda depo edilebilmesi moleküle terapötik kullanımı açısından avantaj sağlayabilir. Çalışmamızda kullandığımız Sig-1R agonisti SA4503'ün de kan beyin bariyerini geçerek beyinde Sig-1R'lerine bağlanabildiği pozitron emisyon tomografisi çekimleri ile gösterilmiştir (Kawamura ve ark. 2000; Ishiwata ve ark. 2008).

Nörodejeneratif hastalıklarda antioksidan tedavi stratejilerinden bir diğeri ise son yıllarda antioksidan genlerin ifadesini aktive eden bir transkripsiyon faktörü olan Nrf2'yi hedefleyen moleküllerin geliştirilmesidir. Nrf2, sitoplazmada bulunan bir transkripsiyon faktörüdür. Oksidatif strese yanıt olarak aktive olan faktör nükleusa giderek antioksidan genlerin ifadesini artırır ve sonuçta hücrelerde antioksidan enzimlerin üretimi artar (Chen ve ark. 2012). Sig-1R'nün ve agonistlerinin Nrf2 sinyalinin nükleusa taşınmasını uyararak antioksidan enzimlerin üretimini arttırdığı gösterilmiştir (Pal ve ark. 2012; Mori ve ark. 2013). Bu bilgi Sig-1R agonistlerinin ve Sig-1R üzerinden antioksidan etki gösterdiğini tespit ettiğimiz DMT'nin antioksidan tedavi stratejilerinde hedef molekül olarak yer alabileceğini göstermektedir. Bu nedenle, çalışmamızın devamında DMT ve Sig-1R agonisti SA4503'ün nöroprotektif ve antioksidan etkisinin Nrf2 ile ilişkisini araştırmayı düşünmekteyiz.

DMT; endojen bir ligand olması, fizyolojik veya psikolojik bağımlılığa ve adaptasyona neden olmaması ayrıca yüksek dozlarda vücuda alındığında herhangi bir organ toksisitesine yol açmaması nedeniyle iyi tolere edilen bir moleküldür. Vücuda intravenöz yolla alındığında ya da fizyolojik olarak periferik dokularda üretildikten

sonra kan beyin bariyerini geçerek nöronlara alınabilmektedir ve nöronal vesiküllerde depo edilerek saklanabilmektedir (Cozzi ve ark. 2009; Vitale ve ark. 2011). Stres koşullarında üretiminin arttığı da bilinmektedir (Christian ve ark. 1977; Frecska ve ark. 2013). Dolayısıyla DMT organizmanın stres altında olduğu patolojik koşullara adaptasyonun sağlanmasında rol oynayabilir ve bu bağlamda terapötik amaçla kullanılabilir.

Frecka ve ark. (2013) da DMT'nin Sig-1R aracılı nöroprotektif ve rejeneratif etkilerinin tanımlanması durumunda, acil tıpta kardiyak arrest, kardiyopulmoner resüsitasyon, miyokardiyal enfarktüs, inme, yeni doğan bakımı ve benzeri süreçlerde adaptif mekanizmalarda rol oynayan faydalı bir terapötik ajan olarak klinikte kullanılabileceğini ileri sürmektedirler. Ancak DMT'nin yeni tedavi stratejilerinde yer alması için molekülün fizyolojik rolünü ortaya koyacak daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

DMT'nin çalışmamızda tespit edilen neurite oluşumunu uyarıcı ve nöroprotektif etkilerinin farklı nöron tiplerinde hatta plastisite ve nöroenflamasyonda rol alan glial hücrelerde de test edilmesi ve farklı nörodejeneratif hastalık modellerinde in vitro ve daha sonra in vivo olarak araştırılması gerekmektedir.

Sonuç olarak çalışmamız, DMT'nin Sig-1R üzerinden nöronlarda aksonal ve dendritik yapıların oluşması için gerekli olan ilk temel basamak olan neurite oluşumunu uyardığını, antioksidan etki ile nöronal hücreleri oksidatif stres hasarına karşı koruduğunu gösteren ilk çalışma olması açısından oldukça özgündür. Çalışmamızdan elde edilen bu bulguların endojen Sig-1R ligandı olan DMT'nin bilinmeyen fizyolojik etkilerini aydınlatmaya katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

Ajmo, C.T., Vernon, D.O., Collier, L., Pennypacker, K.R., Cuevas, J. (2006). Sigma receptor activation reduces infarct size at 24 hours after permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *Current Neurovascular Research*, **3**, 89-98.

Araújo, A.M., Carvalho, F., Bastos, M.L., Guedes de Pinho, P., Carvalho, M. (2015). The hallucinogenic world of tryptamines: an updated review. *Archives Toxicology*, **89**, 1151-73.

Arévalo, J.C. ve Wu, S.H. (2006). Neurotrophin signaling: many exciting surprises!. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **63**, 1523–1537.

Barker, S.A., Beaton, J.M., Christian, S.T., Monti, J.A., Morris, P.E. (1982). Comparison of the brain levels of N,N-dimethyltryptamine and alpha, alpha, beta,beta-tetradeutero-N,N-dimethyltryptamine following intraperitoneal injection. The in vivo kinetic isotope effect. *Biochemical Pharmacology*, **31**, 2513–2516.

Barker, S.A., McIlhenny, E.H. ve Strassman, R. (2012). A critical review of reports of endogenous psychedelic N, N-dimethyltryptamines in humans: 1955–2010. *Drug Testing and Analysis*, **4**, 617–635.

Barker, S.A., Monti, J.A., Christian, S.T. (1981). N,N-dimethyltryptamine: an endogenous hallucinogen. *International Review of Neurobiology*, **22**, 83–110.

Beaudoin, G.M., Lee, S.H., Singh, D., Yuan, Y., Ng, Y.G., Reichardt, L.F. ve ark. (2012). Culturing pyramidal neurons from the early postnatal mouse hippocampus and cortex. *Nature Protocols*, **7**, 1741-1754.

Behensky, A.A., Yasny, I.E., Shuster, A.M., Seredenin, S.B., Petrov, A.V. ve Cuevas, J. (2013a). Afobazole activation of sigma-1 receptors modulates neuronal responses to amyloid-beta25-35. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **347**, 468–477.

Behensky, A.A., Yasny, I.E., Shuster, A.M., Seredenin, S.B., Petrov, A.V. ve Cuevas, J. (2013b). Stimulation of sigma receptors with afobazole blocks activation of microglia and reduces toxicity caused by amyloid-beta25-35. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **347**, 458–467.

Benn, S.C. ve Woolf, C.J. (2004). Adult neuron survival strategies-slammung on the brakes. *Nature Reviews of Neuroscience*, **5**, 686-700.

Berbari, N.F., Bishop, G.A., Askwith, C.C., Jacqueline, S., Lewis, J.S. ve Mykytyn, K. (2007). Hippocampal Neurons Possess Primary Cilia in Culture. *Journal of Neuroscience Research*, **85**, 1095–1100.

Berge, O.G., Chacho, D. ve Hole, K. (1983). Inhibitory effect of 5-methoxy- N,N dimethyltryptamine on the synaptosomal uptake of 5-hydroxytryptamine. *European Journal of Pharmacology*, **90**, 293–296.

Berridge, M.J. (1998). Neuronal calcium signaling. *Neuron*, **21**, 13–26.

Bhardwaj, A., Sawada, M., London, E.D., Koehler, R.C., Traystman, R.J. ve Kirsch, J.R. (1998). Potent α_1 -receptor ligand 4-phenyl-1-(4-phenylbutyl) piperidine modulates basal and N-methyl-D-aspartate-evoked nitric oxide production in vivo. *Stroke*, **29**, 2404-2410.

Bouso, J.C., Gonzalez, D., Fondevila, S., Cutchet, M., Fernandez, X., Ribeiro Barbosa, P.C. ve ark. (2012). Personality, psychopathology, life attitudes and neuropsychological performance among ritual users of ayahuasca: a longitudinal study. *PLoS One*, **7**, e42421.

Brewer, G.J. (1997). Isolation and culture of adult rat hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience Methods*, **71**, 143–155.

Bucci, C., Alifano, P. ve Cogli, L. The Role of Rab Proteins in Neuronal Cells and in the Trafficking of Neurotrophin Receptors. *Membranes*, **4**, 642-677.

Cakic, V., Potkonyak, J. ve Marshall, A. (2010). Dimethyltryptamine (DMT): subjective effects and patterns of use among Australian recreational users. *Drug and Alcohol Dependence*, **111**, 30–37.

