



T.C.

ALANYA ALAADDİN KEYKUBAT ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

**GT1-7 HÜCRE HATTINDA MUSKARİNİK RESEPTÖRLERİN
UYARIMI VE BLOKAJININ GnRH İLE NÖRONAL FAKTÖRLERİN
EKSPRESYONUNA ETKİSİ**

**Yüksek Lisans Tezi
Hilal DOLAS ÜREN**

**Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Erkan MAYTALMAN**

**ALANYA
2022**

HİLAL DOLAS ÜREN

GT1-7 HÜCRE HATTINDA MUSKARİNİK RESEPTÖRLERİN UYARIMI VE
BLOKAJININ GnRH İLE NÖRONAL FAKTÖRLERİN EKSPRESYONUNA ETKİSİ

ALKÜ 2022

T.C.
ALANYA ALAADDİN KEYKUBAT ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**GT1-7 HÜCRE HATTINDA MUSKARİNİK RESEPTÖRLERİN UYARIMI VE
BLOKAJININ GnRH İLE NÖRONAL FAKTÖRLERİN EKSPRESYONUNA
ETKİSİ**

Yüksek Lisans Tezi

Hilal DOLAS ÜREN

Anabilim Dalı: Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Program Adı: Moleküler Tıp

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Erkan MAYTALMAN

Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 2021-04-02-LTP02 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

ALANYA

2022

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilemeyen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmamın Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programıyla tarandığını ve “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Hilal DOLAS ÜREN

TEŞEKKÜR SAYFASI

Yüksek lisans eğitimim boyunca yardımseverliği, bilimsel birikimi, sabrı, samimiyeti, farmakoloji bilgimi ve sevgimi arttırması ve manevi destekleri için değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Erkan MAYTALMAN'a ve güler yüzünü hiç eksik etmeyen, samimiyetini esirgemeyen, ne zaman yardım istesem el uzatan değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Dilara NEMUTLU SAMUR'a

Destekleri ve enerjileriyle her zaman yanımda olan, uzakları yakın eden, bunaldığımda, sıkıldığımda yüzümü güldüren, yanımda olmasalar da her zaman yanımda olduklarını hissettiren, beni hep destekleyen arkadaşlarım Büşra DUYGU, Ezgi KAN, Asude UĞUR, Merve ÇARDAK, Dilan BARUT, Floriya YULDAŞEVA, Fatma Nur CIBİR'a ve ne olursa olsun bana hep el uzatan, ablalık, arkadaşlık, dostluk ve sırdaşlık yapan Ece DUMAN'a

Verdiğim tüm kararların arkasında duran, hep yapabileceğime inanan, güvenen, beni ben yapan ve beni hep destekleyen annem ve babam Aysel-Hüseyin DOLAS ve kardeşim Sıla DOLAS'a

Sabrı, sevgisi ve desteği hiç bitmeyen, ne zaman düşsem kaldıran, hep yanımda duran, yaptığım her şeye saygı duyan, fedakarlık yapmaktan hiç vazgeçmeyen değerli eşim Ali ÜREN'e

TEŞEKKÜR EDERİM.

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK SAYFASI

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	i
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	i
TEŞEKKÜR SAYFASI	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER LİSTESİ	v
TABLolar LİSTESİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT.....	xi
GİRİŞ	1
1. LİTERATÜR.....	2
1.1. Gonadotropin Salgılayan Hormon (GnRH)	2
1.2. GnRH Üreten Hücre Modeli GT1-7.....	3
1.3. Nöronal Faktörler	4
1.3.1. NGF.....	4
1.3.2. β -Tubulin III.....	5
1.3.3. Nestin	6
1.3.4. GDNF	6
1.4. Kolinerjik Sistem.....	7
1.4.1. Kolinerjik Sistem Agonistleri	7
1.4.1.1. Asetilkolin.....	7
1.4.1.2. Diğerleri.....	8
2.4.1.2.1.BetaneKol	8
2.4.1.2.2.Pilokarpin	9
2.4.1.2.3.Karbokol.....	9
2.4.1.2.4.Muskarin	9
2.4.1.2.5.Nikotin	10
2.4.1.3.Asetilkolin Esterazlar	10
2.4.1.3.1.Fizostigmin	10
2.4.1.3.2.Neostigmin	10
2.4.1.3.3.Edrofonyum Klorür.....	11
2.4.1.3.4.Rivastigmin	11

1.4.2. Kolinerjik Sistem Antagonistleri (Antikolinerjikler)	11
2.4.2.1. Atropin	11
2.4.2.2. Diğerleri	12
2.4.2.2.1. Skopolamin	12
2.4.2.2.2. Hyosin - N – Butil Bromür	12
2.4.2.2.3. Pirenzepin.....	12
1.4.3. Kolinerjik Sistem Reseptörleri.....	13
2.4.3.1. Muskarinik reseptörler	13
2.4.3.2. Nikotinik reseptörler	16
2. YÖNTEM.....	18
2.1. Hücre Kültürü.....	18
2.1.1. Asetilkolin ve atropin stok çözeltilerinin hazırlanması	18
2.1.2. MTT testi.....	19
2.1.3. RT-qPCR için hücre kültürü	19
2.2. RNA Ekstraksiyonu.....	20
2.3. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	21
2.4. RT-qPCR Analizleri.....	21
2.5. İstatistik Analiz	22
3. BULGULAR	24
3.1. MTT Bulguları	24
3.2. ACh ve Atropin Etkisinde GT1-7 Hücrelerinde GnRH ve Nöronal Belirteçlerin Rölatif mRNA Ekspresyonları	29
3.2.1. Rölatif GnRH mRNA ekspresyonları	29
3.2.2. Rölatif NGF mRNA ekspresyonları.....	30
3.2.3. Rölatif β -Tubulin III mRNA ekspresyonları.....	32
3.2.4. Rölatif Nestin mRNA ekspresyonları	33
3.2.5. Rölatif GDNF mRNA ekspresyonları.....	35
4. TARTIŞMA SONUÇ VE ÖNERİLER.....	37
5. KAYNAKLAR.....	44
ÖZGEÇMİŞ	55

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	Nöronal asetil kolin üretimi, salınımı ve yıkım mekanizması	8
Şekil 2.	Muskarinik (M1) asetilkolin reseptörünün moleküler yapısı. Muskarinik reseptörler yedi transmembran (TM) hidrofobik segmentlere sahiptir. Dolgulu daireler olarak gösterilen asetilkoline bağlanma için çok önemli olan kalıntılar, TM bölgelerinde bulunur. G proteininin aktivasyonundan sorumlu kalıntılar, ikinci (i2) ve üçüncü (i3) hücre içi halkalarda bulunur. G protein reseptör kinazlar (GRK'lar) tarafından fosforile edilen kalıntılar, i3 döngüsünde bulunur.	14
Şekil 3.	nAChR alt birimlerinin varsayılan transmembran topolojisini gösteren Sol Diyagram. Heteropentamerik ve homopentamerik nöronal alt tiplerin yapısı.	16
Şekil 4.	ACh'nin artan konsantrasyonlarında GT1-7 hücreleri üzerine proliferatif/sitotoksik etkileri. Oldukça yüksek konsantrasyonlarda dahil olmak üzere istatistiksel anlamlı bir fark saptanmamıştır	24
Şekil 5.	ACh'nin artan konsantrasyonlarda GT1-7 hücrelerine etkisinin mikroskopik görünümleri. A: Kontrol. B: 10^{-3} M. C: 5×10^{-2} M	24
Şekil 6.	ACh'nin etkisini saptamak amacıyla yapılan MTT analizinde kullanılan 96 kuyulu plakta tüm gruplara ait kuyucuklarda çözünmüş formazan kristalleri. Görsel olarak kör olarak kullanılan 1. sıra (dikey soldan) dışında diğer tüm kuyularda formazan kristallerinin çözündüğü görülmektedir.	25
Şekil 7.	Atropinin artan konsantrasyonlarında GT1-7 hücreleri üzerine proliferatif/sitotoksik etkileri. Atropinin 10^{-3} M konsantrasyonundan itibaren proliferasyonun şiddetli bir şekilde azaldığı saptandı.	25
Şekil 8.	Atropinin etkisini saptamak amacıyla yapılan MTT analizinde kullanılan 96 kuyulu plakta tüm gruplara ait kuyucuklarda çözünmüş formazan kristalleri. Plakta $2,5 \times 10^{-3}$ M konsantrasyon grubunun bulunduğu 8. sıradan (dikey soldan) itibaren proliferasyonun aniden kesildiği sitotoksik etkinin olduğu görülmektedir	27
Şekil 9.	Atropinin artan konsantrasyonlarda GT1-7 hücrelerine etkisinin mikroskopik görünümleri. A: Kontrol. B: 10^{-4} M. C: $1,25 \times 10^{-3}$ M. D: $2,5 \times 10^{-3}$ M. E: 5×10^{-3} M	27
Şekil 10.	Rölatif GnRH mRNA ekspresyon grafiği. ACh gruplarında iki kattan fazla ekspresyon artışı.	28

Şekil 11.	Rölatif NGF mRNA ekspresyon grafiği. ACh 10 ve 100 μ M konsantrasyonlarında ekspresyon artışı.	30
Şekil 12.	Rölatif β -Tubulin III ekspresyon grafiği. ACh 1 ve 10 μ M , ACh+ATR (1 μ M), ACh+ATR (1 μ M) gruplarında ekspresyon artışı.	31
Şekil 13.	Rölatif nestin ekspresyon grafiği. Kontrole göre anlamlı fark saptanmadı.	33
Şekil 14.	Rölatif GDNF ekspresyon grafiği. ACh 10 ve 100 μ M konsantrasyonlarında ekspresyon artışı.	34



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1.	RT-qPCR analizleri için oluşturulan gruplar	19
Tablo 2.	Kullanılan mix primerler ve gen tanımlama kodları	21
Tablo 3.	Primer Mikslerinin Hazırlamak için Gereken Solüsyon ve Reaktif Miktarları	21
Tablo 4.	RT-qPCR Amplifikasyon Döngüsü	21
Tablo 5.	ACh'nin artan konsantrasyon gruplarında GT1-7 hücreleri üzerine % proliferasyon ortalama ve SEM değerleri.	24
Tablo 6.	MTT sonuçlarına göre kontrol ve atropinin artan konsantrasyon grupları arasında GT1-7 hücrelerine etkilerin karşılaştırılması. One Way ANOVA post hoc bonferroni. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0,0001	26
Tablo 7.	Atropinin artan konsantrasyon gruplarında GT1-7 hücreleri üzerine % proliferasyon ortalama ve SEM değerleri.	26
Tablo 8.	GnRH mRNA ekspresyonunda gruplar arası istatistiksel anlamlılık farkları. Kruskal Wallis; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. #ACh 1 ve 10 µM gruplarında iki kat üzerinde meydana gelen artışlar da fizyolojik yönden anlamlı kabul edilmiştir.	29
Tablo 9.	GnRH mRNA ekspresyonunda gruplar arasında ortalama katsayı değişimi (fold change) ve SEM değerleri. ACh 1 ve 10 µM gruplarında da fizyolojik yönden anlamlı artışlar mevcuttur.	29
Tablo 10.	NGF mRNA ekspresyon gruplar arası istatistiksel anlamlılık farkları. Kruskal Wallis; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001	30
Tablo 11.	NGF mRNA ekspresyonunda gruplar arasında ortalama katsayı değişimi (fold change) ve SEM değerleri.	30
Tablo 12.	β-Tubulin III mRNA ekspresyon gruplar arası istatistiksel anlamlılık farkları. Kruskal Wallis; *p<0.05, **p<0.01	32
Tablo 13.	β-Tubulin III mRNA ekspresyonunda gruplar arasında ortalama katsayı değişimi (fold change) ve SEM değerleri.	32
Tablo 14.	Nestin mRNA ekspresyon gruplar arası istatistiksel anlamlılık farkları. Kruskal Wallis; *p<0.05, **p<0.01	33
Tablo 15.	Nestin mRNA ekspresyonunda gruplar arasında ortalama katsayı değişimi (fold change) ve SEM değerleri	33
Tablo 16.	GDNF mRNA ekspresyon gruplar arası istatistiksel anlamlılık farkları. Kruskal Wallis; *p<0.05, **p<0.01	34
Tablo 17.	GDNF mRNA ekspresyonunda gruplar arasında ortalama katsayı değişimi (fold change) ve SEM değerleri	35

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACh	: Asetilkolin
AChR	: Asetilkolin reseptörü
ATR	: Atropin
CT	: Threshold cycle
cDNA	: Komplementer DNA
DMEM	: Minimal Essential Medium
dNTP	: Nükleozit trifosfat
DMSO	: Dimetil sülfoksit
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
GDNF	: Glial hücre dizisinden türetilen nörotrofik faktör
GnRH	: Gonadotropin salgılayan hormon
GnRHR	: G proteinine bağlı reseptörler ailesi
mAChR	: Muskarinik asetilkolin reseptör
mRNA	: Mesajcı RNA
MTT	: Metil Tiazol Tetrazolium
nAChR	: Nikotinik asetilkolin reseptör
NGF	: Sinir büyüme faktörü
PBS	: Fosfat tuz tamponu
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RT-qPCR	: Kantitatif revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asit

ÖZET

GT1-7 Hücre Hattında Muskarinik Reseptörlerin Uyarımı ve Blokajının

GnRH ile Nöronal Faktörlerin Ekspresyonuna Etkisi

Hilal DOLAS ÜREN

Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Haziran,2022

Gonadotropin salgilatıcı hormon, hipotalamusta GnRH nöronlarından sentezlenen ve salınan tropik bir peptit olup ön hipofizden folikül uyarıcı hormon ve lüteinizan hormonun salınmasından sorumlu olan bir hormondur. GnRH salınımından sorumlu hücrelerin kolinerjik reseptörleri ifade ettiğini gösteren çok az sayıda çalışma vardır. Reseptörlerin uyarılması veya bloke edilmesi sonucu nöronal faktörlerin mRNA ekspresyonlarının seviyeleri ile GnRH salınımının nasıl etkilendiği üzerine çalışmalar yetersizdir. Ayrıca literatürde kolinerjik reseptör aktivatörü asetilkolin ve kolinerjik reseptör blokörü atropin etkisindeki hücrelere MTT testi ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada GT1-7 hücre hattından elde edilen hücrelerde, kolinerjik reseptör aktivatörü asetilkolin ve kolinerjik reseptör blokörü atropin etkisindeki farklılaşmada oluşan ekspresyon değişikliklerini saptamak için gruplar oluşturularak çalışmalar yapıldı. Çalışmanın başında öncelikle aktivatör ve blokör dozlarının belirlenmesi ve proliferasyon etkisinin ölçülmesi amacıyla 2.pasaj sonunda elde edilen hücrelerle MTT testi analizi yapıldı. Daha sonra hücrelerden RNA ekstraksiyonu ve cDNA sentezi yapıldı. Atropin ve asetilkolin etkisindeki hücrelere, NGF, Nestin, B-3 tübilin, GDNF B-Actin nöronal faktör primerleri eklenerek mRNA ekspresyonları RT-qPCR ile gösterildi.

ACh'nin artan konsantrasyonlarda nöronal faktörlerin mRNA ekspresyonlarının artışı ve bununla beraber GnRH artışına neden olduğu göstermektedir. Elde ettiğimiz sonuçlar GnRH salınımının özellikle kolinerjik reseptörlerin uyarımıyla artış yaptığını fakat bununla beraber bu artışın nöronal faktörlerin artışına da bağlı olduğu göstermektedir. Nöronal faktörlerin ekspresyonlarında da kolinerjik reseptörlerin uyarılmasının etkisi mevcuttur. Aksine blokaj etkisi ne nöronal faktörler ne de GnRH salınımı üzerine belirgin bir etkiye sahip değildi. Bu durum kolinerjik reseptör uyarımı dışında başka faktörlerin de birlikte hareket ettiğini işaret etmektedir.

Anahtar Sözcükler: GnRH, GT1-7 hücre hattı, Kolinerjik sistem, Nöronal faktörler.