Callaway, J.C. (1988). A proposed mechanism for the visions of dream sleep. *Medical Hypotheses*, **26**, 119–124.

Cao, S.S. ve Kaufman, R.J. (2014). Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cell fate decision and human disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, **21**, 396-413.

Carbonaro, T.M. ve Gatch, M.B. (2016). Neuropharmacology of N,N-dimethyltryptamine. *Brain Research Bulletin*, **126**, 74-88.

Chen, X., Guo, C. ve Kong, J. (2012). Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Neural Regeneration Research*, **7**, 376–385.

Chen, Y., Hajipour, A.R., Sievert, M.L., Arbabian, M., Ruoho, A.H. (2007). Characterization of the cocaine binding site on the sigma-1 receptor. *Biochemistry*, **46**, 3532 -3542.

Christian, S.T., Harrison, R., Quayle, E., Pagel, J., Monti, J. (1977). The in vitro identification of dimethyltryptamine (DMT) in mammalian brain and its characterization as a possible endogenous neuroregulatory agent. *Biochemical Medicine*, **18**, 164–183.

Cozzi, N.V., Gopalakrishnan, A., Anderson, L.L., Feih, J.T., Shulgin, A.T., Daley, P.F. ve ark. (2009). Dimethyltryptamine and other hallucinogenic tryptamines exhibit substrate behavior at the serotonin uptake transporter and the vesicle monoamine transporter. *Journal of Neural Transmission*, **116**, 1591–1599.

Cuevas, J., Behensky, A., Deng, W., Katnik, C. (2011). Afobazole modulates neuronal response to ischemia and acidosis via activation of sigma-1 receptors. *Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics*, **339**, 152-160.

Cuevas, J., Rodriguez, A., Behensky, A., Katnik, C. (2011). Afobazole modulates microglial function via activation of both sigma-1 and sigma-2 receptors. *Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics*, **339**, 161-172.

Cui, Q. (2006). Actions of neurotrophic factors and their signaling pathways in neuronal survival and axonal regeneration. *Molecular Neurobiology*, **33**, 155–179.

Daumann, J., Wagner, D., Heekeren, K., Neukirch, A., Thiel, C.M., Gouzoulis-Mayfrank, E. (2010). Neuronal correlates of visual and auditory alertness in the DMT and ketamine model of psychosis. *Journal of Psychopharmacology*, **24**, 1515–1524.

DeCoster, M.A., Klette, K.L., Knight, E.S., Tortella, F.C. (1995). Sigma receptor-mediated neuroprotection against glutamate toxicity in primary rat neuronal cultures. *Brain Research*, **671**, 45–53.

Dehmelt, L. ve Halpain, S. (2004). Actin and Microtubules in neurite initiations: Are Maps the missing link?. *Journal of Neurobiology*, **58**, 18–33.

Dirnagl, U. (2012). Pathobiology of injury after stroke: the neurovascular unit and beyond. *Annals of New York Academy of Sciences*, **1268**, 21-25.

Domínguez-Clavé, E., Soler, J., Elices, M., Pascual, J.C., Álvarez, E., de la Fuente Revenga, M. ve ark. (2016). Ayahuasca: pharmacology, neuroscience and therapeutic potential. *Brain Research Bulletin*, **126**, 89-101.

Dotti, C.G., Sullivan, C.A. ve Banker, G.A. (1988). The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *The Journal of Neuroscience*, **8**, 1454–1468.

Dos Santos, R.G., Balthazar, F.M., Bouso, J.C., Hallak, J.E. (2016). The current state of research on ayahuasca: A systematic review of human studies assessing psychiatric symptoms, neuropsychological functioning, and neuroimaging. *Journal of Psychopharmacology*, **30**, 1230-1247.

Dos Santos, R.G., Grasa, E., Valle, M., Ballester, M.R., Bouso, J.C., Nomdedéu, J.F. ve ark. (2012). Pharmacology of ayahuasca administered in two repeated doses. *Psychopharmacology*, **219**, 1039–1053.

Dos Santos, R.G., Valle, M., Bouso, J.C., Nomdedeu, J.F., Rodriguez-Espinosa, J., McIlhenny, E.H. ve ark. (2011). Autonomic, neuroendocrine, and immunological effects of ayahuasca A comparative studywith D-amphetamine. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, **31**, 717–726.

Dun, Y., Thangaraju, M., Prasad, P., Ganapathy, V., Smith, S.B. (2007). Prevention of excitotoxicity in primary retinal ganglion cells by (+)-pentazocine, a sigma receptor-1 specific ligand. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **48**, 4785–4794.

Enunlu, I., Ozansoy, M. ve Basak, A.N. (2011). Alfa-class prefoldin protein UXT is a novel interacting partner of Amyotrophic Lateral Sclerosis 2 (Als2) protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **413**, 471-475.

Fábregas, J.M., González, D., Fondevila, S., Cutchet, M., Fernández, X., Barbosa, P.C.R. ve ark. (2010). Assessment of addiction severity among ritual users of ayahuasca. *Drug and Alcohol Dependence*, **111**, 257–261.

Feng, C., Luo, T., Zhang, S., Liu, K., Zhang, Y., Luo, Y. ve ark. (2016). Lycopene protects human SH-SY5Y neuroblastoma cells against hydrogen peroxide-induced death via inhibition of oxidative stress and mitochondria-associated apoptotic pathways. *Molecular Medicine Reports*, **13**, 4205-4214.

Flynn, K.C. (2013). The cytoskeleton and neurite initiation, *Bioarchitecture*, **3**: 86-109.

- Fontanilla, D., Johannessen, M., Hajipour, A.R., Cozzi, N.V., Jackson, M.B. ve Ruoho, A.E. (2009). The hallucinogen N,N-dimethyltryptamine (DMT) is an endogenous sigma-1 receptor regulator. *Science*, **323**, 934-937.
- Francardo, V., Bez, F., Wieloch, T., Nissbrandt, H., Ruscher, K. ve Cenci, M.A. (2014). Pharmacological stimulation of sigma-1 receptors has neurorestorative effects in experimental parkinsonism. *Brain*, **137**, 998-2014.
- Frecska, E., Szabo, A., Winkelman, M.J., Luna, L.E., McKenna, D.J. (2013). A possibly sigma-1 receptor mediated role of dimethyltryptamine in tissue protection, regeneration, and immunity. *Journal of Neural Transmission*, **120**, 1295–1303.
- Fujimoto, M. ve Hayashi, T. (2011). New insights into the role of mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane. *International Review of Cell and Molecular Biology*, **292**, 73–117.
- Fujimoto, M., Hayashi, T., Urfer, R., Mita, S., Su, T.P. (2012). Sigma-1 receptor chaperones regulate the secretion of brain-derived neurotrophic factor. *Synapse*, **66**, 630–639.
- George, J., Dravid, S.M., Prakash, A., Xie, J., Peterson, J., Jabba, S.V., Baden, D.G., Murray, T.F. (2009). Sodium channel activation augments NMDA receptor function and promotes neurite outgrowth in immature cerebrocortical neurons. *The Journal of Neuroscience*, **29**, 3288-32301.
- Gallimore, A.R. ve Strassman, R.J. (2016). A Model for the Application of Target-Controlled Intravenous Infusion for a Prolonged Immersive DMT Psychedelic Experience. *Frontiers of Pharmacology*, **7**,1-11.
- Gekker, G., Hu, S., Sheng, W.S., Rock, R.B., Lokensgard, J.R., Peterson, P.K. (2006). Cocaine-induced HIV-1 expression in microglia involves sigma-1 receptors and transforming growth factor-beta1. *Internationale Immunopharmacology*, **6**, 1029–1033.

Goyagi, T., Goto, S., Bhardwaj, A., Dawson, V.L., Hurn, P.D. ve Kirsch, J.R. (2001). Neuroprotective effect of σ_1 -receptor ligand 4-phenyl-1-(4-phenylbutyl) piperidine (PPBP) is linked to reduced neuronal nitric oxide production. *Stroke*, **32**, 1613-1620.

Griesmaier, E., Posod, A., Gross, M., Neubauer, V., Wegleiter, K., Hermann, M. ve ark. (2012). Neuroprotective effects of the sigma-1 receptor ligand PRE-084 against excitotoxic perinatal brain injury in newborn mice. *Experimental Neurology*, **237**, 388–395.

Guzmán-Lenis, M.S., Navarro, X. ve Casas, C. (2009). Selective sigma receptor agonist 2-(4-morpholinethyl)1-phenylcyclohexane-carboxylate (PRE084) promotes neuroprotection and neurite elongation through protein kinase C (PKC) signaling on motoneurons. *Neuroscience*, **162**, 31-38.