ABSTRACT

The Effect of Stimulation and Blockade of Muscarinic Receptors
on the Expression of GnRH and Neuronal Factors in GT1-7 Cell Line

Hilal DOLAS ÜREN

Department of Molecular Medicine

Graduate Education Institute of Alanya Alaaddin Keykubat University,

June, 2022

Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) is a tropic peptide synthesized and released from GnRH neurons in the hypothalamus and is responsible for the release of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone from the anterior pituitary. Very few studies show that cells responsible for GnRH release express cholinergic receptors. Studies on the levels of mRNA expression of neuronal factors and how GnRH release is affected by stimulation or blocking receptors are insufficient. In addition, there is no study on the effects of acetylcholine (ACh) and atropine (ATR) on these cells. Therefore, our study aimed to analyze the effects of stimulation and blockade of cholinergic receptors on neuronal factors and GnRH expression in GT1-7 cells.

In our study, the effects of ACh and ATR at increasing concentrations were analyzed with the MTT test. The cells were exposed to 1-10-100 μ M concentrations of ACh and ATR to determine the effects on neuronal factors and GnRH expressions. The changes in NGF, Nestin, β -tubulin III, and GDNF mRNA expressions in these cells were determined by RT-qPCR using RNA samples obtained from these cells.

GT1-7 cells continued their proliferation at high concentrations of ACh, such as 10^{-1} M. In ATR exposure, the proliferation of cells decreased after a concentration of 10^{-3} M. In general, increasing concentrations of ACh resulted in increased expression of neuronal factors and accompanying GnRH mRNA. ATR, on the other hand, showed no significant effects on neither neuronal factors nor GnRH mRNA expressions.

The increase with ACh indicates the activity of the cholinergic system in the GnRH release, but the mechanism of the increase in neuronal factors seems more complex. It seems likely that neuronal factors indirectly increase GnRH expression by receptor stimulation.

Keywords: GnRH, GT1-7 cell line, Cholinergic system, Neuronal factors

GİRİŞ

Eski tanımlamalarda GnRH 'Luteinize edici Hormon Salıcı Hormon (LHRH)' olarak bilinmekteydi fakat günümüzde her iki gonadotropinin (LH, FSH) salgılanması üzerindeki uyarıcı rolü olması nedeniyle "Gonadotropin Saliverici Hormon (GnRH) şeklinde yaygın olarak kullanılmaktadır [1]. GnRH, 1971'de tanımlanmıştır. Hipotalamusta GnRH nöronlarından sentezlenen ve salınan tropik bir peptit olup ön hipofizden folikül uyarıcı hormon ve lüteinizan hormonun salınmasından sorumlu olan bir hormondur [2, 3].

GnRH salgılayan ölümsüz nöronal hücre hattıdır GT1-7 hücre hattıdır ve olgun bir farenden elde edilmiştir. SV40 T antijen onkojeninin kodlama bölgesine GnRH geninin promotor bölgesini içeren bir transgenin bağlanması ve bu bağlanan transgenin farelere aktarılmasıyla üretilmiştir [4-6].

Kolinerjik sistemin nörotransmitteri olan asetilkolinin (ACh) dir [7], atropin ise merkezi sinir sistemindeki mAChR'lerin tüm alt tipleri için rekabetçi inhibitördür [8]. Nöronal faktörler, periferik ve merkezi sinir sistemindeki nöronların yenilenmesi gelişimi ve hayatta kalması için gerekli olan çok çeşitli polipeptitleri içeren büyüme faktörleridir [9].

Çalışmanın ana hedefini kolinerjik sistemin GnRH ekspresyonundaki rolünü tespit etmek oluşturdur. Ayrıca GT1-7 hücre hattından elde edilen hücreler, nöronal aktivite gösteren hücreler olması nedeniyle kolinerjik uyarımın ve blokajın NGF, BDNF, tubulin, nestin ve GDNF mRNA ekspresyonlarında nasıl değişiklikler oluşturduğunun tespit edilmesi amaçlandı. Ek olarak GnRH ile birlikte etkiler değerlendirildi.

1. LİTERATÜR

1.1. Gonadotropin Salgılayan Hormon (GnRH)

Hipotalamik gonadotropin salgılayan hormon (GnRH), 1971'de tanımlanmıştır. GnRH, domuz hipotalamusundan izole edilmiştir ve Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ olarak bir yapıya sahip olduğu gösterilmiştir. Gonadal fonksiyonları ve seks steroidlerinin üretimini düzenleyen hipofiz gonadotropinlerinin üretim ve salınımını düzenlenmesinde anahtar unsurdur [10, 11]. GnRH'nin, hipotalamik nöronlardan salınımı pulsatil şekildedir ve etki mekanizması ön hipofiz gonadotropinlerinin hücre yüzeyindeki reseptörlerine (GnRHR) yüksek afiniteyle bağlanmasıyla ortaya çıkar [12, 13]. Hipotalamusun arkuat nükleusundan 56 aminoasitlik GAP (GnRH ilişkili peptit) denilen bir hormon ile birlikte salgılanır ve kromozom 8p21'deki bir gen tarafından kodlanarak 92 aminoasitli öncüsünün proteolitik yıkımı sonrası üretilir ve salınımı sırasında ön hipofizden kan dolaşımına verilir. Bu iki hormon da LH ve FSH üzerine farklı derecelerde uyarıcı etki yapmaktadırlar. GnRH foliküler evrenin sonlarında fazla olarak, lüteal evrenin sonlarında ise daha az olarak salınır. Salınım sıklığının nasıl düzenlendiği tam olarak açıklanamamıştır fakat stres, mevsimsel değişiklikler ve beslenme şekliyle etkilendiği bilinmektedir [14]. Ek olarak GnRH salgılanması üzerinde insülin ve leptin uyarıcı, grelin hormonunun ise inhibe edici etkisi vardır [15].

GnRHR'ler, G proteinine bağlı reseptörler ailesi üyesidir. Reseptörlerin aktivasyonları ile diaçilgliserol ve inositol 1,4,5-trisfosfat oluşur, fosfoinositid parçalanır. Diaçilgliserol ve inositol 1,4,5-trisfosfat ikinci haberciler olarak adlandırılır ve bu ikinci haberciler hücre içi depolardan kalsiyum salınımı ve protein kinaz C aktivasyonunu başlatır. Bu ikinci habercilerin her ikisi de gonadotropinlerin salgılanması ve sentezinde önemli rol oynar. GnRH veya agonistleri tarafından GnRH reseptörlerinin uyarımı gonadotropin salgılanmasını sağlarken, uzun süreli aktivasyon duyarsızlaşmaya sebep olur ve bunun sonucunda salınım baskılanır. GnRHR antagonistleri de gonadotropin hücrelerinin membranlarındaki reseptörlere bağlanmak için GnRH ile yarışır fakat reseptörlerin aktivasyonunu bloke ederek gonadotropin salınımını inhibe ederler [12]. GnRH'nin gonadotropinlerin hücre membranındaki reseptörlere bağlanması ile hücre içi kalsiyum konsantrasyonlarında artış olur. Bu kalsiyum artışı, gonadotropin alt birim gen ifadesi ve gonadotropin salınımı için gereklidir [16].

GnRH, üreme düzenlemesinde önemli bir faktördür [17]. GnRH bir dipeptittir, yaklaşık 90 amino asit içerir [18, 19]. GnRH genini etkileyen mutasyonlar, bozulmuş gonadal fonksiyonlara sebep olur [18, 20]. Amino asit dizileri çıkarılıp incelendiğinde, GnRH'nin aminoasitin N-terminal ucunda bulunduğu görülmüştür. GnRH üreten nöronların karakteristik gelişimi, epizodik aktivitesi ve dağılımı çeşitli üreme hastalıklarının etiopatogenezine bir ilgi uyandırmıştır [10]. GnRH, GnRHR aktivasyonu ile hipofiz hücreleriyle etkileşir. GnRH-GnRHR kompleksinde oluşan herhangi bir bozukluk farklı kanser türlerinin gelişmesine yol açar [11].

İnsan üremesi, sağlıklı hipotalamik-hipofiz-gonadal (HPG) eksenine bağlıdır [10]. Normal üreme fonksiyonları, doğurganlık ve hormonal düzenlemenin HPG ekseninin tüm seviyelerinde hassas bir şekilde düzenlenmesi için GnRH gerekir [13]. GnRH, ön hipofizden lüteinizan hormon (LH) ve folikül uyarıcı hormon (FSH) salınımını uyarır ve bu uyarım sonucunda seks steroidlerinin sentezi uyarılır [21]. GnRH, FSH ve LH düzenlenmesi, normal memelilerin cinsel olgunlaşması ve üreme işlevleri için gereklidir [13]. LH ve FSH ovulasyon, folikülojenez, steroidogenez ve spermatogenez düzenlemek için yumurtalıklara ve testislere etki eder ve periferik dolaşıma katılır. GnRH, salınımı pulsatil şekildedir ve GnRH puls frekansları ve genliklerindeki varyasyonlar, FSH ve LH sentez ve salınım üzerindeki etkileri farklıdır. LH, tercihen yüksek GnRH darbe frekanslarında uyarılırken, FSH ise tercihen düşük GnRH darbe frekanslarında uyarılır [13]. Östrojen, progesteron ve testosteron dahil olmak üzere gonadal seks hormonları, GnRH, LH ve FSH'nin daha fazla salınımını engellemek için hipotalamusa ve ayrıca hipofiz bezine negatif geribildirim verir. Ayrıca gonadotropinler, LH ve FSH ayrıca hipofiz bezi üzerinde daha fazla üretimlerini engellemek için negatif geri bildirim sağlar [4].

1.2. GnRH Üreten Hücre Modeli GT1-7

GT1-7, olgun bir fareden elde edilmiş hipotalamik GnRH salgılayan ölümsüz nöronal hücre hattıdır. GnRH nöron modeli (GT1-7), SV40 T antijen onkojeninin kodlama bölgesine GnRH geninin promotor bölgesini içeren bir transgenin bağlanması ve bu bağlanan transgenin farelere aktarılmasıyla üretilmiştir [4-6]. GT-1 hücrelerinin bir alt klonu olan GT1-7 nöronal hücre hattı, GnRH salgılar, Ca²⁺, CF, K⁺ ve Na⁺ kanallarını ve sinaps içerir [22]. GT1-7 hücre hattı ayrıca L ve T tipi voltaja duyarlı kalsiyum kanalları içerir [23]. İn vitro kültürlenmiş sinir hücreleri, ilaçlar veya nörotoksinler gibi çeşitli uyaranlara verilen hücresel tepkileri incelemek için faydalı

modeller olarak hizmet eder [24]. GT1-7 nöronal hücre hattı ayrıca nöronal morfoloji için mükemmel bir model olarak hizmet eder ve GnRH nöronlarını in situ olarak güçlü bir şekilde sembolize eder [22]. GT1-7 hücre hattının, GnRH nöronlarının bilinen özelliklerinin çoğunu aslı gibi sergilediği gösterilmiştir [4]. Bugüne kadar, GT1 hücreleri, GnRH nöronlarının biyolojisini incelemek için en iyi hücre modeli olduğu ispatlanmıştır [4]. Son yıllarda GT1 hücrelerinde GnRH salınımını modifiye ettiği bilinen birkaç nörotransmitter ailesinin reseptörleri tanımlanmıştır ve karşılık gelen ligandların GnRH salınımı üzerindeki aktive edici veya inhibe edici olduğu belgelenmiştir [22, 25].

GT1-7 hücre hattı kullanılarak p53'ün hipotalamusta GnRH sekresyonunun merkezi bir aracısı olduğunu ve bu etkinin en azından kısmen Lin28/let-7 yolu aracılığıyla olduğu gösterilmiştir [26]. miR-375'in, nöroendokrin bozuklukla ilişkili işlev bozukluklarına yeni bir potansiyel terapötik yaklaşım sağlayabilecek GnRH üretimini düzenlemedeki kritik rolünü vurgulamak için GT1-7 hücre hattı kullanılmıştır [27]. İnsanlarda OTX2 mutasyonları ile ilişkili fenotipik spektrumu göstermek için OTX2 varyantlarının transaktivasyon yeteneği, murin hipotalamik GT1-7 nöronlarında analiz edilmiştir [28].

1.3. Nöronal Faktörler

Nöronal faktörler, periferik ve merkezi sinir sistemindeki nöronların yenilenmesi gelişimi ve hayatta kalması için gerekli olan çok çeşitli polipeptitleri içeren büyüme faktörleridir. Nöronal faktörler, sinyal yollarına, yapılarına ve reseptörlerine göre üç ailede sınıflandırılabilir: nöropoetik sitokinler, nörotrofin ailesi ve glial hücre kaynaklı (GDNF) ailesi. Nöronal faktörlerin en iyi tanımlanmış grupları, sinir büyüme faktörü (NGF), nörotrofin-4/5 (NT-4/5), nörotrofin-3 (NT-3) ve beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) dür [9, 29]. Huntington hastalığı [30], Parkinson [31] ve Alzheimer [32] gibi nörodejeneratif hastalıklarda nöral yenilenmenin iyileştirdiği gösterilmiştir. Son çalışmalar, nörolojik faktörler sinir sisteminin dışında dokuya spesifik yetişkin kök hücre nişinde de bulunabileceğini ve doku yenilenmesini desteklediğini göstermiştir. Bu çalışmalar, nörotrofik faktörlerin yetişkin doku yenilenmesinde potansiyel terapötik adaylar olarak hizmet edebileceğini göstermektedir.

1.3.1. NGF

NGF, 1950 yılında Rita Levi Montalcini tarafından keşfedilmiştir. NGF, duyuşal ve sempatik nöronların gelişimi boyunca bilinen hayatta kalma faktörüdür [9]. Duyuşal

nöronlar doğum sonrası dönemde hayatta kalma faktörü olarak NGF'ye bağımlı değil iken sempatik nöronların çoğu yetişkinlikte buna bağımlıdır [33]. NGF, nöron tarafından salgılanır ve akson terminalerinde bulunan reseptörlerine bağlanır. Daha sonra retrograd taşıma ile geriye taşınır. Nöronlar nöroplastisite, farklılaşmak ve yaşamak için kendi salgıladığı nörolojik faktörlere ihtiyaç duyarlar [34]. NGF ailesi: Nörotropik faktör-3 (Nörotropin faktör-3, NT-3), Nörotropik faktör-4 (Nörotropin faktör-4), ardından Nörotropik faktör-6 (Nörotropin faktör-6, NT-6) ve Nörotropik faktör-7 (Nörotropin faktör-7, NT-7) den oluşur. NGF 2.5 S saflaştırılmış formunun moleküler ağırlığı 26 kDa'dır. Bu form için iki peptit zinciri tanımlanmıştır. Zincir A, 118 amino asit kalıntısından oluşur. Zincir B, zincir A'ya çok benzer, ancak N terminalinde ilk sekiz amino asit kalıntısından yoksundur. Beta alt birimi, bilinen tüm biyolojik aktivitelerden sorumludur [35].

Nazal uygulama ile NGF, mayotik spermatogonia (Stra8) ve spermatositleri (SYCP3) eksprese eden belirteçleri önemli ölçüde up regüle edebilir, spermatogenezi düzeltebilir ve cinsel hormonların salgılanmasını artırır [36]. Retinitis Pigmentosa hastalığında NGF'nin rolü araştırılmıştır. NGF'nin reseptörüne bağlanmasının, fotoreseptörün hayatta kalması ve işlevselliği için spesifik bir biyolojik belirteç olan rodopsin ekspresyonunu modüle ettiği gözlemlenmiştir [37].

1.3.2. β -Tubulin III

β -Tubulin III veya β III-tubulin (β 3-tubulin) olarak da bilinen Sınıf III β -tubulin, testis hücrelerinde ve neredeyse sadece nöronlarda bulunan tubulin ailesinin bir mikrotübül elemanıdır [38-40]. İnsanlarda TUBB3 geni tarafından kodlanır [38, 41, 42]. Sınıf III β -tubulinin nöral gelişimdeki, multipotent progenitörlerden nöral hücre farklılaşmasının erken bir biyobelirteç olarak kullanılır [43]. TUBB3 geni inaktivasyonu, nöral progenitör proliferasyonunu bozar. Sınıf III β -tubulin ekspresyonu hem translasyonel hemde transkripsiyonel seviyelerde düzenlenir. Nöral dokuda, kurucu ifade Sox4 ve Sox11 tarafından yönlendirilir [44]. Nöral olmayan dokularda ise, düzenleme +168 nükleotidde 3' yan bölgedeki bir E-kutusu bölgesine bağlıdır [45].

β III -tubulin ekspresyonu ile 5-FU'ya direnç arasında, özellikle invazivlik açısından önemli bir korelasyon var gibi görüldüğünü gösterilmiştir. Yapılan çalışma, β III -tubulinin in vivo 5-FU direncine olası bir katkısını göstermektedir [46]. β -III tubulin, Nf-L ve GFAP proteinleri, şizofrenide nörodejenerasyon ve ilerlemenin potansiyel biyobelirteçleri olabileceği düşünülmektedir [47]. Tiroid karsinomunda

yüksek TUBB3 ekspresyonunun invaziv potansiyel ve kötü prognoz ile ilişkili olduğunu ve muhtemelen epitelial-mezenkimal geçiş ile bağlantılı olabileceğini düşünülmüştür [48].

1.3.3. Nestin

Nestin (nöroepitelial kök hücre proteini), tip VI ara filament (IF) proteindir [49]. Bu ara filament proteinleri, genellikle aksonun radyal büyümesinde rol oynayan sinir hücrelerinde ifade edilir. Yedi gen, hafif (NF-L), orta (NF-M) ve ağır (NF-H) nörofilament proteinlerini, sinir hücrelerinde α -interneksi, nestin ve β 'de synemin α ve desmuslin/syne'i (iki alternatif transkript) kodlar [50]. Yapısal olarak, nestin, tüm ara filament proteinlerinin en kısa baş alanına (N-ucu) ve en uzun kuyruk alanına (C-ucu) sahiptir [51]. Nestinin ekspresyonu genellikle geçici olmasına ve yetişkinlikte kalıcı olmamasına rağmen, gelişim sırasında birçok hücre tipi tarafından eksprese edilirler. Nestin, periferik sinir sistemi, merkezi sinir sistemi ve miyojenik ve diğer dokulardaki gelişiminde erken aşamalarında bölünen hücrelerde eksprese edilen bir ara proteindir. Farklılaşma üzerine, nestin down regüle olur ve dokuya özgü ara filament proteinleri ile değiştirilir [51]. Nestin'in siklin bağımlı kinaz 5 ile etkileşime girdiği bilinmektedir [52].

Nestin çeşitli kanser türleri çalışmalarında kullanılmıştır. Nestin ekspresyonunun tek başına veya diğer biyobelirteçlerle birlikte değerlendirilmesi, birçok kanserde tanı sürecini iyileştirebilir ve klinik olarak sorunlu vakalarda belirli kanser türlerinin tanımlanmasına yardımcı olabileceği belirtilmiştir [53]. Kolorektal kanserde Nestin ve CD34 ekspresyonun genel sağkalımı iyileştirdiği tahmin edilmiştir [54]. Keap1-Nrf2 eksenini aracılığıyla hücrel redoks homeostazı ve mide kanseri metastazı için gerekli olduğu bildirilmiştir [55]. Nestin (+) karaciğer yıldızsı hücrelerinin TGF β yolunun aktivasyonunu azaltarak hem in vitro hem de in vivo olarak karaciğer fibrozunu önleyebileceği gösterilmiştir [56].

1.3.4. GDNF

GDNF (Glial hücre kaynaklı nörotrofik faktör) ilk olarak Engele, Schubert ve Bohn [57] tarafından glial hücrelerden salınan bir nörotrofik faktör olarak tanımlanmıştır. GDNF, hedef periferik dokularını yeni innerve eden veya sonlandıran gelişen nöronların hayatta kalmasını destekler. Bu molekül ailesi, periferik ve merkezi sinir sisteminin bakımı, gelişimi ve yenilenmesi için önemli olan bir polipeptit büyüme faktörü sınıfını oluşturur [58]. GDNF alt ailesi, sırasıyla 1-4 glikozilfosfatidilinositol

bağlantılı GFRA reseptörlerine bağlanan GDNF, persefin, nörturin ve arteminden oluşur [59].

Parkinson hastalığında motor semptomların ve dopaminerjik nöronların kaybının hafifletilmesinde GDNF'nin önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Bu yüzden GDNF ve diğer GDNF ailesi nörotrofik faktörleri Parkinson hastalığı çalışmalarında kullanılmıştır [60-63]. GDNF ve Alzheimer hastalığının ilişkisi araştırılmıştır. GDNF'nin serum düzeylerinin alzheimer hastalarında aynı yaştaki kontrollere kıyasla önemli ölçüde azaldığını ve bu nedenle GDNF'nin bir hastalık biyobelirteci olarak potansiyel bir rolü olduğunu ortaya koymuşlardır [64].

1.4. Kolinerjik Sistem

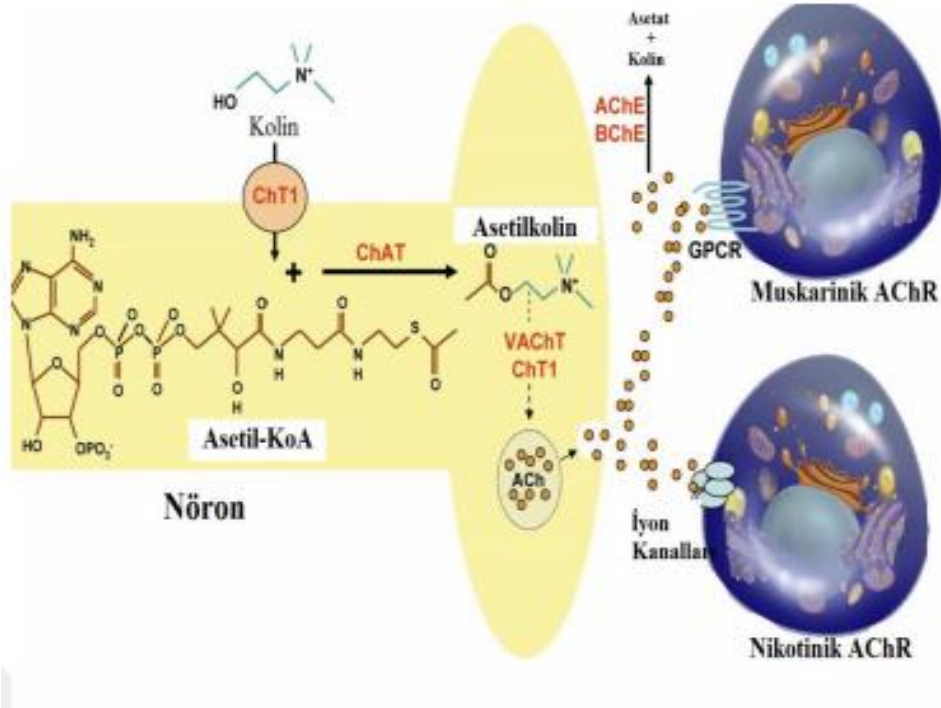
Kolinerjik sistem otonom sinir sisteminin parasempatik bölümünün temel bileşenlerini oluşturur. Periferdeki salgı sisteminin kontrolü de parasempatik sinir sistemi tarafından sağlanır. Bununla beraber beyindeki en önemli modülatör nörotransmitter sistemlerdendir. Öğrenme, dikkat ve hafıza gibi çeşitli işlevleri kontrol eder [65-68]. Kolinerjik sistem projeksiyonları iki gruba ayrılır. Bazal ön beyin (BF) kolinerjik sistem ve beyin sapı kolinerjik sistem. Ayrıca birincil ve ikincil duyuşal bölgeler arasındaki kolinerjik sinir iletimi, sinyal-gürültü oranını, bilgi akışını ve yanıt seçiciliğini etkileyerek uyaran işlemeyi düzenleyebilir [65, 69]. Yukarıdan aşağıya süreçler, ilgili duyuşal girdilerin nöronal işlenmesini geliştiren bilgi odaklı mekanizmalardır. Öte yandan, aşağıdan yukarıya süreçler, uyaranın özellikleri tarafından çalıştırılır. Birçok durumda, aşağıdan yukarıya ve yukarıdan aşağıya, optimal dikkat performansına ulaşmak için etkileşime girer [67, 68, 70, 71]. Kortikal kolinerjik aktivite, aşağıdan yukarıya ve yukarıdan aşağıya mekanizmalar arasındaki karmaşık etkileşimleri içerir ve hücresel düzeyde girdi işlemenin iyileştirilmesine aracılık eder [67]. Nöronal faktörler ve hormon salınımı, kontrolü üzerine kolinerjik sistemin etkileri yeterince araştırılmamıştır.

1.4.1. Kolinerjik Sistem Agonistleri

1.4.1.1. Asetilkolin

Kolinerjik sistemin nörotransmitteri olan asetilkolinin (ACh) öğrenme, dikkat ve hafıza gibi birçok bilişsel işlevde önemi büyüktür [7]. Az sayıda hücre, ACh'i üretir ama etkileri beyinde yaygın olarak dağılmıştır. ACh'in nörotransmitter olarak işlevi 1926'da Otto Loewi tarafından onaylanmıştır [72]. Vücutta ilk tanımlanan ve en yaygın bulunan nörotransmitterdir. ACh biyosentezi kolin asetiltransferaz enzimi (ChAT)

tarafından yapılır. Bu enzim, glikoz türevi olan Asetil koenzim A (asetil CoA) ve kolini birleştirir. ACh, vesiküllerinin hücre zarına geçiş yapmasıyla sinaptik aralığa salınır ve asetilkolin muskarinik ve nikotinik reseptörlere bağlanır. ACh'nin etkisi, Asetilkolinesterazın (AChE) yüksek hidroliz kapasitesi ile kolin, asetat ve su formuna hidrolize edilerek sonlandırılır [73]. Otonomik sinyal iletimi, kas kasılması ve öğrenme ve hafıza gibi çeşitli fizyolojik basamaklarda önemli rolleri vardır [74]. Beyinde nöronları inhibe eden veya uyaran bir nöromodülatör ajan olarak işlev görür. ACh'nin kısa süreli bellek ve öğrenme gibi bilişsel işlevlerde önemli rolü olduğu uzun süredir iddia edilmektedir [67, 75, 76]. Ek olarak ACh'in GnRH salınımında rol oynadığı bilinmektedir fakat doğrudan etkileri ve reseptörlerinin salınım yapan hücrelerdeki (AChR'ler) ekspresyon detayları aydınlatılmamıştır [74]. Nöronal asetil kolin üretimi, salınımı ve yıkım mekanizması şekil 1'de görülmektedir.



Şekil 1. Nöronal asetil kolin üretimi, salınımı ve yıkım mekanizması [73]

1.4.1.2.Diğerleri

2.4.1.2.1.Betanekol

Nikotinik reseptörler üzerinde herhangi bir etki yapmadan, muskarinik reseptörleri uyaran parasempatomimetik bir ACh analogudur. Betanekol, muskarinik

aktiviteye sahiptir ve ACh'den farklı olarak, kolinesterazlar tarafından yıkıma karşı dirençlidir ve böylece aktivitesi uzun sürelidir [77].

2.4.1.2.2.Pilokarpin

Güney Amerika *Pilocarpus* cinsinin bitkilerinin yapraklarından elde edilen bir alkaloiddir. Parasempatomimetik, miyotik, ve merkezi sinir sistemi etkileri olan bir kolinerjik agonisttir [78, 79]. Pilokarpin, baskın muskarinik etki ile geniş bir farmakolojik etki spektrumu uygular. Pankreas, gözyaşı, ter, tükürük, mide, bağırsak bezleri, solunum yolları ve mukoza hücreleri dahil olmak üzere ekzokrin bezlerinin salgısını artırabilir [79, 80]. Ayrıca, safra yolları, safra kesesi, idrar yolları, bağırsak ve bronşlardaki düz kas tonusunu ve hareketliliğini de artırır. Kolinerjik muskarinik reseptörlerin aracılık ettiği pilokarpinin parasempatomimetik etkisi, vazodilatasyon ve tükürük salgısı ile sonuçlanır [79, 81]. Sıçan dilaltı bezlerinde yapılan son çalışmalar, pilokarpin ile uyarılan tükürük salgılanmasında yer alan muskarinik reseptörlerin M3 alt tipinde olduğunu göstermektedir [79].

2.4.1.2.3.Karbokol

Pozitif yüklü bir kuaterner amonyum kolin karbamat bileşimidir. Karbakol hem nikotinik hem de muskarinik reseptörleri uyaran bir parasempatomimetiktir. Başlıca etkileri artmış hümör aköz çıkışı ve miyozisdir. Mide-bağırsak yolunda iyi emilmez ve kan-beyin bariyerini geçmez. Karbakol, kolinesteraz tarafından kolayca metabolize edilmez, 2 - 5 dakikalık bir etki başlangıcına sahiptir. Etki süresi topikal uygulamada 4 ila 8 saat ve intraoküler uygulamada 24 saattir [82]. Yakın zamanda yapılan bir inceleme, karbakolün, kalsiyum ile aktive olan klorür kanalı anoktamin 1 aracılığıyla Cajal interstisyel hücre (ICC) aktivitesinin güçlü bir promotörü olduğunu göstermektedir [83].

2.4.1.2.4.Muskarin

ACh'nin rekabetçi ve spesifik agonisti olarak alkaloid yapıdaki muskarin, ilk olarak parlak turuncu şapkalı mantar *Amanita muscaria*'dan izole edildi. Ayrıca *Inocybe* ve *Clitocybe* cinslerinin çeşitli türlerinde de bulunur. Kimyasal olarak 3-hidroksi -2 metil – 5- (trimetil-amonyummetil)-oksolan yapısındadır. Muskarin, kendi adıyla anılan muskarinik ACh reseptörlerindeki ACh'in etkisini taklit eder. Genetik ve farmakolojik karakterizasyonlar temelinde reseptörler ayrıca M1-M5 olarak adlandırılan beş alt tipte sınıflandırılmıştır [84].

2.4.1.2.5.Nikotin

Nikotin olasılıkla en eski psikoaktif maddelerden biridir. Tütün bitkisinde bol miktarda bulunmaktadır. Terapötik değeri olmamakla beraber sigarayı bırakmaya yardımcı olarak kullanılmaktadır. Kimyasal olarak 1-methyl-2-(3-pyridyl)pyrrolidine yapısındadır. Sigara içilmesi ile vücuda dağılan nikotin kan beyin bariyerini kolayca geçerek stimulan etki oluşturur. Periferdeki etkileri otonomik ganglionlar, adrenal medulla ve nöromüsküler kavşak üzerindedir. Hedef hücrelerdeki özgül etkilerini nikotinik tipteki (katyon kanalları) nAChR'leri aktive ederek yapar. Düşük dozlarda uyarıcı olmakla beraber yüksek dozlarda depolarizan etki gösterir ve iletimi bloke eder [85].

2.4.1.3.Asetilkolin Esterazlar

2.4.1.3.1.Fizostigmin

ACh metabolizmasına müdahale ederek etki eder. Sinir-kas kavşağının sinaptik aralığında ACh'nin parçalanmasından sorumlu enzim olan asetilkolinesterazın tersinir bir inhibitörüdür. Hem nikotinik hem de muskarinik ACh reseptörlerini dolaylı olarak uyarır. Mekanizması, asetilkolinesteraz tarafından ACh'nin hidrolizini önlemektir. Bu inhibisyon, ACh'nin etkisini artırarak kolinerjik bozuklukların ve miyastenia gravisin tedavisinde faydalı olmasını sağlar. Daha yakın zamanlarda fizostigmin güçlü antikolinesteraz aktivitesi nedeniyle Alzheimer hastalarının hafızasını geliştirmek için kullanılmıştır [86].