Ha, Y., Shanmugam, A.K., Markand, S., Zorrilla, E., Ganapathy, V. ve Smith, S.B. (2014). Sigma receptor 1 modulates ER stress and Bcl2 in murine retina. *Cell and Tissue Research*, **356**, 15-27.

Hall, A.A., Herrera, Y., Ajmo, C.T., Cuevas, J., Pennypacker, K.R. (2009). Sigma receptors suppress multiple aspects of microglial activation. *Glia*, **57**, 744-754.

Hanner, M., Moebius, F.F., Flandorfer, A., Knaus, H.G., Striessnig, J., Kempner, E. ve ark. (1996). Purification, molecular cloning and expression of the mammalian sigma-1 binding site. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, **93**, 8072-8077.

Hashimoto, K. (2015a). Activation of sigma-1 receptor chaperone in the treatment of neuropsychiatric diseases and its clinical implication. *Journal of Pharmacological Sciences*, **127**, 6-9.

Hashimoto, K. (2015b). Targeting the sigma-1 receptor chaperone in the treatment of perinatal brain injury. *Experimental Neurology*, **265**, 118-121.

Hayashi, T., Maurice, T. ve Su, T.P. (2000). Ca^{2+} signaling via σ 1 receptors: novel regulatory mechanism affecting intracellular Ca^{2+} concentration. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **293**, 788 -798.

Hayashi, T. ve Su, T.P. (2003a). Sigma-1 receptors (sigma-1 binding sites) form raft-like microdomains and target lipid droplets on the endoplasmic reticulum: roles in endoplasmic reticulum lipid compartmentalization and export. *The Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics*, **306**, 718-725.

Hayashi, T. ve Su, T.P. (2003b). Intracellular Dynamics of sigma-1 receptors (sigma-1 binding sites) in NG108-15 cells. *The Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics*, **306**, 726-733.

Hayashi, T. ve Su, T.P. (2007). Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca^{2+} signaling and cell survival. *Cell*, **131**, 596-610.

Hayashi, T. ve Su, T.P. (2008) An update on the development of drugs for neuropsychiatric disorders: focusing on the sigma 1 receptor ligand. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, **12**, 45-58.

Hayashi, T., Rizzuto, R., Hajnoczky, G., Su, T.P. (2009). MAM: More than just a housekeeper. *Trends in Cellular Biology*, **19**, 81–88.

Hayashi, T. ve Fujimoto, M. (2010). Detergent-resistant microdomains determine the localization of sigma-1 receptors to the endoplasmic reticulum-mitochondrion junction. *Molecular Pharmacology*, **77**, 517-528.

Hayashi, T., Tsai, S.Y., Mori, T., Fujimoto, M., Su, T.P. (2011). Targeting ligand-operated chaperone sigma-1 receptors in the treatment of neuropsychiatric disorders. *Expert Opinions on Therapeutic Targets*, **15**, 557–577.

Hayashi T. (2015). Conversion of psychological stress into cellular stress response: roles of the sigma-1 receptor in the process. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, **69**, 179-191.

Henley, J. ve Poo, M. (2004). Guiding neuronal growth cones by Ca²⁺ signals. *Trends in Cellular Biology*, **14**, 320–330.

Hyrskyluoto, A., Pulli, I., Tornqvist, K., Ho, T.H., Korhonen, L. ve Lindholm, D. (2013). Sigma-1 receptor agonist PRE084 is protective against mutant huntingtin-induced cell degeneration: involvement of calpastatin and the NF-kappaB pathway. *Cell Death & Disease*, **4**, e646.

Iketani, M., Imaizumi, C., Nakamura, F., Jeromin, A., Mikoshiba, K., Goshima, Y. ve ark. (2009). Regulation of neurite outgrowth mediated by neuronal calcium sensor-1 and inositol 1,4,5-triphosphate receptor in nerve growth cones. *Neuroscience*, **161**, 743–752.

Ishikawa, M. ve Hashimoto, K. (2010). The role of sigma-1 receptors in the pathophysiology of neuropsychiatric diseases. *Journal of Receptor, Ligand and Channel Research*, **2010**, 25–36.

Ishiwata, K., Ishii, K., Kimura, Y., Kawamura, K., Oda, K., Sasaki, T. Ve ark. (2008). Successive positron emission tomography measurement of cerebral blood flow and neuroreceptors in the human brain: an 11C-SA4503 study. *Annals of Nuclear Medicine*, **22**, 411–416.

Ishima, T. ve Hashimoto, K. (2012). Potentiation of nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells by ifenprodil: The role of sigma-1 and IP3 receptors. *PLoS ONE*, **7**, e37989.

Ishima, T., Nishimura, T., Iyo, M., Hashimoto, K. (2008). Potentiation of nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells by donepezil: Role of sigma-1 receptors

and IP3 receptors. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, **32**, 1656–1659.

Jacob, M.S. ve Presti D.E. (2005) Endogenous psychoactive tryptamines reconsidered: an anxiolytic role for dimethyltryptamine. *Medical Hypotheses*, **64**, 930–937.

Karkkainen, J., Forsstrom, T., Tornaesus, J., Wahala, K., Kiuru, P., Honkanen, A. ve ark. (2005). Potentially hallucinogenic 5-hydroxytryptamine receptor ligands bufotenine and dimethyltryptamine in blood and tissues. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, **65**, 189–199.

Katnik, C., Garcia, A., Behensky, A.A., Yasny, I.E., Shuster, A.M., Seredenin, S.B. ve ark. (2014). Treatment with afobazole at delayed time points following ischemic stroke improves long-term functional and histological outcomes. *Neurobiology of Disease*, **62**, 354–364.

Katnik, C., Guerrero, W.R., Pennypacker, K.R., Herrera, Y., Cuevas, J. (2006). Sigma-1 receptor activation prevents intracellular calcium dysregulation in cortical neurons during in vitro ischemia. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **319**, 1355–1365.

Kawamura, K., Ishiwata, K., Tajima, H., Ishii, S., Matsuno, K., Homma, Y. ve ark. (2000). In vivo evaluation of [¹¹C]SA4503 as a PET ligand for mapping CNS sigma-1 receptors. *Nuclear Medicine and Biology*, **27**, 255–261.

Kikuchi-Utsumi, K. ve Nakaki, T. (2008). Chronic treatment with a selective ligand for the sigma-1 receptor chaperone, SA4503, up-regulates BDNF protein levels in the rat hippocampus. *Neuroscience Letters*, **440**, 19–22.

Kimura, Y., Fujita, Y., Shibata, K., Mori, M., Yamashita, T. (2013). Sigma-1 Receptor Enhances Neurite Elongation of Cerebellar Granule Neurons via TrkB Signaling. *PLoS ONE*, **8**, e75760.

Kimura, Y., Fujita, Y. ve Yamashita, T. (2014). Effect of the Sigma-1 receptor on neurite outgrowth. *Receptors and Clinical Investigation*, **1**, e50.

Kiryushko, D., Berezin, V. ve Bock, E. (2004). Regulators of neurite outgrowth. *Annals New York Academy of Sciences*, **1014**, 140-154.

Kourrich, S., Su, T.P., Fujimoto, M., Bonci, A. (2012). The sigma-1 receptor: Roles in neuronal plasticity and disease. *Trends in Neuroscience*, **35**, 762-771.

Klette, K.L., DeCoster, M.A., Moreton, J.E., Tortella, F.C. (1995). Role of calcium in sigma mediated neuroprotection in rat primary cortical neurons. *Brain Research*, **704**, 31-41.

Klouz, A., Said, D.B., Ferchichi, H., Kourda, N., Ouanes, L., Lakhal, M. ve ark. (2008). Protection of cellular and mitochondrial functions against liver ischemia by N-benzyl-N'-(2-hydroxy-3,4-dimethoxybenzyl)-piperazine (BHDP), a sigma1 ligand. *European Journal of Pharmacology*, **578**, 292-299.

Klouz, A., Tillement, J.P., Boussard, M.F., Wierzbicki, M., Berezowski, V., Cecchelli, R. ve ark. (2003). [3H]BHDP as a novel and selective ligand for s1 receptors in liver mitochondria and brain synaptosomes of the rat. *FEBS Letters*, **553**, 157-162.

Lestanova, Z., Bacova, Z. ve Bakos, J. (2016). Mechanisms involved in the regulation of neuropeptide-mediated neurite outgrowth: a minireview. *Journal of Endocrine Regulations*, **50**, 72-82.