2.4.1.3.2.Neostigmin

İlk olarak 1931'de sentezlendi ve 1950'lerin ortalarından beri nöromüsküler blokajı (NMB) tersine çevirmek için bir ajan olarak kullanıldı. Neostigmin, ACh konsantrasyonlarını önemli ölçüde artırmaya hizmet eden, nöromüsküler kavşaktaki sinaptik aralıkta etkisini inhibe eden asetilkolinesteraz ile kovalent bir bağ oluşturur [87]. Artmış ACh, postsinaptik reseptörde nöronların normal sinyal vermesine izin veren NMBA'larla rekabet eder [88]. Neostigmin, uygun şekilde kullanıldığında postoperatif solunum komplikasyonları riskini azaltmaya yardımcı olan etkili bir ajandır [89]. Neostigmin ayrıca myastenia gravis tedavisinde ve postoperatif mesane şişkinliği ve retansiyonu için kas gücünü artırmak amacıyla kullanılmıştır [90].

2.4.1.3.3. Edrofonyum Klorür

Edrofonyum klorür de Myastenia'da kullanılmaktadır. Myastenia gravis, nöromüsküler kavşakta iletimin bozulmasına neden olan nadir bir otoimmün durumdur. Otoantikorlar öncelikli olarak post-sinaptik kavşaktaki nikotinik ACh reseptörünü hedef alır ve bu reseptör sayısındaki yıkıma ve azalmaya neden olur [91]. Edrofonyum klorür oküler myastenia gravis tanısında yaygın olarak kullanılan kısa etkili bir antikolinesterazdır. Edrofonyum, terleme, lakrimasyon, tükürük salgısı, fasyikülasyonlar ve abdominal kramplar gibi minör kolinerjik yan etkilerin yanı sıra bronşiyolar konstriksiyon, hipotansiyon, apne, bradikardi ve ventriküler asistol gibi majör kolinerjik yan etkileri vardır [92].

2.4.1.3.4. Rivastigmin

Bir kolinesteraz inhibitörü olan rivastigmin, seçici olarak asetilkolinesterazı inhibe eden donepezilden farklı olarak hem butirilkolinesterazı hem de asetilkolinesterazı inhibe eder [93]. Rivastigmin, hafif ila orta dereceli Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılır [94]. İlaç, oral yoldan veya bir transdermal yama yoluyla uygulanabilir. İkinci form, tipik olarak mide bulantısı ve kusmayı içeren yan etkilerin yaygınlığını azaltır [95, 96]. İlaç idrar yoluyla atılır. Nispeten az ilaç-ilâç etkileşimi var gibi görünmektedir [96].

1.4.2. Kolinerjik Sistem Antagonistleri (Antikolinerjikler)

2.4.2.1. Atropin

Atropin, *Atropa belladonna* (Güzellavrat Otu) adlı bitkiden elde edilir ve parasempatolitik etki gösteren alkaloid bir bileşiktir. Kimyasal formülü $C_{17}H_{23}NO_3$ 'tür. ATR tersiyer amin grubu grubu içerir ve lipofilik olması nedeniyle kan-bariyerini, plasentayı geçer. Merkezi sinir sistemindeki mAChR'lerin tüm alt tipleri için rekabetçi inhibitördür [8]. Amnestik, halüsinojenik, antiemetik ve yatıştırıcı etkilere sebep olan antikolinerjiktir. Ek olarak özellikle ekzokrin bezlerdeki parasempatik post-ganglionik lifler, intramural nöronlar, düz ve kalp kası, gözler, tükürük bezleri, gastrointestinal sistem, kalp ve bronş bezleri üzerinde azalmış sempatik etkilere neden olur. Antikolinerjik bileşikler, akciğerlerdeki bronşiyollerin daralması, kalp hızı, beslenme kanalındaki hareketler ve bez salgısı dahil farklı istemsiz vücut hareketlerini düzenlemek için parasempatik sinir sistemi ile ilişkili sinir uyarılarını bloke eder [97]. Ayrıca gözyaşı, kusma, terleme, tükürük salgısı, rinore, bulantı ve ishal gibi organofosfat zehirlenmesiyle ilgili bazı semptomları hafifletmek, bradikardi ve dolaşım

depresyonlarını düzenlemeye yardımcı olmak için kullanılabilir. Aşırı dozu yönelim bozukluğuna, hafıza disfonksiyonuna, halüsinasyona, kardiyovasküler ve solunum yetmezliğine sebep olur. Çeşitli organlardaki post-ganglionik mAChR'ler, antimuskarinik alkaloidlere farklı duyarlılık gösterir [97, 98]. Postganglionik bir parasempatik sinirden salınan ACh, bronkokonstrüksiyonu indükler ve hava yolu düz kasında M3 mAChR'leri uyarır ve M2 mAChR'ler negatif bir geri besleme mekanizmasına katılan ACh salınımını sınırlar. *Atropa belladonna* alkaloidleri gibi muskarinik antagonistlerle M2 ve M3 reseptörlerinin bloke edilmesi, M3 uyarılmasının neden olduğu bronkokonstriksiyonu azaltabilir, fakat M2 mAChR'lerin negatif geri besleme mekanizmasındaki bir eksiklik ACh salınımını ve bronkokonstrasyonu güçlendirebilir [97].

2.4.2.2.Diğerleri

2.4.2.2.1.Skopolamin

Muskarinik reseptörleri ACh ile rekabet ederek inhibe eder ve hem periferik antimuskarinik özellikler hem de merkezi sedatif, antiemetik, amnestik etkiler üreten seçici olmayan bir muskarinik antagonist olarak hareket eder. Yapısal olarak atropine çok benzeyen parasempatolitik skopolamin, özellikle göz, gastrointestinal sistem, kalp, tükürük ve bronşiyal salgı bezleri üzerindeki etkisi nedeniyle ve özel durumlarda, parasempatik aktivitenin azalmasını gerektiren durumlarda kullanılır. Özellikle taşıt tutması durumlarında kullanılır [98, 99].

2.4.2.2.2.Hyosin - N – Butil Bromür

Düz kas kasılmasının uyarılmasını ve solunum salgılarının üretimini azaltır. Bunlar normalde ACh yoluyla parasempatik sinir sistemi tarafından uyarılır. Bir antimuskarinik olarak, hyosin-N-butilbromid, mAChR'lere bağlanarak etkilerini bloke eder [21]. Atropin, bu ilaç grubu için prototip olarak kabul edilir ve hyosin-N-butilbromid de dahil farmakolojik çalışmaların çoğunda bir karşılaştırmacı olarak kullanılır [100]. Hyosin - N – Butil Bromür, kramplı karın ağrısının tedavisinde etkilidir [101].

2.4.2.2.3.Pirenzepin

Yapısal olarak imipramine benzeyen bir pirido-benzodiazepin antikolinergik bileşiktir. Merkezi sinir sistemine zayıf penetrasyonu nedeniyle büyük ölçüde merkezi aktiviteden yoksundur. Klasik antikolinergik ajanlardan farklı olarak pirenzepin,

muskarinik reseptörlere bağlanmasında seçici görünmektedir. Pirenzepin, muskarinik reseptörlere olan ACh yüksek afinitesini bloke ederek gastrik sekresyonu inhibe eder. Kardiyovasküler, oküler, üriner fonksiyonu, tükürük salgısı ve gastrointestinal motiliteyi etkiler. Bu durumlar için gerekenden daha düşük dozlarda bazal ve uyarılmış gastrik asit sekresyonunu inhibe eder [102].

1.4.3. Kolinergik Sistem Reseptörleri

Kolinergik reseptörler 1914'te Sir Henry Dale tarafından nikotinik ve muskarinik ACh reseptörleri olarak ikiye ayırmıştır [65-68]. ACh bağlayan ve ACh'in sinyalini ileten iki reseptör çeşiti vardır: muskarinik asetilkolin reseptörleri (mAChR'ler) ve nikotinik asetilkolin reseptörleri (nAChR'ler) [103]. Bu reseptörlerin etkili agonistleri, nikotin ve muskarindir, isimlerini de bu agonistlerden almışlardır [104, 105].

AChR'ler, nikotinik duyarlı iyonotropik veya muskarinik duyarlı metabotropik reseptörler olarak ortaya çıkan integral zar proteinleridir. Nikotinik reseptörler beş protein alt biriminin bir araya gelmesiyle oluşan iyon kanallarıdır. Muskarinik reseptörler yedi transmembranal reseptör tipinde tek bir peptit olarak karakterize edilen G protein kenetli reseptörlerin üst ailesine aittir [106].

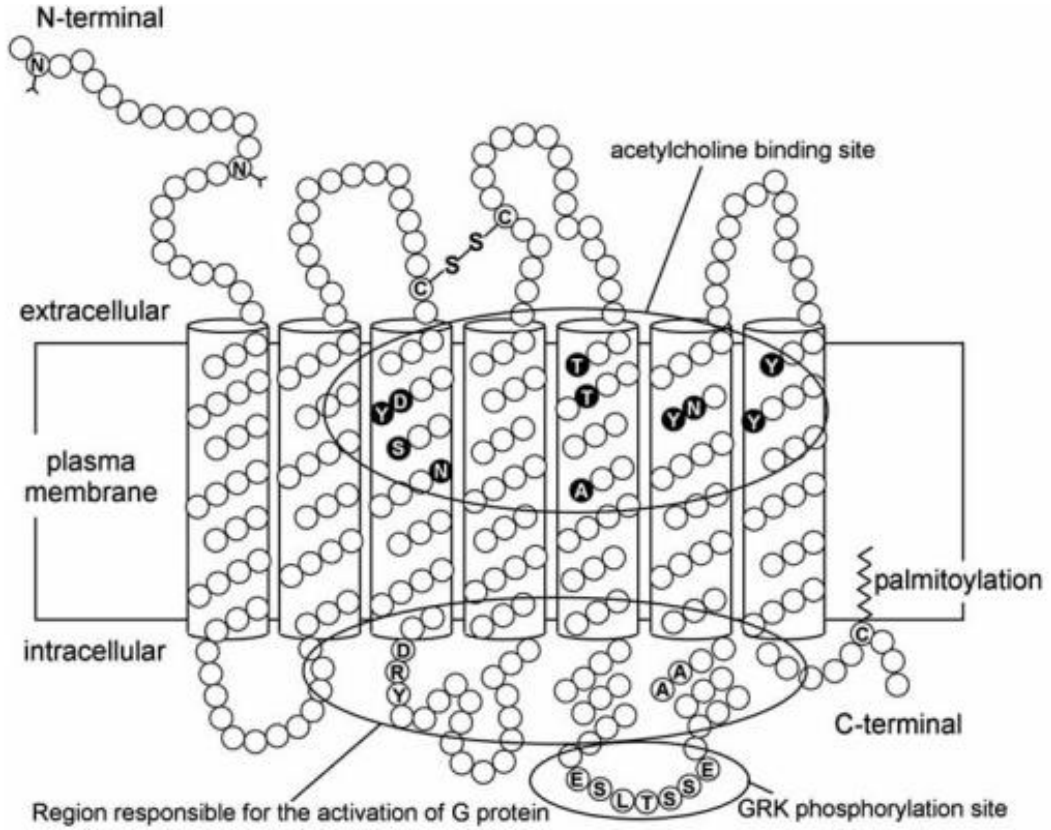
2.4.3.1. Muskarinik reseptörler

Muskarinik AChR'ler G-protein kenetli reseptörlerdir ve metabotropik reseptörler sınıfındadır. M1, M2, M3, M4 ve M5 olmak üzere beş mAChR alt tipi mevcuttur. Ayrıca, farklı G proteinlerine bağlanmasına göre daha geniş iki aileye ayrılırlar. M1, M3 ve M5 reseptörleri G_q / 11 proteinlerine bağlanırlar ve fosfolipaz C'yi aktive ederler. M2 ve M4 reseptörleri G_i / o proteinlerine bağlanırlar ve adenilil siklazları inhibe ederler [107].

1980'li yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda, muskarinik reseptörlerin farmakolojik özellikleri farklı olduğu çünkü farklı genler tarafından kodlandığı bulunmuştur [108]. G proteinleriyle kenetli reseptör ailesindeki mAChR aktivasyonunun sinir sisteminde hücrelerin giriş direncini ve uyarılabilirliğini artırarak K⁺, Ca²⁺ katyon kanalları üzerinde birincil etkileri vardır. Ancak Na⁺ ve Cl⁻ kanalları da etkilenebilir [109]. Muskarinik reseptörlerin hücre yüzeylerinde ligand bağlama bölgesi, hücre zarının sitoplazmik yüzeyinde ise G protein bağlama bölgesi mevcuttur ve karboksil ucu hücre içinde, amino ucu hücre dışında bulunur [110, 111]. Muskarinik reseptörler hücre membranını geçerken üçü hücre içinde, üçü hücre dışında 6 tane ilmek oluştururlar yani birbirine bağlanan yedi transmembran sarmal bölgeden oluşur (Şekil

5) [112]. Muskarinik reseptörlerin aktive olmasıyla koroner, sistemik ve serebral vaskülatürde vazodilatasyon oluşur [113, 114]. Deneysel olarak, reseptörlerin işlevsel rolü, antagonist/agonistler kullanılarak, hücresel ortamdaki reseptör - ligand konsantrasyonunu modüle ederek ya da reseptörlerin değişen ifadelerinin saptanmasıyla gösterilebilir [72]. Muskarinik reseptörlerin seçici olmayan agonisti muskarin, atropin ise seçici olmayan antagonistidir [72]. Muskarinik reseptörlerin uyarılmasıyla, fosfatidilinositol fosfatların hidroliz olur, guanilat siklaz ve adenilat siklaz baskılanır, kalsiyum bağımlı klor ve potasyum kanallarının, voltaja bağımlı kalsiyum kanalları düzenlenir. İlk basamakta; efektör fosfolipaz C G proteinin alfa alt ünitesi tarafından aktive edilir, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfattan, diasilgliserol (DAG) 14 ve inositol 1,4,5-trisfosfat (IP3) oluşur. IP3, sitoplazmik kalsiyum konsantrasyonunu kalsiyum depolarından kalsiyum salgılanmasını artırarak yükseltir. DAG fosfolipit bağımlı protein kinaz ve kalsiyum aktivitesini artırır. Muskarinik reseptörlerin aktive olmasıyla, fosfatidilkolini hidrolize uğratan fosfolipaz D de aktive olur. Ayrıca hücre içi kalsiyum derişimlerinin artmasıyla

- I. Kalmoduline bağımlı protein kinazların,
- II. Kalmoduline bağımlı adenilat siklazın,
- III. Kalmoduline bağımlı fosfodiesterazların,
- IV. Nitrik oksit sentazın aktivasyonu gerçekleşir [107, 115].