Li, D., Zhang, S.Z., Yao, Y.H., Xiang, Y., Ma, X.Y., Wei, X.L. ve ark. (2017). Sigma-1 receptor agonist increases axon outgrowth of hippocampal neurons via voltage-gated calcium ions channels. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, **23**, 930-939.

Lin, R.L., Sargeant, S. ve Narasimhachari, N. (1974). Indolethylamine-Nmethyltransferase in developing rabbit lung. *Developmental Psychobiology*, **7**, 475-481.

Liu, Z., Zhou, T., Ziegler, A.C., Dimitrion, P., Zuo, L. (2017). Oxidative stress in neurodegenerative diseases: from molecular mechanisms to clinical applications. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2017**, 1-11.

Lindholm, D., Wootz, H. ve Korhonen, L. (2006). ER stress and neurodegenerative diseases. *Cell Death and Differentiation*, **13**, 385-392.

Lobner, D. ve Lipton, P. (1990). Sigma-ligands and non-competitive NMDA antagonists inhibit glutamate release during cerebral ischemia. *Neuroscience Letters*, **117**, 169-174.

Luedtke, R.R., Perez, E., Yang, S.H., Liu, R., Vangveravong, S., Tu, Z. ve ark. (2012). Neuroprotective effects of high affinity sigma 1 receptor selective compounds. *Brain Research*, **1441**, 17-26.

Mancuso, R., Olivan, S., Rando, A., Casas, C., Osta, R. ve Navarro, X. (2012). Sigma-1R agonist improves motor function and motoneuron survival in ALS mice. *Neurotherapeutics*, **9**, 814-826.

Mandell, A.J. ve Morgan, M. (1971). Indole(ethyl)amine N-methyltransferase in human brain. *Nature: New Biology*, **230**, 85-87.

Manohar, M., Banister, S.D., Beinart, C., O'Brien-Brown, J., Kassiou, M. (2015). Recent advances in the development of sigma-1 receptor ligands. *Australian Journal of Chemistry*, **68**, 600-609.

Martin, W.R., Eades, C.G., Thompson, J.A., Huppler R.E., Gilbert P.E. (1976). The effects of morphine and nalorphine-like drugs in the non-dependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **197**, 517-532.

Martina, M., Turcotte, M.E., Halman, S., Bergeron, R. (2007). The sigma-1 receptor modulates NMDA receptors synaptic transmission and plasticity via SK channels in rat hippocampus. *Journal of Physiology*, **578**, 143–157.

Marzullo, G., Rosengarten, H. ve Friedhoff, A.J. (1977). A peptide-like inhibitor of N-methyltransferase in rabbit brain. *Life Science*, **20**, 775–783.

Mattson, M.P. (2007). Mitochondrial regulation of neuronal plasticity. *Neurochemistry Research*, **32**, 707–715.

Mattson, M.P., LaFerla, F.M., Chan, S.L., Leissring, M.A., Shepel, N. ve Geiger, J.D. (2000). Calcium signaling in the ER: its role in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends in Neuroscience*, **23**, 222–229.

Maurice, T., Su, T.P., Parish, D.W., Nabeshima, T., Privat, A. (1994). PRE084, a σ selective PCP derivative, attenuates MK-801-induced impairment of learning in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **49**, 859 -69.

Mavlyutov, T.A., Epstein, M. ve Guo, L.W. (2015). Subcellular localization of the sigma- 1 receptor in retinal neurons – an electron microscopy study. *Scientific Reports*, **5**, 10689.

Mavlyutov, T.A., Epstein, M.L., Liu, P., Verbny, Y.I., Ziskind-Conhaim, L., Ruoho, A.E. (2012). Development of the sigma-1 receptor in C-terminals of motoneurons and colocalization with the N,N-dimethyltryptamine forming enzyme, indole-N-methyl transferase. *Neuroscience*, **206**, 60–68.

Mavlyutov, T.A. ve Ruoho, A.E. (2007). Ligand-dependent localization and intracellular stability of sigma-1 receptors in CHO-K1 cells. *Journal of Molecular Signaling*, **2**, 8.

McKenna, D.J. (2004). Clinical investigations of the therapeutic potential of ayahuasca: rationale and regulatory challenges. *Pharmacology and Therapeutics*, **102**, 111-129.

McKenna, D.J., Towers, G.H. ve Abbott, F. (1984). Monoamine oxidase inhibitors in South American hallucinogenic plants: Tryptamine and β -carboline constituents of ayahuasca. *Journal of Ethnopharmacology*, **10**, 195–223.

Meunier, J. ve Hayashi, T. (2010). Sigma-1 receptors regulate Bcl-2 expression by reactive oxygen species-dependent transcriptional regulation of nuclear factor kappaB. *Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics*, **332**, 388–397.

Monnet, F.P. (2005). Sigma-1 receptor as regulator of neuronal intracellular Ca²⁺: clinical and therapeutic relevance. *Biology of the Cell*, **97**, 873–883.

Monnet, F.P., Debonnel, G, Junien, J.L., DeMontigny, C. (1990). N-methyl-D-aspartate- induced neuronal activation isselectively modulated by sigma receptors. *European Journal of Pharmacology*, **179**, 441–445.

Mori, T., Hayashi, T. ve Su, T.P. (2012). Compromising sigma-1 receptors at the endoplasmic reticulum render cytotoxicity to physiologically relevant concentrations of dopamine in a nuclear factor-kB/Bcl-2-dependent mechanism: potential relevance to PD. *Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics*, **341**, 663-671.

Mori, T., Hayashi, T., Hayashi, E., Su, T.P. (2013). Sigma-1 receptor chaperone at the ER-mitochondrion interface mediates the mitochondrion-ER-nucleus signaling for cellular survival. *PLoS ONE*, **8**, e76941.

Morin-Surun, M.P., Collin, T., Denavit-Saubie, M., Baulieu, E.E., Monnet, F.P. (1999). Intracellular sigma1 receptor modulates phospholipase C and protein kinase C activities in the brainstem. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, **96**, 8196-8199.

Morrison, R.S., Kinoshita, Y., Johnson, M.D., Ghatan, S., Ho, J.T. ve Garden, G. (2002). Neuronal survival and cell death signaling pathways. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **513**, 41-86.

Nagai, F., Nonaka, R., Satoh, K., Kamimura, H. (2007). The effects of non-medically used psychoactive drugs on monoamine neurotransmission in rat brain. *European Journal of Pharmacology*, **559**, 132–137.

Narita, K., Hisamoto, M., Okuda, T., Takeda, S. (2011). Differential Neuroprotective Activity of Two Different Grape Seed Extracts. *PLoS ONE*, **6**, e14575.

Navarro, G., Moreno, E., Aymerich, M., Marcellino, D., McCormick, P.J., Mallol, J. ve ark. (2010). Direct involvement of sigma-1 receptors in the dopamine D1 receptor-mediated effects of cocaine. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, **107**, 18676–18681.

Nguyen, L., Lucke-Wold, B.P., Mookerjee, S.A., Cavendish, J.Z., Robson, M.J., Scandinaro, A.L. ve ark. (2014a). Role of sigma-1 receptors in neurodegenerative diseases. *Journal of Pharmacological Sciences*, **127**, 17-29.

Nguyen, L., Lucke-Wold, B.P., Mookerjee, S., Kaushal, N., Matsumoto, R.R. (2017). Sigma-1 receptors and Neurodegenerative Diseases: Towards a hypothesis of sigma-1 receptors as amplifiers of neurodegeneration and neuroprotection. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **964**, 133-152.

Nguyen, L., Kaushal, N., Robson, M.J., Matsumoto, R.R. (2014b). Sigma receptors as potential therapeutic targets for neuroprotection. *European Journal of Pharmacology*, **743**, 42-47.

Nishimura, T., Ishima, T., Iyo, M., Hashimoto, K. (2008). Potentiation of nerve growth factor-induced neurite outgrowth by fluvoxamine: Role of sigma-1 receptors, IP3 receptors and cellular signaling pathways. *PLoS ONE*, **3**, e2558.

Ortega-Roldan, J.L., Ossa, F. ve Schnell, J.R. (2013). Characterization of the human sigma-1 receptor chaperone domain structure and binding immunoglobulin protein (BiP) interactions. *Journal of Biological Chemistry*, **288**, 21448–21457.

Osorio, F.L., Sanches, R.F., Macedo, L.R., Santos, R.G., Maia-de-Oliveira, J., Wichert-Ana, L. ve ark. (2015). Antidepressant effects of a single dose of ayahuasca in patients with recurrent depression: a preliminary report. *Revista Brasileira Psiquiatria*, **37**, 13–20.

Oyung, B.Y. ve Giffard, R.G. (2012). ER-Mitochondria crosstalk during cerebral ischemia: Molecular Chaperones and ER-Mitochondrial Calcium Transfer. *International Journal of Cell Biology*, **2012**, 1-8.

Pal, A., Fontanilla, D., Gopalakrishnan, A., Chae, Y.K., Markley, J.L. ve Ruoho, A.E. (2012). The sigma-1 receptor protects against cellular oxidative stress and activates antioxidant response elements. *European Journal of Pharmacology*, **682**, 12-20.

Pabba, M. (2013). The essential roles of protein-protein interaction in sigma-1 receptor functions. *Frontiers of Cellular Neurosciences*, **23**, 7-50.

Patapoutian, A. ve Reichardt, L.F. (2001). Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Current Opinion in Neurobiology* **11**, 272–280.

Penas, C., Pascual-Font, A., Mancuso, R., Forés, J., Casas, C. ve Navarro, X. (2011). Sigma receptor agonist 2-(4-morpholinethyl)1 phenylcyclohexanecarboxylate (Pre084) increases GDNF and BiP expression and promotes neuroprotection after root avulsion injury. *Journal of Neurotrauma*, **28**, 831-840.

Peviani, M., Salvaneschi, E., Bontempi, L., Petese, A., Manzo, A., Rossi, D. ve ark. (2014). Neuroprotective effects of the sigma-1 (S1R) agonist PRE-084, in a mouse model of motor neuron disease not linked to SOD1 mutation. *Neurobiology of Disease*, **62**, 218-232.

Pic-Taylor, A., Gueiros da Motta, L., Alves de Moraes, J., Junior, W.M., de Fátima, W., Santos, A. ve ark. (2015). Behavioural and neurotoxic effects of ayahuasca infusion (Banisteriopsis caapi and Psychotria viridis) in female Wistar rat. *Behavioural Processes*, **118**, 102–110.

Pitol, D.L., Siéssere, S., Dos Santos, R.G., Rosa, M.L.N.M., Hallak, J.E.C., Scalize, P.H. ve ark. (2015). Ayahuasca alters structural parameters of the rat aorta. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, **66**, 58–62.

Prezzavento, O., Campisi, A., Parenti, C., Ronsisvalle, S., Arico, G., Arena, E. ve ark. (2010). Synthesis and resolution of cis-(β -)-methyl (1R,2S/1S,2R)-2-[(4-hydroxy-4-phenylpiperidin-1-yl)methyl]-1-(4methylphenyl)cyclopropanecarboxylate[(+/-)-PPCC]: new sigma receptor ligands with neuroprotective effect. *Journal of Medicinal Chemistry*, **53**, 5881-5885.

Read, D.E. ve Gorman, A.M. (2009). Involvement of Akt in neurite outgrowth. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **66**, 2975-2984.

Riba, J., Rodríguez-Fornells, A., Urbano, G., Morte, A., Antonijoan, R., Montero, M. ve ark. (2001) Subjective effects and tolerability of the South American psychoactive beverage ayahuasca in healthy volunteers. *Psychopharmacology*, **154**, 85–95.

Riba, J., Valle, M., Urbano, G., Yritia, M., Morte, A., Barbanoj M.J. (2003). Human pharmacology of ayahuasca: Subjective and cardiovascular effects, monoamine metabolite excretion, and pharmacokinetics. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **306**, 73–83.

Rizzuto, R., Marchi, S., Bonora, M., Aguiari, P., Bononi, A., De Stefani, D. ve ark. (2009). Ca²⁺ transfer from the ER to mitochondria when, how and why. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1787**, 1342-1351.

Robson, M.J., Turner, R.C., Naser, Z.J., McCurdy, C.R., Huber, J.D. ve Matsumoto, R.R. (2013). SN79, a sigma receptor ligand, blocks methamphetamine-induced microglial activation and cytokine upregulation. *Experimental Neurology*, **247**, 134–142.

Rodriguez, M.A. (2007). A methodology for studying various interpretations of the N,N-dimethyltryptamine-induced alternate reality. *Journal of Scientific Exploration*, **21**, 67-84.

Ruscher, K., Shamloo, M., Rickhag, M., Ladunga, I., Soriano, L., Gisselsson, L. ve ark. (2011). The sigma-1 receptor enhances brain plasticity and functional recovery after experimental stroke. *Brain*, **134**, 732-746.

Ruscher, K. ve Wieloch, T. (2015). The involvement of the sigma-1 receptor in neurodegeneration and neurorestoration. *Journal of Pharmacological Science*, **127**, 30-35.

Sainath, R. ve Gallo, G. (2015). Cytoskeletal and signaling mechanisms of neurite formation. *Cell and Tissue Research*, **359**, 267-278.

Santos, R.G., Landeira-Fernandez, J., Strassman, R.J., Motta, V., Cruz, A.P. (2007). Effects of ayahuasca on psychometric measures of anxiety, panic-like and hopelessness in Santo Daime members. *Journal of Ethnopharmacology*, **112**, 507–513.

Schäfer, M.K., Pfeiffer, A., Jaeckel, M., Pouya, A., Dolga, A.M. ve Methner, A. (2014). Regulators of mitochondrial Ca²⁺ homeostasis in cerebral ischemia. *Cell and Tissue Research* **357**, 395-405.

Senda T., Mita, S., Kaneda, K., Kikuchi, M., Akaike, A. (1998). Effect of SA4503, a novel sigma-1 receptor agonist against glutamate neurotoxicity in cultured rat retinal neurons. *European Journal of Pharmacology*, **342**, 105-111.

Seth, P., Ganapathy, M.E., Conway, S.J., Bridges, C.D., Smith, S.B., Casellas, P. ve ark. (2001). Expression pattern of the type 1 sigma receptor in the brain and identity of critical anionic amino acid residues in the ligand-binding domain of the receptor. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1540**, 59 -67.

Shen, Y.C., Wang, Y.H., Chou, Y.C., Liou, K.T., Yen, J.C., Wang, W.Y. ve ark. (2008). Dimemorfan protects rats against ischemic stroke through activation of sigma-1 receptor-mediated mechanisms by decreasing glutamate accumulation. *Journal of Neurochemistry*, **104**, 558–572.

Sitaram, B.R., Lockett, L., Talomsin, R., Blackman, G.L., McLeod, W.R. (1987). In vivo metabolism of 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine and N,N-dimethyltryptamine in the rat. *Biochemical Pharmacology*, **36**, 1509–1512.

Smith, S.B., Duplantier, J., Dun, Y., Mysona, B., Roon, P., Martin, P.M. ve ark. (2008). In vivo protection against retinal neurodegeneration by sigma receptor 1 ligand (+)-pentazocine. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **49**, 4154–4161.

Strassman, R.J. (1995). Hallucinogenic drugs in psychiatric research and treatment. Perspectives and prospects. *The Journal of Nervous and Mental Disease*, **183**, 127–138.

Strassman, R.J. (2001). *DMT: The Spirit Molecule. A Doctor's Revolutionary Research into the Biology of Near-death and Mystical Experiences*. New York: Park Street Press.

Strassman, R.J., Qualls, C.R. ve Berg, L.M. (1996). Differential tolerance to biological and subjective effects of four closely spaced doses of N,N-dimethyltryptamine in humans. *Biological Psychiatry*, **39**, 784–795.

Strassman, R.J., Qualls, C.R., Uhlenhuth, E.H., Kellner, R. (1994a). Dose-response study of N,N- dimethyltryptamine in humans I. Neuroendocrine, autonomic, and cardiovascular effects. *Archives of General Psychiatry*, **51**, 85–97.

Strassman, R.J., Qualls, C.R., Uhlenhuth, E.H., Kellner, R. (1994b). Dose-response study of N,N- dimethyltryptamine in humans: II. Subjective effects and preliminary results of a new rating scale. *Archives of General Psychiatry*, **51**, 98–108.

Su, T.C., Lin, S.H., Lee, P.T., Yeh, S.H., Hsieh, T.H., Chou, S.Y. ve ark. (2016). The sigma-1 receptor-zinc finger protein 179 pathway protects against hydrogen peroxide-induced cell injury. *Neuropharmacology*, **105**, 1-9.

Su, T.P. (1982). Evidence for sigma opioid receptor: binding of [3H]SKF-10047 to etorphine-inaccessible sites in guinea-pig brain. *The Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics*, **223**, 284 -290.