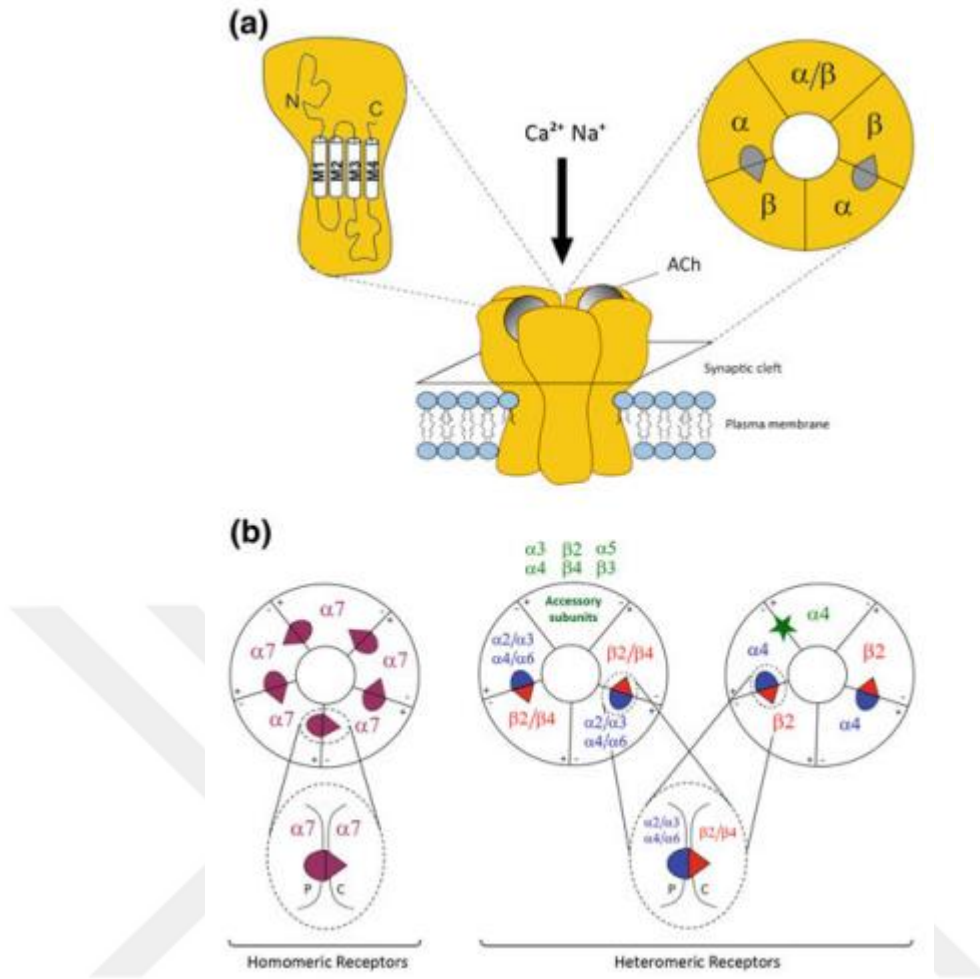
Şekil 2. Muskarinik (M1) asetilkolin reseptörünün moleküler yapısı. Muskarinik reseptörler yedi transmembran (TM) hidrofobik segmentlere sahiptir. Dolgulu daireler olarak gösterilen asetilkoline bağlanma için çok önemli olan kalıntılar, TM bölgelerinde bulunur. G proteininin aktivasyonundan sorumlu kalıntılar, ikinci (i2) ve üçüncü (i3) hücre içi halkalarda bulunur. G protein reseptör kinazlar (GRK'lar) tarafından fosforile edilen kalıntılar, i3 döngüsünde bulunur [116].

Muskarinik reseptörlerin yapısal olarak farklı alt tipleri vardır. Bu alt tiplerin fizyolojik fonksiyonları, karakteristik doku dağılımları ve farmakolojik bağlanma profilleri belirlenmiştir. Birçok hücrede veya dokuda birden fazla muskarinik reseptör tipi birlikte bulunur [117]. Bonner ve ark. [117] 1987'de moleküler biyoloji tekniklerini kullanarak insanlarda ve diğer memelilerde muskarinik reseptör alt tiplerini kodlayan 5 farklı intronsuz gen bulmuştur [107, 108, 118, 119]. Bu açıklanan genler, türler arasında yapı ve dizi benzerliği göstermektedir [107, 120]. Bu homoloji hücre membranını kateden bölgelerde, hücre içi işlevsel bölgeler ve sitoplazmik bölgelerden daha yüksektir. Adlandırma sisteminde moleküler ve farmakolojik alt tipler M1-M5 olarak gösterilir [121]. M1, M2, M3 ve M4 primer dokularda fonksiyonel ve farmakolojik olarak karakterize edilirken, M5 reseptörünün doku dağılımı belirlenmiş fakat reseptörün fonksiyonu tam olarak belirlenememiştir [122, 123]. M1 alt tipinin, striatumda ve beyin korteksinde; M2 alt tipinin, beyincik ve kalpte; M3 alt tipinin, düz

kaslarda ve ekzokrin salgı bezlerinde; M4 alt tipinin, striatumda ve son olarak M5 alt tipinin, substantia nigra'da gen ifadeleri yüksektir. Muskarinik reseptörlerdeki $\alpha 3$ bölgesi M1, M3, M5 alt tipleri arasında, M2 ve M4 alt tiplerine göre daha fazla benzerlik gösterir [115]. Bu bölge reseptörün etkileşiminde önemlidir ve bu etkileşimlerin düzenlenmesinden sorumlu fosforillenme bölgelerini içerir. Muskarinik reseptörlerin amino ucunda asparajin bulunur ve asparajin dizilerinde glikolizlenme modifikasyonu vardır [124].

2.4.3.2. Nikotinik reseptörler

Nikotinik reseptörler (nAChR'ler), pentamerik yapıda, katyonik, ve uyarıcı ligand kapılı kanallardır. Cys-loop reseptör ailesine aittirler [125]. Bu kanallar 290 kDa ağırlığına sahip proteinlerdir ve merkez etrafında simetrik olarak konumlanmış 5 alt birime (α , β , γ , δ ve ϵ) sahiptirler [7]. Nikotinik reseptörlerin ekspresyonundan sorumlu on altı gen vardır. Beş gen, nöromusküler tipteki nAChR'lerin ekspresyonundan diğer on bir gen ise nöronal alt tiplerin ekspresyonundan sorumludur [126, 127]. Nöronal alt tipleri, dokuz farklı nikotinik reseptör alt biriminin kombinasyonundan oluşur. Bunlar $\alpha 1,2,3,4,5,6$ ve $\beta 2,3,4$ şeklinde adlandırılır [128]. Nikotinik reseptörler, merkezi sinir sisteminde, endotel ve glial hücreler de bol bulunur [129]. Ayrıca nikotinik reseptörlerin internöronlarda postsinaptik olarak yerleştiği bilinmektedir [130]. ACh'in postsinaptik eyleminde aracı olarak işlev yaparlar [131]. Nikotinik reseptörler muskarinik reseptörlerle iş birliği yaparsa, intrinsik kavşaklarda baskılanma meydana gelir. Böylece yeni bilgiler güçlendirilirken eski bilgiler bastırılır. Bu nedenle, nikotinik reseptörler, bellek fazlarının belirli bir bölümünü güçlendirmede önemli bir role sahiptir. Nikotinik reseptörler nikotin ile aktive edilir, kürar ile ise bloke edilirler [132]. Nikotinik reseptörler ACh bağlanma bölgesine sahip olan ve ayrıca cys-loop olarak da adlandırılan hücre dışı amino terminal alanı, dört hidrofobik transmembran alanı ve uzun bir sitoplazmik döngü ayrıca alanları birbirine bağlayan diğer daha kısa döngülerden oluşur (Şekil 3) [133].



Şekil 3. nAChR alt birimlerinin varsayılan transmembran topolojisini gösteren Sol Diyagram. Heteropentamerik ve homopentamerik nöronal alt tiplerin yapısı.

- Hücre dışı amino terminal bölümünü, üç hidrofobik transmembran alanı (M1-M3), büyük bir hücre içi döngü ve ardından dördüncü bir hidrofobik transmembran alanı (M4) takip eder. Birleştirilmiş bir reseptörde nAChR alt birimlerinin Orta Pentamerik düzenlemesi. Heteromerik bir reseptörde ACh bağlanma bölgelerinin Doğru Lokalizasyonu ve şematik organizasyonu.
- Bir $\alpha 7$ homopentamerik alt tipinde (sağda), heteromerik reseptör alt tiplerinde (orta) ve $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$ alt tipinde (sağda) nAChR alt birimlerinin pentamerik düzenlemesi. Ortosterik bağlanma bölgelerinin alt birim ara yüzlerinin lokalizasyonu, a alt birimleri tarafından taşınan birincil bileşen (P) ve a veya α olmayan alt birimler tarafından taşınan tamamlayıcı bileşen (C) ile belirtilir. İki ortosterik bölgeye ek olarak, $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$ alt tipinin $\alpha 4/\alpha 4$ ara yüzünde (yıldız) bir bağlanma yeri vardır [134].

2. YÖNTEM

Çalışmalarımızın tamamı Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi Tıp Fakültesi Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Ayrıca çalışmamız Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne 2021-04-02-LTP02 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

2.1. Hücre Kültürü

Dondurucuda saklı olan hücreler çıkarılarak çözdürüldükten sonra %10 FBS ve antibiyotik içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma Aldrich, Almanya) ile kültüre edildi. Kültüre edilen GT1-7 hücrelerinin çoğalma işlemi 37 °C sıcaklık, %5 CO₂ ve %95 nemli ortam sağlayan inkübatörde (Thermo Scientific, ABD) yapıldı. Hücrelerin besiyeri ortamı 48 saatte bir değiştirildi. Kültür kabının %90'ı hücre ile kaplanana kadar bu periyotlarda besleme yapıldı. GT1-7 hücreleri flask tabanının %90'nını kapladığında pasajlama yapıldı. Pasajlama işlemi için önce flask içindeki besiyeri boşaltıldı, hücreler 3 mL PBS ile yıkandı ve flask tekrar boşaltıldı. Her flaskta 3 mL tripsin-EDTA (Biological Industries, ABD) eklendi ve enzim aktivitesi için 5 dakika 37 °C sıcaklıkta inkübasyona bırakıldı. 5 dk sonunda tripsin etkisini bloke etmek için her flaskta serum içeren besiyeri koyuldu. Hücre solüsyonu 15 mL falkon tüp içerisine alındı ve taze besiyeri ile flask bir kere yıkanarak flaskta kalan hücrelerde tüpe alındı. Falkon tüpler 400 g (yaklaşık 1200 rpm) hızda 5 dk. santrifüj (Thermo Scientific, ABD) edildi. Tüpte üstte kalan besiyeri dikkatlice çekilip atıldı tüpün altında kalan hücrelerin üzerine 5 mL besiyeri eklenerek hücre süspansiyonu hazırlandı. Bu süspansiyon tekrar aynı şekilde kültüre edilerek çalışmalara yetecek miktarda hücre elde edildi. Bu kültür işlemi sonunda yine tripsinizasyon ile elde edilen hücrelerin sayımı yapılarak bunlardan MTT ve PCR analizleri için deney grupları oluşturuldu.

2.1.1. Asetilkolin ve atropin stok çözeltilerinin hazırlanması

Asetilkolin ve atropin (Sigmaaldrich, Almanya) maruziyetinin hücrelerin proliferasyonuna etkisi için yapılan MTT testi ve ekspresyonlara etkisi için yapılan RT-qPCR için tasarlanan kültür çalışmalarında öncelikler stok çözeltiler hazırlandı. Her iki etken maddenin suda iyi çözünür nitelikte olup doğrudan serum içermeyen besiyeri ile 500 mM konsantrasyonlarda stokları hazırlandı.

Etken maddelerin molekül ağırlıkları;

Asetilkolin: 181,66 mg/mL

Atropin: 694,8 mg/mL'dir

2.1.2. MTT testi

Hücre proliferasyon analizi dimetil tiazol difenil tetrazolyum (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazolium bromide - MTT) ile yapıldı. MTT kolorimetrik bir yöntem olup normalde sarı renkli tetrazolyum bromidin metabolik olarak aktif çekirdekli hücre mitokondrilerinde dehidrojenaz enzim aktivitesi sonucu mor renkte olan formazon kriztallerine dönüştürülmesi temeline dayanır. Formazanın DMSO veya asit alkol ile çözülmesi sonrasında görülen renk değişiminin yoğunluğu 570 nm absorbansta ölçülür ve hücre proliferasyonu ve canlılığı analiz edilir.

Çoğaltma için yapılan kültür işlemi sonrasında elde edilen GT1-7 hücreleri her bir etken madde için ayrı ayrı 96 kuyulu plaklara, her kuyuda 10^4 hücre / 100 µL besiyeri olacak şekilde ekildi. Her plakta 1 sıra (8'li sıra kuyular) kontrol ve her konsantrasyon için 1'er sıra hazırlandı. Plakta 1 sıraya sadece besiyeri eklenerek kör (blank) olarak değerlendirildi. Hücreler adaptasyon ve adezyon için 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra hücrelerin besiyeri dikkatle alınarak, ilaçların hazırlanan konsantrasyonlarını içeren besiyeri ile değiştirildi. Plak tekrar 24 saat inkübasyona bırakıldı ve süre sonunda 5 mg/ml konsantrasyonda hazırlanan MTT solüsyonundan her kuyuya 10 µL eklendi ve 4 saat daha inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında plaklar santrifüj edilerek besi yeri alındı ve kuyulara 100 µL DMSO eklendi. Formazan çözülene kadar plaklar çalkalayıcıya bırakıldı. Çözünen formazan yoğunluğuna göre oluşan renk farklarının değerlendirilmesi için ELISA multimod okuyucuda (BioTek, Synergy H1, ABD) 630 nm ışık dalga boyu referans alınarak 570 nm dalga boyunda absorbans değerleri elde edildi. Elde edilen değerler üzerinden kontrol grubu absorbans değerleri %100'e eşitlenerek diğer gruplardaki proliferasyon kapasiteleri hesaplandı.

2.1.3. RT-qPCR için hücre kültürü

Çoğaltma amacıyla yapılan kültür işlemleri sonrasında ekspresyon analizleri yapılacak 9 grup için T25 flasklara ekim yapıldı, adaptasyon ve adezyon için 24 saat inkübasyona bırakıldı. Sonraki gün besiyeri alınarak aşağıda konsantrasyonları verilen gruplara uygun şekilde etken madde içeren taze besiyeri eklendi (Tablo 1). Yapılan

Çalışmalarda önce uyarılan ve daha sonra bloke edilen hücrelerdeki farklılıklar da analiz edilmek istendiğinden kombine ilaç içeren 8 ve 9. grupta flasklara önce ACh eklendi ve 24 saat inkübasyon sonunda atropin eklenip tekrar bir günlük inkübasyona bırakıldı. Flasklar bunan hücreler tripsin EDTA ile hücreler kaldırıldı ve RNA ekstraksiyonu için kullanıldı. Çalışma üç defa tekrar edildi.

Tablo 1. RT-qPCR analizleri için oluşturulan gruplar

1- Kontrol
2- Asetilkolin 1mM
3- Asetilkolin 10 mM
4- Asetilkolin 100mM
5- Atropin 1mM
6- Atropin 10mM
7- Atropin 100mM
8- Asetilkolin+Atropin 1mM
9- Asetilkolin+Atropin 10mM

2.2. RNA Ekstraksiyonu

Ekstraksiyon kiti (High Pure RNA Isolation Kit, Roche, Germany) kullanılarak hücrelerden RNA elde edildi. Öncelikle kit ieriğ-i kullanım klavuzuna göre hazır hale getirildi. Ekstraksiyon için kültür ortamından alınan hücrelerin sayımı yapılarak 10^6 hücre/mL konsantrasyonda hücre solüsyonu hazırlanarak 5 dk 400 g'de santrifüj edildi. Süpernatant döküldü ve hücrelerin üstüne 200 μ L PBS ve 400 μ L lizis/bağlama tamponu (Lysis/Binding buffer) eklendi ve 15 saniye vorteks ile karıştırdı. Falkon tüp içerisinde bulunan bu karışım içinde filtre bulunan toplama tüpüne aktarıldı. Daha sonra 8000 g' de 15 sn santrifüj edildi ve santrifüj sonrası filtre kaldırılarak tüpte biriken süpernatant atıldı ve filtre tekrar tüpe yerleştirildi. DNA'nın uzaklaştırılması amacıyla her bir örnek için 90 μ L DNAaz inkübasyon tamponu, 10 μ L DNAaz ile karıştırılıp DNAaz karışımı oluşturuldu ve tüplere pipetaj ile eklendi. 15 dakika oda sıcaklığında bekletilen örneklerin üzerine zerine 500 μ L yıkama tamponu I eklendi ve (Wash Buffer I) ve 8000 g' de 15 sn santrifüj edildi. Filtre kaldırılarak yine tüpteki süpernatant döküldü ve tekrar filtre yerleştirildikten sonra zerine 500 μ L yıkama tamponu II (Wash Buffer II) eklendi. Tekrar 8000 g hıza 15 sn santrifüj edildi ve filtrenin altında kalan süpernatant döküldü. Daha sonra zerine 200 μ L yıkama tamponu II tekrar eklendi ve 13000 g hızda 2 dk santrifüj edildi. Her basamakta olduğu gibi, filtrenin alt kısmında

kalan süpernatant dokuldu. Fitreler, bu aşamalarda kullanılan tüplerden alınarak etiketlendirilmiş steril yeni 1,5 mL eppendorflara yerleştirildi ve üzerlerine 50 µL ayırıştırma tamponu (Elution Buffer) eklendi ve son olarak 8000 g hızda 1 dk santrifüj edildi. Elde edilen örneklerdeki toplam RNA konsantrasyonlarının saptanması için 2 µL örnek kullanılarak multimod okuyucu ile ölçümler yapıldı. Elde edilen RNA örnekleri, cDNA eldesi için -80 °C dondurucuda saklandı.