Su, T.P., Hayashi, T., Maurice, T., Buch, S., Ruoho, A.E. (2010). The sigma-1 receptor chaperone as an inter-organelle signaling modulator. *Trends in Pharmacological Science*, **12**, 557-566.

Su, T.P., Su, T.C., Nakamura, Y., Tsai, S.Y. (2016). The sigma receptor as a pluripotent modulator in living systems. *Trends in Pharmacological Science*, **37**, 262-278.

Su, T.P., Hayashi, T. ve Vaupel, D.B. (2009). When the endogenous hallucinogenic trace amine N,N-dimethyltryptamine meets the sigma-1 receptor. *Science Signaling*, **2**, 12.

Szabo, A., Kovacs, A., Frecska, E., Rajnavolgyi, E. (2014). Psychedelic N,N-Dimethyltryptamine and 5-Methoxy-N,N-Dimethyltryptamine Modulate Innate and Adaptive Inflammatory Responses through the Sigma-1 Receptor of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *PLoS ONE*, **9**, e106533.

Szabo, A., Kovacs, A., Riba, J., Djurovic, S., Rajnavolgyi, E. ve Frecska, E. (2016). The Endogenous Hallucinogen and Trace Amine N,N-Dimethyltryptamine (DMT) Displays Potent Protective Effects against Hypoxia via Sigma-1 Receptor Activation in Human Primary iPSC-Derived Cortical Neurons and Microglia-Like Immune Cells. *Frontiers of Neuroscience*, **10**, 423.

Szára, S. (2007). DMT at fifty. *Neuropsychopharmacologia Hungarica*, **4**, 201-205.

Tagashira, H., Bhulyan, M.S., Shioda, N., Fuknaga, K. (2014). Fluvoxamine rescues mitochondrial Ca²⁺ transport and ATP production through sigma(1)-receptor in hypertrophic cardiomyocytes. *Life Sciences*, **95**, 89–100.

Tagashira, H., Zhang, C., Lu, Y.M., Hasegawa, H., Kanai, H., Han, F. ve ark. (2013). Stimulation of sigma1-receptor restores abnormal mitochondrial Ca²⁺ mobilization and ATP production following cardiac hypertrophy. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1830**, 3082-3094.

Takebayashi, M., Hayashi, T. ve Su, T.P. (2002). Nerve growth factor-induced neurite sprouting in PC12 cells involves sigma-1 receptors: implications for antidepressants. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **303**, 1227–1237.

Takebayashi, M., Hayashi, T. ve Su, T.P. (2004). A perspective on the new mechanism of antidepressants: neuritogenesis through sigma-1 receptors. *Pharmacopsychiatry*, **37**, 208–213.

Tang, L.L., Wang, R. ve Tang, X.C. (2005). Huperzine A protects SHSY5Y neuroblastoma cells against oxidative stress damage via nerve growth factor production. *European Journal of Pharmacology*, **519**, 9-15.

Tchedre, K.T. ve Yorio, T. (2008). Sigma-1 receptors protect RGC-5 cells from apoptosis by regulating intracellular calcium, Bax levels and caspase-3 activation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **49**, 2577-2588.

Thompson, M.A., Moon, E., Kim, U.J., Xu, J., Siciliano, M.J., Weinshilboum, R.M. (1999). Human indolethylamine N-methyltransferase: cDNA cloning and expression, gene cloning, and chromosomal localization. *Genomics*, **61**, 285–297.

Thompson, M.A. ve Weinshilboum, R.M. (1998). Rabbit lung indolethylamineN-methyltransferase: cDNA and gene cloning and characterization. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 34502–34510.

Tovar-y-Romo, L.B., Penagos-Puig, A. ve Ramirez-Jarquín, J.O. (2016). Endogenous recovery after brain damage: molecular mechanisms that balance neuronal life/death fate. *Journal of Neurochemistry*, **136**, 13-27.

Tsai, S.Y., Chuang, J.Y., Tsai, M.S., Wang, X.F., Xi, Z.X., Hung, J.J. ve ark. (2015). Sigma-1 receptor mediates cocaine-induced transcriptional regulation by recruiting chromatin-remodeling factors at the nuclear envelope. *Proceeding of National Academy of Science USA*, **112**, E6562–E6570.

Tsai, S.Y., Hayashi, T., Harvey, B.K., Wang, Y., Wu, W.W., Shen, R.F. ve ark. (2009). Sigma-1 receptors regulate hippocampal dendritic spine formation via a free radical-sensitive mechanism involving Rac1xGTP pathway. *Proceeding of National Academy of Sciences USA*, **106**, 22468–22473.

Tuexun, T., Numakawa, T., Adachi, N., Kumamaru, E., Kitazawa, H., Kudo, M. ve ark. (2010). SA4503, a sigma-1 receptor agonist, prevents cultured cortical neurons from oxidative stress-induced cell death via suppression of MAPK pathway activation and glutamate receptor expression. *Neuroscience Letters*, **469**, 303-308.

Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P., Mahajan, R. T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology*, **7**, 65–74.

Vagnerova, K., Hurn, P.D., Bhardwaj, A., Kirsch, J.R. (2006). Sigma 1 receptor agonists act as neuroprotective drugs through inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Anesthesia and Analgesia*, **103**, 430-434.

Vitale, A.A., Pomilio, A.B., Canellas, C.O., Vitale, M.G., Putz, E.M., Ciprian- Ollivier, J. (2011). In vivo long-term kinetics of radiolabeled N, N-dimethyltryptamine and tryptamine. *Journal of Nuclear Medicine*, **52**, 970–977.

Walker, C.L., Liu, N.K. ve Xu, X.M. (2013). PTEN/PI3K and MAPK signaling in protection and pathology following CNS injuries. *Frontiers of Biology*, **8**, 421-433.

Wallach, J.V. (2009). Endogenous hallucinogens as ligands of the trace amine receptors: a possible role in sensory perception. *Medical Hypotheses*, **72**, 91–94.

Walters, J.K., Sheard, M.H. ve Davis, M. (1978). Effects of N,N-dimethyltryptamine(DMT) and 5- methoxy-N,N-dimethyltryptamine (5-MeODMT) on shockelicited fighting in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **9**, 87–90.

Wang, J., Shanmugam, A., Markand, S., Zorilla, E., Ganapathy, V. ve Smith, S.B. (2015). Sigma 1 receptor regulates the oxidative stress response in primary retinal Muller glial cells via NRF2 signaling and system xc (-), the Na(+)-independent glutamate-cystine exchanger. *Free Radical Biology & Medicine*, **86**, 25–36.

Warren, J.M., Dham-Nayyar, P. ve Alexander, J. (2013). Recreational use of naturally occurring dimethyltryptamine-contributing to psychosis? *Australian and New Zealand Journal of Psychiatry*, **47**, 398-399.

Wieloch, T. ve Nikolich, K. (2006). Mechanisms of neural plasticity following brain injury. *Current Opinions in Neurobiology*, **16**, 258-264.

Whipple, M.R., Reinecke, M.G. ve Gage, F.H. (1983). Inhibition of synaptosomal neurotransmitter uptake by hallucinogens. *Journal of Neurochemistry*, **40**, 1185–1188.

Wyatt, R.J., Saavedra, J.M. ve Axelrod, J. (1973). A dimethyltryptamine forming enzyme in human blood. *American Journal of Psychiatry*, **130**, 754–760.

Xiao, Z., Huang, C., Wu, J., Sun, L., Hao, W., Leung, L.K. ve ark. (2013). The neuroprotective effects of ipriflavone against H₂O₂ and amyloid beta induced toxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *European Journal Pharmacology*, **721**, 286-293.

Xu, Q., Ji, X.F., Chi, T.Y., Liu, P., Jin, G., Gu, S.L. ve ark. (2015). Sigma 1 receptor activation regulates brain-derived neurotrophic factor through NR2A-CaMKIV-TORC1

pathway to rescue the impairment of learning and memory induced by brain ischaemia/reperfusion. *Psychopharmacology*, **232**, 1779-1791.

Yamac, A.H., Kucukbuzcu, S., Ozansoy, M., Gok, O., Oz, K., Erturk, M. ve ark. (2016). Altered expression of micro-RNA 199a and increased levels of cardiac SIRT1 protein are associated with the occurrence of atrial fibrillation after coronary artery bypass graft surgery. *Cardiovascular Pathology*, **25**, 232-236.

Yanai, K., Ido, T., Ishiwata, K., Hatazawa, J., Takahashi, T., Iwata, R. ve ark. (1986) In vivo kinetics and displacement study of a carbon-11-labeled hallucinogen, N, N-[11C]dimethyltryptamine. *European Journal of Nuclear Medicine*, **12**, 141–146.

Yang, S., Bhardwaj, A., Cheng, J., Alkayed, N.J., Hurn, P.D. ve Kirsch, J.R. (2007). Sigma receptor agonists provide neuroprotection in vitro by preserving bcl-2. *Anesthesia and Analgesia*, **104**, 1179-1184.

Yang, Z.J., Carter, E.L., Torbey, M.T., Martin, L.J., Koehler, R.C. (2010). Sigma receptor ligand 4-phenyl-1-(4-phenylbutyl)-piperidine modulates neuronal nitric oxide synthase/postsynaptic density-95 coupling mechanisms and protects against neonatal ischemic degeneration of striatal neurons. *Experimental Neurology*, **221**, 166e174.

Yasui, Y. ve Su, T.P. (2016). Potential Molecular Mechanisms on the Role of the Sigma-1 Receptor in the Action of Cocaine and Methamphetamine. *Journal of Drug and Alcohol Research*, **5**, 235970.

Zhang, X.J., Liu, L.L., Jiang, S.X., Zhong, Y.M., Yang, X.L. (2011). Activation of the sigma receptor-1 suppresses NMDA responses in rat retinal ganglion cells. *Neuroscience*, **177**, 12-22.

Zhang, Y., Shi, Y., Qiao, L., Sun, Y., Ding, W., Zhang, H. ve ark. (2012). Sigma-1 receptor agonists provide neuroprotection against gp120 via a change in bcl-2 expression in mouse neuronal cultures. *Brain Research*, **1431**, 13–22.





T.C.

**İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ,
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (İMÜ-HADYEK)
ETİK KURULU KARARI**

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
20/04/2016	39		Prof. Dr. Nuran Darıyerli

“N,N-Dimetiltriptaminin Merkezi Sinir Sisteminde Aksonal ve Dendritik Yapıların Oluşumu ve Nöronal Canlılık Üzerine Etkilerinin İn Vitro Araştırılması” başlıklı bilimsel araştırma Etik Kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “oybirliği” ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 2 yıl

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Üye	Prof. Dr. Ülkan KILIÇ	
Üye	Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK	
Üye	Yrd. Doç. Dr. H. Emir YÜZBAŞIOĞLU	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Sine Özmen TOĞAY	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Mehmet Yalçın GÜNAL	
Üye	Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Özge Şeyda DURGUT	
Üye	Fahriye ŞENBAHÇE	

N N DİMETİLTRİPTAMİNİN MERKEZİ SİNİR SİSTEMİNDE AKSONAL VE DENDRİTİK YAPILARIN OLUŞUMU VE NÖRONAL CANLILIK ÜZERİNE ETKİLERİNİN İN VİTRO ARAŞTIRILMASI

ORIJİNALLIK RAPORU

% **1**

BENZERLİK ENDEKSİ

% **1**

İNTERNET
KAYNAKLARI

% **1**

YAYINLAR

% **0**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

GENÇ, Abdullah, KALELİOĞLU, Tevfik and KARAMUSTAFALIOĞLU, Nesrin. "İkiuçlu bozukluk manik dönemde periferik biyobelirteçler", Psikofarmakoloji Derneği, 2017.

Yayın

<% **1**

2

www.cappsy.org
İnternet Kaynağı

<% **1**

3

big5.39kf.com
İnternet Kaynağı

<% **1**

4

ajpcell.physiology.org
İnternet Kaynağı

<% **1**

5

biotek.ankara.edu.tr
İnternet Kaynağı

<% **1**

6

Submitted to Hong Kong Baptist University
Öğrenci Ödevi

<% **1**

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Muzaffer Beyza	Soyadı	Çetin Ozansoy
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	16.05.1984
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	28510017936
Email	muzafferbeyzacetin@gmail.com	Tel	0554-4876927

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul Tıp Fak., Fizyoloji A.D.	2010
Lisans	İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü	2007
Lise	İstanbul Haydarpaşa Anadolu Lisesi	2002

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Öğretim Görevlisi	T.C. İstanbul Medipol Üniversitesi	2012-2018
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	İyi	Çok iyi	83,75	-
Fransızca	Zayıf	Zayıf	Zayıf	-	-

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	Çok iyi
SPSS	Çok iyi
Graphpad	Çok iyi

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler (SCI & SSCI & Arts and Humanities)

1. Engin KN, Erdem-Kuruca S, Akgün Dar K, **Cetin B**, Karadenizli S, Gürel E, Yemisci B, Bilgiç S, Arslan M. The Evaluation Of Human Tenon'S Fibroblasts And Endothelial Cell Responses To Antifibrotics Alone And In Combination With A-Tocopherol. *Current Eye Research*. 2015; 40(1):19-29.

2. Çakmakçı E, Güngör A, Kayaman-Apohan N, Kuruca SE, **Çetin MB**, Dar KA. Cell growth on in situ photo-crosslinked electrospun acrylated cellulose acetate butyrate. *Journal of Biomaterials Science*, 2012; 23:887-899.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler

1. Karadenizli, S, Uzum, G, Kuruca, SE, Akgun-Dar, K, **Cetin, MB**, Kapucu, A. 17-betaestradiol increases ethanol induced disruption of blood-brain barrier; responsibility of inducible nitric oxide synthase. *FEBS Journal*. 22nd International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) Congress/37th Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Congress, Seville, SPAIN.

2. **Çetin MB**, Kuruca SE, Akgün-Dar K, Gürel E, Karadenizli S, Öztürk G. Apoptotic Effects of Corticosteroids on CD34+ Hematopoietic Stem Cells and Modulation of This Effect with Several Cytokines. *Acta Physiologica*. 37th National Physiology Congress of Turkish Society of Physiological Sciences (TFBD) and 8th Congress of The Federation of European Physiological Societies (FEPS), 2011, İstanbul, Turkey.

3. Karadenizli S, Üzüm G, Kuruca SE, Akgün-Dar K, **Çetin MB**, Kapucu A. The effect of estrogen on ethanol induced blood brain barrier disruption in an in vitro model. *Acta Physiologica*. 37th National Physiology Congress of Turkish Society of Physiological Sciences (TFBD) and 8th Congress of The Federation of European Physiological Societies (FEPS), 2011, İstanbul, Turkey.

4. **Çetin B**, Erdem-Kuruca S, Akgün-Dar K, Karadenizli S, Gurel E, Ozturk G, Yilmaz A, Deniz G, Yanasik M. Apoptotic effects of corticosteroids on pure CD34+ hematopoietic stem cells and modulation of this effect with cytokines. *Blood*. American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting, 2010, Orlando, Florida.

5. Çakmakçı E, Kayaman-Apohan N, Erdem-Kuruca S, **Çetin MB**, Karadenizli S, Akgün-Dar K, Güngör A. In vitro culture of endothelial and fibroblast cells on photocrosslinked electrospun acrylated cellulose acetate butyrate. Abstract book. 6th International Congress of Pathophysiology, 2010, Montreal, Canada.

6. Erdem-Kuruca S, Engin KN, Akgün-Dar K, Karadenizli S, **Çetin MB**, Serbes U, Özcan-Arican G, Yemisci B. Apoptotic effects of alpha-tocopherol combine antifibrotic agents in primary human tenon's fibroblasts. Abstract book. 6th International Congress of Pathophysiology, 2010, Montreal, Canada.

7. Engin KN, Yemişci B, Erdem-Kuruca S, Serbes U, Özcan-Arican G, Akgün-Dar K, Gürel E, Kocabora MS, **Çetin B**, Karadenizli S. In vitro evaluation of apoptic effects of

single and combined use of alpha tocopherol and current antifibrotics, in human tenon's fibroblast and endothelium cells. Abstract Book. World Ophthalmology Congress, 5-9 June 2010, Berlin-Germany.

8. Erdem-Kuruca S, Akdemir ZS, Kayaman-Apohan N, Kahraman MV, Akgun-Dar K, Güngör A, **Çetin B**, Karadenizli S. Fumarated Poly Ether-Ester Hydrogels That Support Osteoblast Viability, Attachment And Proliferation. The Journal of Physiological Sciences, 36th International Congress of Physiological Sciences (IUPS), 2009, Kyoto, Japan.

9. Erdem-Kuruca S, Ozcan Arıcan G, Karadenizli S, Serbest U, **Cetin MB**, Akgun-Dar K. Comparative evaluation of the effects of alpha-tocopheryl in use of antiproliferative agents on ECV304 endothelial cells. The Journal of Physiological Sciences. 36th International Congress of Physiological Sciences (IUPS), 2009, Kyoto, Japan.