2.3. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Elde edilen RNA örneklerinden cDNA sentezlemek için hazır kit (ABM, ABD) kullanıldı. Her bir örnek için hazırlanan sentez tüplerine, RNA ekstraksiyonlarından toplam 1 µg RNA içerecek hacimde örnek miktarı aktarıldı. Tüplere daha sonra kit içeriğinde bulunan RT buffer 4 µL ve Reverse Transcriptase, dNTP, oligo primer ve random primerlerden 1µL eklendi. Her bir tüpte toplam hacim 20 µL olacak şekilde kalan miktar nukleaz free su ile tamamlandı. Tüpler termal döngü cihazına (Applied Biosystems, SimpliAmp) yerleştirilerek aşağıda verilen döngü ile cDNA sentezi gerçekleştirildi.

- | | |
|--------------------------|--------------|
| - Reverse transcription1 | 25°C , 10 dk |
| - Reverse transcription2 | 50°C , 60 dk |
| - İnaktivasyon | 85°C , 5 dk |
| - Soğutma | 4°C , |

2.4. RT-qPCR Analizleri

RT-qPCR ile gruplar arasında GnRH, NGF, Nestin, B-III tübülün ve GDNF mRNA ekspresyonlarında oluşabilecek değişikliklerin saptanması hedeflenmiştir. Bu işlem için özgül primerler (Qiagen, Almanya) kullanılmış olup uluslararası gen tanımlama (Gene ID) ve üretici kodları tablo 2’te verilmiştir. Bu özgül primerlerin her biri ile, elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak analiz gerçekleştirildi. Bu analizin gerçekleştirilmesinde her bir örnekte kullanılan solüsyonların ve reaktiflerin miktarları tablo 3’te verilmiştir. Buna göre tüplerde hazırlanan örnekler Light cyler 96 cihazında 40 döngüde amplifiye edildi. Amplifikasyon döngüsü tablo 4’te verilmiştir.

Tablo 2. Kullanılan mix primerler ve gen tanımlama kodları

Primer (Qiagen,Germany)		Gene ID	Qiagen -GeneGlobe ID
GnRH	Gonadotrophin releasing hormone	14714	PPM57676A
NGF	Nerve Growth Factor	18049	PPM03596B
β-Tubulin III	Class III β -tubulin	22152	PPM04754A
Nestin	Type VI intermediate filament protein	18008	PPM04735A
GDNF	Glial Derived Neurotrophic Factor	14573	PPM04315F
β-Actin (Housekeeping)	Actin, beta	11461	PPM02945B

Tablo 3. Primer Mikslerinin Hazırlamak için Gereken Solüsyon ve Reaktif Miktarları

Solüsyon / Materyal	Miktar
Syber Green master mix	12,5 μ l
Özgül Primer	1 μ l
cDNA	1 μ l
Su	10,5 μ l
Toplam	25 μ l

Tablo 4. RT-qPCR Amplifikasyon Döngüsü

Döngü sayısı	Süre	Sıcaklık	Döngü Nedeni
1	10 dakika	95 °C	Taq polimerazın sıcaklıkla aktivasyonu
40	10 saniye	95 °C	Saptanan florokrom prob Sybr Green verilerinin toplanması
	10 saniye	55 °C	
	20 saniye	72 °C	
Melting	10 saniye	95 °C	
	60 saniye	60 °C	
	süresiz	97 °C	

2.5. İstatistik Analiz

MTT analizleri sonucunda gruplarda tüm örneklerden elde edilen absorbans değerleri kontrol grubu 100 olacak şekilde % değerlere çevrildi. RT-qPCR ile elde

edilen Threshold cycle (CT) değerlerinin ise referans gen (housekeeping gen, HKG) β -Actine göre normalizasyonu ve fold change (katlı değişim) için $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ hesaplamaları (işlem formülü aşığıda verilmiştir) yapıldı. Verilerin normal dağılım gösterip göstermediği Shapiro Wilk testi ile analiz edildi. MTT analizleri ile elde edilen sonuçların karşılaştırılması için One Way Anova ve post hoc bonferroni korelasyonu uygulandı. RT-qPCR ile elde edilen rölatif mRNA ekspresyonlarının kat değişim değerleri Kruskal-Wallis ile istatistiksel olarak analiz edildi. Analizler için GraphPad Prism versiyon 9.0.0 programı kullanıldı.

Katlı değişim (Fold Change) işlemleri:

$$\Delta CT (\text{kontrol}) = CT (\text{kontrol}) - CT (\text{HKG-kontrol})$$

$$\Delta CT (\text{deney grubu}) = CT (\text{deney grubu}) - CT (\text{HKG-deney grubu})$$

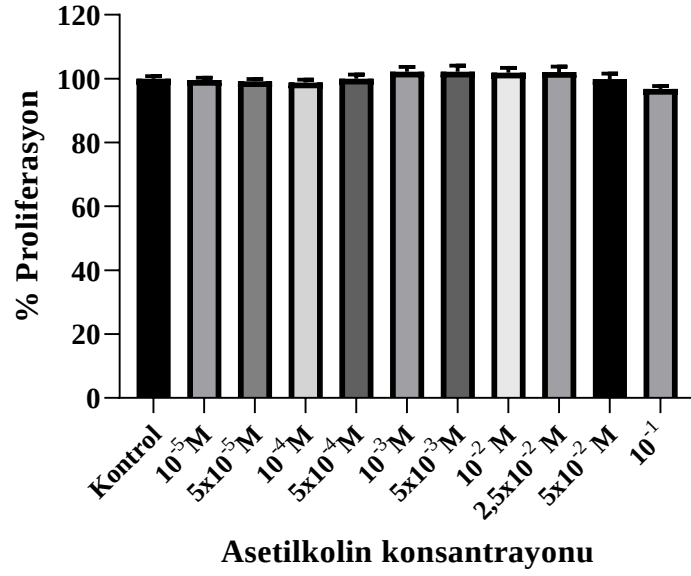
$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{deney grubu}) - \Delta CT (\text{kontrol})$$

$$\text{Fold Change} = 2^{(-\Delta\Delta CT)}$$

3. BULGULAR

3.1. MTT Bulguları

ACh ve atropinin GT1-7 hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisini değerlendirmek için MTT analizi yapıldı. Çalışma için etken madde eklenmeyen kontrol ile birlikte ACh'nin 10^{-5} – 10^{-1} M ve atropinin 10^{-5} – 10^{-2} M arasında konsantrasyonları analiz edildi. ACh için oldukça yüksek konsantrasyonlarda bile proliferatif ya da sitotoksik bir etki tespit edilmedi (Şekil 4). Mikroskopik analizlerde de hücrelerin proliferasyonuna bir etki görülmedi (Şekil 5). Ayrıca MTT testinin yapıldığı plaklarda kör dışında tüm kuyucuklarda çözünen formazan kristalleri oluşmuştu (Şekil 6). Atropinin ise yine yüksek bir konsantrasyonu olan 10^{-3} M seviyesine kadar artan dozlarda herhangi bir etkisi saptanmadı. Bundan sonra gelen konsantrasyonlarda ise etkinin şiddetlendiği ve aniden proliferasyonun durduğu tespit edildi (Şekil 7). Ek olarak 96 kuyulu plakta proliferasyonun aniden azaldığı, ilgili konsantrasyonların bulunduğu kuyucuklarda çözünen formazan kristalleri sonucu oluşan mor rengin kaybıyla gözlenmiştir (Şekil 8). Bu sonuçlar atropinin olumsuz etkisini gösterse de çalışmamızda veya literatürde kullanılan konsantrasyonlara göre oldukça yüksektir. Bununla beraber yüksek atropin konsantrasyonlarının GT1-7 hücrelerinin proliferasyonu için anlamlı derecelerde olumsuz etkisi olduğu bulundu (Tablo 6). Bu etki mikroskopik analizlerde de saptandı (Şekil 9). ACh ve atropinin MTT sonucu elde edilen % proliferasyon ve ortalama standart hata (SEM) sonuçları tablo 5 ve 7'de verilmiştir.

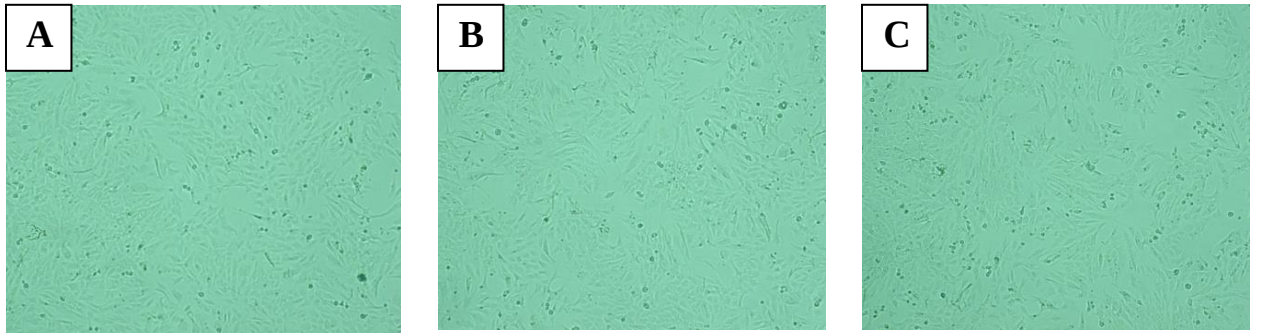


Şekil 4. ACh'nin artan konsantrasyonlarında GT1-7 hücreleri üzerine proliferatif/sitotoksik etkileri. Oldukça yüksek konsantrasyonlarda dahil olmak üzere istatistiksel anlamlı bir fark saptanmamıştır.

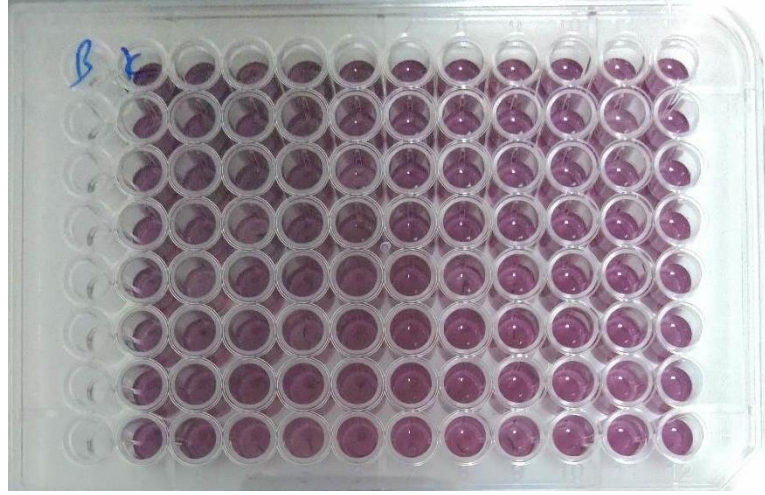
Tablo 5. ACh'nin artan konsantrasyon gruplarında GT1-7 hücreleri üzerine % proliferasyon ortalama ve

Konsantrasyon (M)	Kontrol	10^{-5}	5×10^{-5}	10^{-4}	5×10^{-4}	10^{-3}	5×10^{-3}	10^{-2}	$2,5 \times 10^{-2}$	5×10^{-2}	10^{-1}
Ortalama % Proliferasyon	100,0	99,54	99,20	98,80	99,99	102,2	102,1	101,9	102,0	99,86	96,83
SEM	0,7589	0,7071	0,7087	0,9312	1,277	1,550	1,947	1,430	1,762	1,763	0,8231

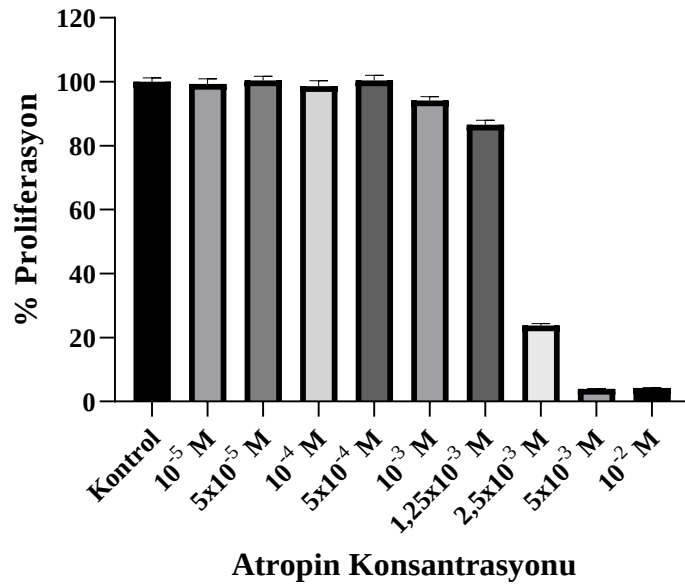
SEM değerleri.



Şekil 5. ACh'nin artan konsantrasyonlarda GT1-7 hücrelerine etkisinin mikroskopik görünümü. A: Kontrol. B: 10^{-3} M. C: 5×10^{-2} M



Şekil 6. ACh'nin etkisini saptamak amacıyla yapılan MTT analizinde kullanılan 96 kuyulu plakta tüm gruplara ait kuyucuklarda çözünmüş formazan kristalleri. Görsel olarak kör olarak kullanılan 1. sıra (dikey soldan) dışında diğer tüm kuyularda formazan kristallerinin çözündüğü görülmektedir.



Şekil 7. Atropinin artan konsantrasyonlarında GT1-7 hücreleri üzerine proliferatif/sitotoksik etkileri. Atropinin 10^{-3} M konsantrasyonundan itibaren proliferasyonun şiddetli bir şekilde azaldığı saptandı.

Tablo 6. MTT sonuçlarına göre kontrol ve atropinin artan konsantrasyon grupları arasında GT1-7 hücrelerine etkilerin karşılaştırılması. One Way ANOVA post hoc bonferroni. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0,0001

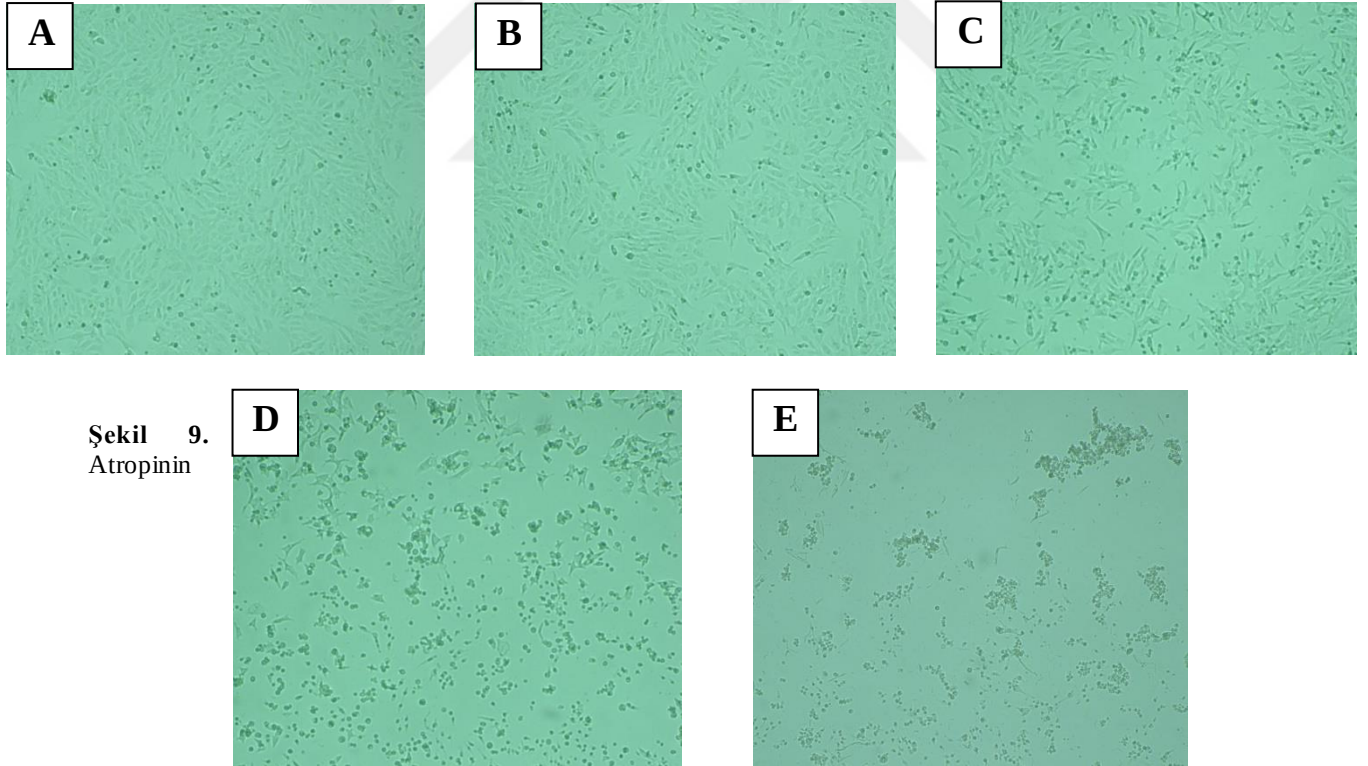
Güpler karşılaştırma	arası	p Değeri
10 ⁻³ M vs. Kontrol	*	0,0203
1,25x10 ⁻³ M vs. Kontrol	****	<0,0001
2,5x10 ⁻³ M vs. Kontrol	****	<0,0001
5x10 ⁻³ M vs. Kontrol	****	<0,0001
10 ⁻² M vs. Kontrol	****	<0,0001
1,25x10 ⁻³ M vs. 10 ⁻⁵ M	****	<0,0001
2,5x10 ⁻³ M vs. 10 ⁻⁵ M	****	<0,0001
5x10 ⁻³ M vs. 10 ⁻⁵ M	****	<0,0001
10 ⁻² M vs. 10 ⁻⁵ M	****	<0,0001
10 ⁻³ M vs. 5x10 ⁻⁵ M	**	0,0075
1,25x10 ⁻³ M vs. 5x10 ⁻⁵ M	****	<0,0001
2,5x10 ⁻³ M vs. 5x10 ⁻⁵ M	****	<0,0001
5x10 ⁻³ M vs. 5x10 ⁻⁵ M	****	<0,0001
10 ⁻² M vs. 5x10 ⁻⁵ M	****	<0,0001
1,25x10 ⁻³ M vs. 10 ⁻⁴ M	****	<0,0001
2,5x10 ⁻³ M vs. 10 ⁻⁴ M	****	<0,0001
5x10 ⁻³ M vs. 10 ⁻⁴ M	****	<0,0001
10 ⁻² M vs. 10 ⁻⁴ M	****	<0,0001
10 ⁻³ M vs. 5x10 ⁻⁴ M	**	0,0073
1,25x10 ⁻³ M vs. 5x10 ⁻⁴ M	****	<0,0001
2,5x10 ⁻³ M vs. 5x10 ⁻⁴ M	****	<0,0001
5x10 ⁻³ M vs. 5x10 ⁻⁴ M	****	<0,0001
10 ⁻² M vs. 5x10 ⁻⁴ M	****	<0,0001
1,25x10 ⁻³ M vs. 10 ⁻³ M	**	0,0025
2,5x10 ⁻³ M vs. 10 ⁻³ M	****	<0,0001
5x10 ⁻³ M vs. 10 ⁻³ M	****	<0,0001
10 ⁻² M vs. 10 ⁻³ M	****	<0,0001
2,5x10 ⁻³ M vs. 1,25x10 ⁻³ M	****	<0,0001
5x10 ⁻³ M vs. 1,25x10 ⁻³ M	****	<0,0001
10 ⁻² M vs. 1,25x10 ⁻³ M	****	<0,0001
5x10 ⁻³ M vs. 2,5x10 ⁻³ M	****	<0,0001
10 ⁻² M vs. 2,5x10 ⁻³ M	****	<0,0001

Tablo 7. Atropinin artan konsantrasyon gruplarında GT1-7 hücreleri üzerine % proliferasyon ortalama ve SEM değeri.

Konsantrasyon (M)	Kontrol	10 ⁻⁵	5x10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	5x10 ⁻⁴	10 ⁻³	1,25x10 ⁻³	2,5x10 ⁻³	5x10 ⁻³	10 ⁻²
Ortalama % Proliferasyon	100,0	99,33	100,4	98,65	100,5	94,09	86,55	23,77	3,982	4,222
SEM	1,251	1,535	1,246	1,637	1,520	1,247	1,386	0,6341	0,06586	0,1023



Şekil 8. Atropinin etkisini saptamak amacıyla yapılan MTT analizinde kullanılan 96 kuyulu plakta tüm gruplara ait kuyucuklarda çözünmüş formazan kristalleri. Plakta $2,5 \times 10^{-3}$ M konsantrasyon grubunun bulunduğu 8. sıradan (dikey soldan) itibaren proliferasyonun aniden kesildiği sitotoksik etkinin olduğu görülmektedir.



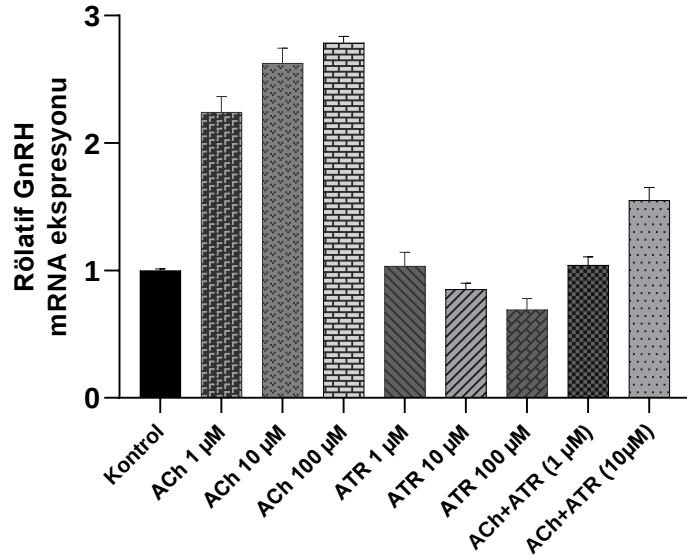
Şekil 9.
Atropinin

artan konsantrasyonlarda GT1-7 hücrelerine etkisinin mikroskobik görünüşleri. A: Kontrol. B: 10^{-4} M. C: $1,25 \times 10^{-3}$ M. D: $2,5 \times 10^{-3}$ M. E: 5×10^{-3} M

3.2. ACh ve Atropin Etkisinde GT1-7 Hücrelerinde GnRH ve Nöronal Belirteçlerin Rölatif mRNA Ekspresyonları

3.2.1. Rölatif GnRH mRNA ekspresyonları

ACh'nin 100 μ M konsantrasyon grubunda GnRH mRNA ekspresyonunda kontrol grubuna göre anlamlı artış tespit edildi. Bununla beraber istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 1 ve 10 μ M konsantrasyon gruplarında ekspresyonda 2 katın üzerinde bir artış saptandı. Bu artışlar fizyolojik yönden değerlendirildiğinde anlamlı kabul edilebilir. Bu sonuçlar kolinerjik uyarımın GnRH salınımında rolü olduğunu işaret etmektedir. Diğer gruplarda kontrole göre bir değişiklik görülmedi fakat atropinin artan doz gruplarında ortalama ekspresyonda giderek azalan değerler elde edildi. Önce ACh ve 24 saat sonra atropinin 1 ve 10'ar μ M konsantrasyonlarda eklendiği gruplarda ise kontrole göre anlamlı bir fark görülmedi. Yalnız ACh+ATR'nin 10 μ M konsantrasyon grubunda anlamlı olmasa da ekspresyondaki yükselme, ACh'nin artan konsantrasyon etkisinin GnRH ekspresyonuna katkı sağladığını, atropinin bir miktar baskılamaya neden olsa da etkisinin sınırlı kaldığını işaret etmektedir.



Şekil 10. Rölatif GnRH mRNA ekspresyon grafiği. ACh gruplarında iki kattan fazla ekspresyon artışı.

Tablo 8. GnRH mRNA ekspresyonunda gruplar arası istatistiksel anlamlılık farkları. Kruskal Wallis; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. #ACh 1 ve 10 µM gruplarında iki kat üzerinde meydana gelen artışlar da fizyolojik yönden anlamlı kabul edilmiştir.

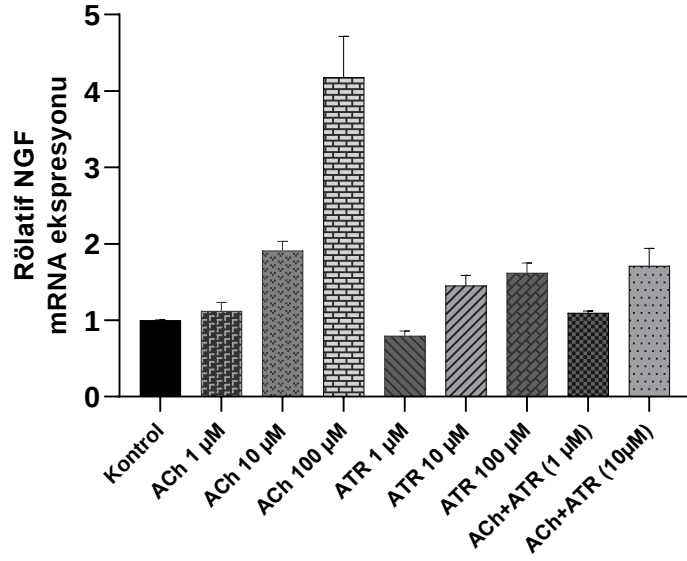
Gruplar arası farklar	p değeri	
ACh 100 µM vs. Kontrol	#	>x2 fold
ACh 100 µM vs. Kontrol	#	>x2 fold
ACh 100 µM vs. Kontrol	*	0,0252
ATR 10 µM vs. ACh 1 µM	*	0,0180
ATR 100 µM vs. ACh 1 µM	**	0,0064
ATR 1 µM vs. ACh 10 µM	*	0,0422
ATR 10 µM vs. ACh 10 µM	**	0,0047
ATR 100 µM vs. ACh 10 µM	**	0,0014
ATR 1 µM vs. ACh 100 µM	*	0,0193
ATR 10 µM vs. ACh 100 µM	**	0,0017
ATR 100 µM vs. ACh 100 µM	***	0,0005
ACh+ATR (1 µM) vs. ACh 100 µM	*	0,0307
ACh+ATR (10 µM) vs. ATR 100 µM	*	0,0270

Tablo 9. GnRH mRNA ekspresyonunda gruplar arasında ortalama katsayı değişimi (fold change) ve SEM değerleri. ACh 1 ve 10 µM gruplarında da fizyolojik yönden anlamlı artışlar mevcuttur.

Gruplar	Kontrol	ACh 1 µM	ACh 10 µM	ACh 100 µM	ATR 1 µM	ATR 10 µM	ATR 100 µM	ACh+ATR (1 µM)	ACh+ATR (10 µM)
Ortalama Fold Change	1,000	2,244	2,626	2,787	1,035	0,8515	0,6918	1,042	1,552
SEM	0,01244	0,1211	0,1181	0,04844	0,1076	0,04877	0,08764	0,06424	0,09809

3.2.2. Rölatif NGF mRNA ekspresyonları

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre ACh'nin 10 ve 100 µM konsantrasyonlarında NGF ekspresyonlarının arttığı saptandı. Ayrıca ACh'nin 100 µM konsantrasyon grubunda 1 µM'a göre de anlamlı artış tespit edildi. ACh gruplarında görülen bu artışlar atropinin özellikle 1 µM konsantrasyonu ile baskılanmıştır. Atropinin ve atropin ile birlikte ACh'nin bulunduğu hiçbir konsantrasyon grubunda ise kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik görülmedi. Bununla beraber atropinin 10 ve 100 µM gruplarında 1 µM grubuna göre anlamlı artışlar, baskılanan NGF ekspresyonuna hücrelerin fonksiyonlarını devam ettirmek için artan konsantrasyonda ekspresyon artışıyla cevap verdiğini düşündürmektedir. Önce ACh ve 24 saat sonra atropinin 1 ve 10'ar µM konsantrasyonlarda eklendiği gruplarda ise GnRH'ye benzer bir durum görüldü. Bu sonuçlar NGF ekspresyonunun artan ACh uyarımı sonucunda arttığını fakat kolinerjik reseptör blokajının etkisinin sınırlı olduğunu işaret etmektedir.



Şekil 11. Rölatif NGF mRNA ekspresyon grafiği. ACh 10 ve 100 µM konsantrasyonlarında ekspresyon artışı.

Tablo 10. NGF mRNA ekspresyon gruplar arası istatistiksel anlamlılık farkları. Kruskal Wallis; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

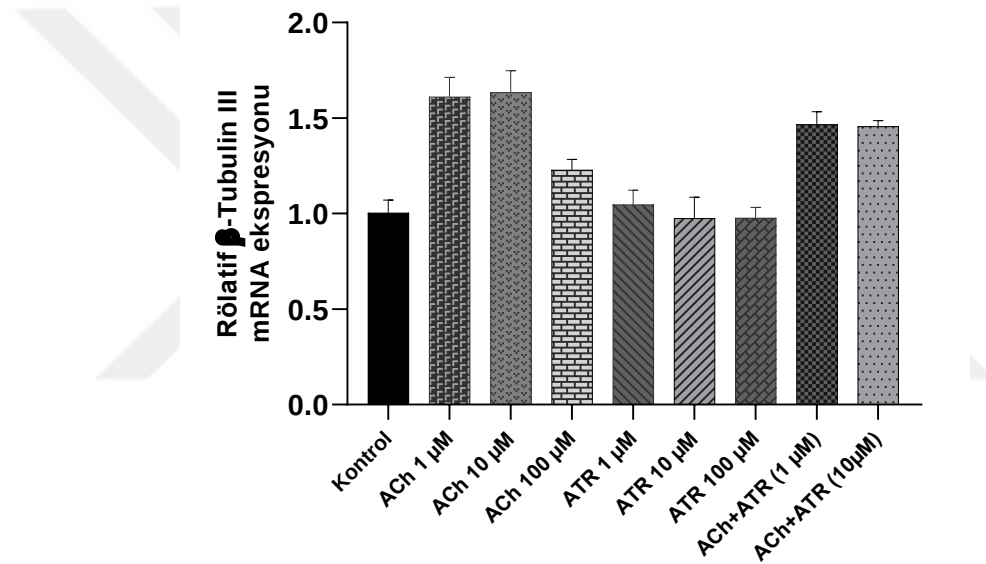
Gruplar arası farklar	p değeri	
ACh 10 µM vs. Kontrol	*	0,0156
ACh 100 µM vs. Kontrol	**	0,0020
ACh 100 µM vs. ACh 1 µM	**	0,0087
ATR 1 µM vs. ACh 10 µM	**	0,0024
ATR 1 µM vs. ACh 100 µM	***	0,0002
ACh+ATR (1 µM) vs. ACh 100 µM	*	0,0101
ATR 10 µM vs. ATR 1 µM	*	0,0349
ATR 100 µM vs. ATR 1 µM	*	0,0156
ACh+ATR (10µM) vs. ATR 1 µM	*	0,0101

Tablo 11. NGF mRNA ekspresyonunda gruplar arasında ortalama katsayı değişimi (fold change) ve SEM değerleri.