10. Engin KN, Erdem-Kuruca S, Özcan-Arıcan G, **Çetin B**, Arıcan E, Serbes U, Akgün-Dar K, Karadenizli S, Kapucu A. Evaluation of apoptotic effects of single and combined use of current antifibrotic agents on human endothelial cells. ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology), 2009, Orlando, ABD.

11. Erdem-Kuruca S, Karalı N, **Çetin B**, Karadenizli S. The antileukemic potential of new derivatives of 5-fluoro-1Hindole- 2,3-dione-3-thiosemicarbazone on in vitro cell lines. Blood, American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting, 2008, San Francisco, California.

Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

1. Aksu-Uzunhan T, Karakaş Z, Erdem-Kuruca S, **Çetin B**, Karadenizli S, Akdeniz N, Atasever B, Deniz G. Akut lenfoblastik lösemili çocuklarda kemoterapinin doğal öldürücü (NK) hücreler üzerine etkileri. Çocuk Dergisi, 2011; 11(4):160-169.

2. Engin KN, Erdem-Kuruca S, Özcan-Arıcan G, **Çetin B**, Arıcan E, Serbes U, Akgün-Dar K, Karadenizli S, Kapucu A. α -tokoferol ve güncel antifibrotik ajanların tek ve kombine kullanımında insan endotel hücreleri üzerine apoptotik etkilerinin in vitro incelenmesi. Glokom-Katarakt Dergisi, 2009; 4(2):93-99.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

1. **Ozansoy MB**, Ozansoy M, Dariyerli N. Sigma-1 Reseptörünün Primer Hipokampal Nöronlarda Aksonal ve Dendritik Yapıların Oluşumundaki Rolü. 16. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 2018, İstanbul, Türkiye.

2. Ozansoy M, **Çetin-Ozansoy MB**, Şahin F, Kılıç Ü. In vitro Amiloid-Beta Toksikite Modelinde Melatoninin Eksozom Serbestlenmesi ve İçeriğine Etkisi. 42. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 2016, Düzce, Türkiye.

3. Ozansoy M, **Çetin-Ozansoy MB**, Şahin F, Kılıç Ü. The Effect of Melatonin on the Exosome Release and Content in in vitro Amyloid-beta Toxicity Model. Acta Physiologica. 42nd National Physiology Congress of Turkish Society of Physiological Sciences (TFBD) 2016, Düzce, Turkey.
4. Günal MY, Ozansoy M, Yuluğ B, Kılıç Ü, Gök Ö, Keskin İ, **Çetin-Ozansoy MB**, Şakul AA, Kılıç E. Deneysel Travmatik Beyin Hasarında Klopidoğrel Uygulamasının Nöroprotektif Etkisi. 42. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 2016, Düzce, Türkiye.
5. Günal MY, Ozansoy M, Yuluğ B, Kılıç Ü, Gök Ö, Keskin İ, **Çetin-Ozansoy MB**, Şakul AA, Kılıç E. Clopidogrel Exerts Neuroprotective Effect in Experimental Traumatic Brain Injury. Acta Physiologica. 42nd National Physiology Congress of Turkish Society of Physiological Sciences (TFBD) 2016, Düzce, Turkey.
6. Günal MY, Ayla Ş, Ozansoy M, Bedri N, Aslan İ, Ersavaş C, **Çetin-Ozansoy MB**, Yeşilada E, Kılıç E. Eksizyonel Yara Modelinde, Farklı Konsantrasyonlardaki Resveratrol'ün Yara İyileşmesi Üzerindeki Etkileri. 42. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 2016, Düzce, Türkiye.
7. Günal MY, Ayla Ş, Ozansoy M, Bedri N, Aslan İ, Ersavaş C, **Çetin-Ozansoy MB**, Yeşilada E, Kılıç E. The Healing Effect of Resveratrol on Excisional Wound. Acta Physiologica. 42nd National Physiology Congress of Turkish Society of Physiological Sciences (TFBD) 2016, Düzce, Turkey.
8. **Çetin MB**, Kuruca SE, Akgün-Dar K, Gürel E, Karadenizli S, Öztürk G. Apoptotic Effects of Corticosteroids on CD34+ Hematopoietic Stem Cells and Modulation of This Effect with Several Cytokines. Acta Physiologica. 37th National Physiology Congress of Turkish Society of Physiological Sciences (TFBD) and 8th Congress of The Federation of European Physiological Societies (FEPS), 2011, İstanbul, Turkey.
9. Karadenizli S, Üzüm G, Kuruca SE, Akgün-Dar K, **Çetin MB**, Kapucu A. The effect of estrogen on ethanol induced blood brain barrier disruption in an in vitro model. Acta Physiologica. 37th National Physiology Congress of Turkish Society of Physiological Sciences (TFBD) and 8th Congress of The Federation of European Physiological Societies (FEPS), 2011, İstanbul, Turkey.
10. Engin KN, Yemişçi B, Özcan-Arıcan G, Akgün-Dar K, Serbes U, Karadenizli S, Taşkapılı M, **Çetin B**, Gürel E, Bilgiç S, Arıcan E, Erdem-Kuruca S. Tek ve kombine antifibrotik kullanımlarında insan tenon fibroblast ve endotel hücre yanıtlarının kapsamlı in vitro değerlendirilmesi. TOD 45. Ulusal Kongresi, 2011, Girne, KKTC.
11. **Çetin MB**, Karadenizli S, Serbes U, Akgün-Dar K, Arıcan GÖ, Engin KN, Kuruca SE. α -tokoferol ve antifibrotik ajanların tek ve kombine kullanımının insan endotel hücreleri üzerindeki apoptotik ve antiproliferatif etkileri. 3. Uluslararası Hücre Membranları ve Oksidatif Stres Kongresi: Kalsiyum Sinyali ve TRP Kanalları, 2010, Isparta, Türkiye.

12. **Çetin MB**, Karadenizli S, Erdem-Kuruca S, Karalı N, Güzel Ö, Akgün-Dar K, Gürel E. 5-Triflorometoksi-1H-indol-2,3-Dion 3-Tiyosemikarbazon Türevlerinin Miyeloid, Lenfoid Lösemi Hücreleri ve Akut Lenfoblastik Lösemi Hastalarının Periferik Kan Mononükleer Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkileri. III. Multidisipliner Kanser Araştırma Sempozyumu, 2010, Uludağ, Bursa, Türkiye.

13. Karadenizli S, **Çetin MB**, Aksu-Uzunhan T, Okumuş-Akdeniz N, Karakaş Z, Erdem-Kuruca S. Akut Lenfoblastik Lösemili Çocuklarda Doğal Öldürücü Hücre Aktivitelerinin Remisyon Süresince Restorasyonu. III. Multidisipliner Kanser Araştırma Sempozyumu, 2010, Uludağ, Bursa, Türkiye.

14. Engin KN, Yemisci B, Erdem-Kuruca S, Akgun-Dar K, Karadenizli S, **Çetin B**, Gürel E, Serbes U, Özcan-Arıcan G. Güncel antifibrotik ajanlar ve alfa-tokoferolün tek ve kombine kullanımlarının insan Tenon fibroblast ve endotel hücreleri üzerine etki paternleri: in vitro değerlendirme. XXXXIV. TOD Ulusal Kongresi, 2010, Antalya, Türkiye.

15. Engin KN, Erdem-Kuruca S, Özcan-Arıcan G, **Çetin B**, Arıcan E, Serbes U, Akgün-Dar K, Karadenizli S, Kapucu A. α -tokoferol ve güncel antifibrotik ajanların tek ve kombine kullanımında insan endotel hücreleri üzerine apoptotik etkilerinin in vitro incelenmesi. XXXXII. Türk Oftalmoloji Derneği Ulusal Kongresi, 2008, Antalya, Türkiye.

16. Erdem-Kuruca S, Karalı N, Karadenizli S, **Çetin B**. 5-Triflurometoksi-1H-indol-2,3-dion 3-tiyosemikarbazon türevlerinin miyeloid ve lenfoid lösemi hücreleri üzerine in vitro sitotoksik etkileri. 34. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 2008, Erzurum, Türkiye.

Ödüller

“Tek ve kombine antifibrotik kullanımlarında insan tenon fibroblast ve endotel hücre yanıtlarının kapsamlı in vitro değerlendirmesi.” adlı çalışma ile “En iyi poster birincilik ödülü” Türkiye Oftalmoloji Derneği (TOD) 45. Ulusal Kongresi, 2011, Girne, KKTC.