Gruplar	Kontrol	ACh 1 µM	ACh 10 µM	ACh 100 µM	ATR 1 µM	ATR 10 µM	ATR 100 µM	ACh+ATR (1 µM)	ACh+ATR (10 µM)
Ortalama Fold Change	1,000	1,120	1,913	4,180	0,7946	1,453	1,621	1,095	1,712
SEM	0,005793	0,1141	0,1199	0,5335	0,06538	0,1321	0,1279	0,02636	0,2297

3.2.3. Rölatif  -Tubulin III mRNA ekspresyonları

Nöronal belirteçlerin ekspresyon analizlerinde  -Tubulin III için elde ettiğimiz sonuçlarda kontrol ve atropin gruplarına göre özellikle 1 ve 10  M ACh konsantrasyon gruplarında anlamlı artışlar saptandı. İlginç olarak 100  M konsantrasyonda bir miktar artış görülse de anlamlı olmayıp sınırlı kalmıştır. Bu durum yüksek ACh konsantrasyonunun olasılıkla desensitizasyon ya da down regülasyona neden olduğunu d   nd rebilir. Bu sonuç  -Tubulin III için yeni bazı sorular olu urmaktadır. Atropin gruplarında kontrole göre anlamlı farklar tespit edilmedi. ACh ve Atropinin 24 saat arayla 1 ve 10  M konsantrasyonlarda birlikte uygulandığı gruplarda da ACh'nin 1 ve 10  M konsantrasyon gruplarına benzer sonuçlar elde edildi.



Şekil 12. Rölatif  -Tubulin III ekspresyon grafiği. ACh 1 ve 10  M , ACh+ATR (1  M), ACh+ATR (10  M) gruplarında ekspresyon artı ı.

Tablo 12. β -Tubulin III mRNA ekspresyon gruplar arası istatistiksel anlamlılık farkları. Kruskal Wallis; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

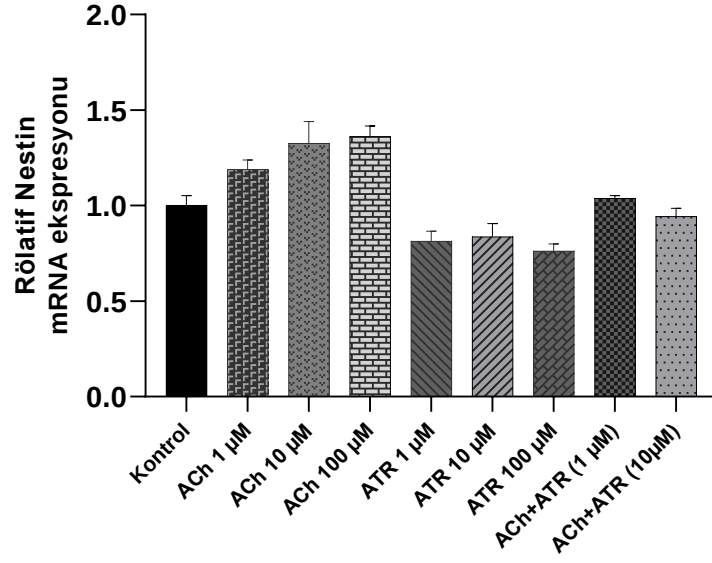
Gruplar arası farklar	p değeri	
ACh 1 μ M vs. Kontrol	**	0,0094
ACh 10 μ M vs. Kontrol	*	0,0117
ACh+ATR (1 μ M) vs. Kontrol	*	0,0448
ACh+ATR (10 μ M) vs. Kontrol	*	0,0421
ATR 1 μ M vs. ACh 1 μ M	*	0,0179
ATR 10 μ M vs. ACh 1 μ M	**	0,0075
ATR 100 μ M vs. ACh 1 μ M	**	0,0069
ATR 1 μ M vs. ACh 10 μ M	*	0,0220
ATR 10 μ M vs. ACh 10 μ M	**	0,0094
ATR 100 μ M vs. ACh 10 μ M	**	0,0087
ACh+ATR (1 μ M) vs. ATR 10 μ M	*	0,0372
ACh+ATR (10 μ M) vs. ATR 10 μ M	*	0,0349
ACh+ATR (1 μ M) vs. ATR 100 μ M	*	0,0349
ACh+ATR (10 μ M) vs. ATR 100 μ M	*	0,0327

Tablo 13. β -Tubulin III mRNA ekspresyonunda gruplar arasında ortalama katsayı değişimi (fold change) ve SEM değerleri.

Gruplar	Kontrol	ACh 1 μ M	ACh 10 μ M	ACh 100 μ M	ATR 1 μ M	ATR 10 μ M	ATR 100 μ M	ACh+ATR (1 μ M)	ACh+ATR (10 μ M)
Ortalama Fold Change	1,000	1,612	1,635	1,228	1,047	0,9758	0,9770	1,467	1,456
SEM	0,06663	0,1011	0,1136	0,05607	0,07613	0,1098	0,05551	0,06606	0,03097

3.2.4. Rölatif Nestin mRNA ekspresyonları

Çalışmamızda nestin mRNA ekspresyonlarında herhangi bir etken maddeye maruz bırakılmayan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında etken maddelerin artan konsantrasyonlarına maruz bırakılan hiçbir grupta anlamlı bir fark tespit edilmedi. Bunun aksine ACh gruplarında atropin gruplarına göre anlamlı artışlar mevcuttu. Bu sonuçlar ACh'nin nispeten bir artışa atropinin ise azalışa neden olduğunu göstermektedir.



Şekil 13. Rölatif nestin ekspresyon grafiği. Kontrole göre anlamlı fark saptanmadı.

Tablo 14. Nestin mRNA ekspresyon gruplar arası istatistiksel anlamlılık farkları. Kruskal Wallis; *p<0.05, **p<0.01

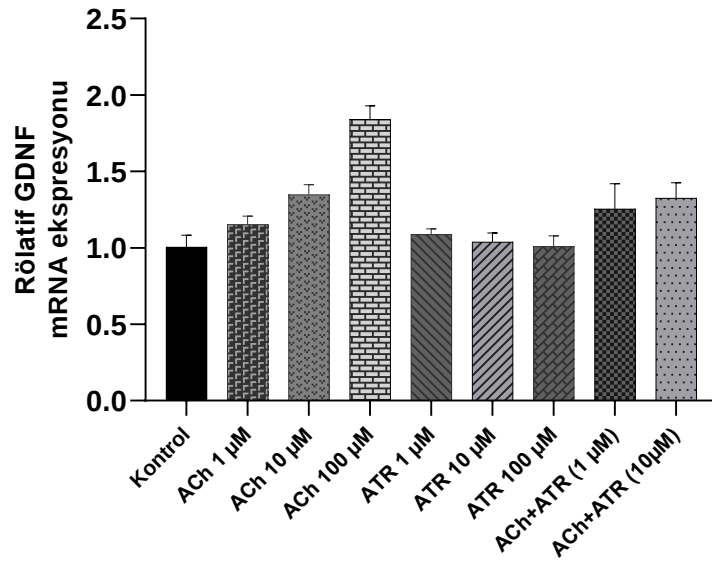
Gruplar arası farklar	p değeri
ATR 1 µM vs. ACh 1 µM	* 0,0179
ATR 10 µM vs. ACh 1 µM	* 0,0269
ATR 100 µM vs. ACh 1 µM	** 0,0064
ATR 1 µM vs. ACh 10 µM	** 0,0055
ATR 10 µM vs. ACh 10 µM	** 0,0087
ATR 100 µM vs. ACh 10 µM	** 0,0017
ATR 1 µM vs. ACh 100 µM	** 0,0050
ATR 10 µM vs. ACh 100 µM	** 0,0080
ATR 100 µM vs. ACh 100 µM	** 0,0016
ACh+ATR (10µM) vs. ACh 100 µM	* 0,0476

Tablo 15. Nestin mRNA ekspresyonunda gruplar arasında ortalama katsayı değişimi (fold change) ve SEM değerleri

Gruplar	Kontrol	ACh 1 µM	ACh 10 µM	ACh 100 µM	ATR 1 µM	ATR 10 µM	ATR 100 µM	ACh+ATR (1 µM)	ACh+ATR (10 µM)
Ortalama Fold Change	1,000	1,190	1,327	1,362	0,8145	0,8375	0,7623	1,039	0,9436
SEM	0,05048	0,04872	0,1138	0,05435	0,05122	0,06769	0,03786	0,01367	0,04198

3.2.5. Rölatif GDNF mRNA ekspresyonları

GDNF mRNA ekspresyonlarında da diğ r nöronal belirteçlerde olduğu gibi özellikle 10 ve 100  M ACh konsantrasyon gruplarında kontrole göre artış saptandı. ACh'nin bu konsantrasyona ait gruplarında ekspresyon artışları, atropin gruplarına karşıda anlamlıydı. Atropinin ekspresyon üzerine kontrole göre gruplarda herhangi bir etkisi görülmedi. ACh ve atropinin birlikte uygulandığı gruplarda da ekspresyon katsayılarında bir miktar artış görülse de anlamlı bir fark tespit edilmedi.



şekil 14. Rölatif GDNF ekspresyon grafiği. ACh 10 ve 100  M konsantrasyonlarında ekspresyon artışı.

Tablo 16. GDNF mRNA ekspresyon gruplar arası istatistiksel anlamlılık farkları. Kruskal Wallis; *p<0.05, **p<0.01

Gruplar arası farklar	p değeri	
ACh 10 �M vs. Kontrol	*	0,0476
ACh 100 �M vs. Kontrol	**	0,0043
ATR 100 �M vs. ACh 10 �M	*	0,0269
ATR 1 �M vs. ACh 100 �M	*	0,0126
ATR 10 �M vs. ACh 100 �M	**	0,0075
ATR 100 �M vs. ACh 100 �M	**	0,0020

Tablo 17. GDNF mRNA ekspresyonunda gruplar arasında ortalama katsayı değişimi (fold change) ve SEM değerleri

Gruplar	Kontrol	ACh 1 μ M	ACh 10 μ M	ACh 100 μ M	ATR 1 μ M	ATR 10 μ M	ATR 100 μ M	ACh+ATR (1 μ M)	ACh+ATR (10 μ M)
Ortalama Fold Change	1,000	1,154	1,349	1,842	1,089	1,040	1,009	1,255	1,326
SEM	0,07619	0,05411	0,06510	0,08649	0,03472	0,05830	0,06846	0,1647	0,09961

Çalışmamız ACh'nin artan konsantrasyonlarda nöronal faktörlerin mRNA ekspresyonlarının artışına ve bununla beraber GnRH artışına neden olduğu göstermektedir. Elde ettiğimiz sonuçlar GnRH salınımının özellikle kolinerjik reseptörlerin uyarımıyla artış yaptığını fakat bununla beraber bu artışın nöronal faktörlerin artışına da bağlı olduğunu göstermektedir. Nöronal faktörlerin ekspresyonlarında da kolinerjik reseptörlerin uyarılmasının etkisi mevcuttur. Aksine blokaj etkisi ne nöronal faktörler ne de GnRH salınımı üzerine belirgin bir etkiye sahip değildi. Bu durum kolinerjik reseptör uyarımının GnRH ilişkili olduğunu ve nöronal faktörlerin ekspresyona katkı sağladığını ortaya koymaktadır. Bununla beraber atropin ile ekspresyonun baskılanmamış olması başka faktörlerin de birlikte hareket ettiğini işaret etmektedir.

4. TARTIŞMA SONUÇ VE ÖNERİLER

Eski tanımlamalarda literatürde GnRH 'Luteinize edici Hormon Salıcı Hormon (LHRH)' olarak bildirilmekteydi, ancak günümüzde her iki gonadotropinin (LH, FSH) salgılanması üzerindeki uyarıcı rolü nedeniyle "Gonadotropin Salıverici Hormon (GnRH) şeklinde yaygın olarak kullanılmaktadır [1].

GnRH salınımı ile ilgili çalışmalarda GT1-7 hücre kültürü model olarak kullanılmaktadır. Kolinerjik sistemin uyarımı ve blokajının GnRH ekspresyonunu ne şekilde etkilediğini değerlendirmek için tasarlanan bu çalışmada ACh ve atropinin öncelikle proliferasyon üzerine etkileri değerlendirildi. Kolinerjik sistemin GnRH ekspresyonundaki rolünü tespit etmek çalışmanın ana hedefini oluşturdu. Ayrıca bu hücrelerin nöronal aktivite gösteren hücreler olması nedeniyle kolinerjik uyarım ve blokajın NGF, BIII tubulin, nestin ve GDNF mRNA ekspresyonlarında nasıl değişiklikler oluşturduğunun tespit edilmesi amaçlandı. Ayrıca GnRH ile birlikte etkiler değerlendirildi.

Çalışmanın başında öncelikle kolinerjik reseptör aktivatörü ACh ve blokörü atropinin konsantrasyonlarının belirlenmesi, proliferasyona etkilerinin analiz edilmesi amacıyla GT1-7 hücreleri ile MTT testi yapıldı. Literatürde ACh ve atropin bu hücrelerin proliferasyonuna etkilerini gösteren MTT testi ile ilgili bir çalışmaya rastlanmadı. Atropin ve ACh'in GT1-7 hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri çalışmamız ile ilk defa gösterildi. Sonuçlarımıza göre ACh yüksek konsantrasyonlarda olsa da proliferatif, sitotoksik ya da apoptotik bir etkiye neden olmamıştır. Bunun aksine atropin $2,5 \times 10^{-3}$ M konsantrasyon ile çok ciddi sitotoksik etki gösterdi. Geniş açıdan değerlendirildiğinde bu değer oldukça yüksektir ve başka hücre hatları ile yapılan çalışmalarda bu derece yüksek konsantrasyonlar kullanılmamıştır. Genellikle çalışmalarda 10^{-4} M konsantrasyonlar yüksek konsantrasyon olarak tercih edilmiştir. Bu nedenle ekspresyon analizleri için oluşturulan gruplarımızda da en yüksek konsantrasyon olarak 10^{-4} M konsantrasyon çalışılmış olup diğer konsantrasyonlarda bu çalışmalarla eşdeğerdir [74, 135-137].

Arai Y ve ark. [74] kolinerjik reseptörlerin GT1-7 hücrelerinde muskarinik ve nikotinik ACh reseptörleri ve alt ünitelerini analiz etmişlerdir. Ek olarak GnRH salınımını izobütilmetilksantin ile uyarak bu reseptörlerin salınım üzerindeki etkisini de test etmişlerdir. Yüksek konsantrasyonda nikotinin GnRH salınımını indüklediğini tespit etmiş, muskarinin ise izobütilmetilksantin ile indüklenen salınımı

azalttığını saptamışlardır. Bu bulgular ile GT1-7 hücrelerinde nikotinik reseptör alt birimlerinin ve muskarinik M2, M4 reseptörlerinin varlığını göstermişlerdir. Reseptör tespiti ilgili kapsamlı tek çalışma niteliğindeki bu çalışmada nikotinin GnRH salınımına etkisi analiz edilmiş fakat ACh ve atropinin tek başlarına salınımına etkisi çalışılmamıştır. Bu etkenlerin sadece cAMP miktarına etkisi analiz edilmiştir. Çalışmamızda ACh ve atropin ayrı ayrı artan konsantrasyonlarda analiz edilmiştir. Özellikle ACh tek başına artan konsantrasyonlarda GnRH mRNA ekspresyonunda artışa neden olmuştur. Atropin ise yüksek konsantrasyonda anlamlı olmasa da azalma yapmıştır.

Richardson SB. Ve ark. [138] Sıçan medial bazal hipotalamusundan hazırladıkları kültür örneklerinde radyoimmünoassay yöntemi ile ACh, melatonin ve potasyumun varlığında GnRH salınımını incelemişlerdir. Kültür ortamına potasyum eklenmesiyle gerçekleştirilen depolarizasyonunun sadece kalsiyum varlığında GnRH salınımında belirgin bir uyarıma neden olduğu belirlenmiştir. Bununla beraber ACh ve parasempatometik antikolinesteraz ajanı neostigmin, GnRH salınımını belirgin şekilde uyarmıştır. Üstelik ACh uyarımı 10 nM gibi düşük bir konsantrasyonda gerçekleşmiştir. Nikotinik antagonist olan hekzametonyum (non-depolarizan gangliyonik blokör), GnRH salınımında ACh kaynaklı artışı ortadan kaldırmıştır. ACh'in sıçan medial bazal hipotalamusundan GnRH salınımını indükleyebildiği sonucuna varmışlardır. Çalışmamızda bu çalışmalara benzer sonuçlar elde edilmiştir. ACh artan konsantrasyonlarda GnRH salınımını arttırmıştır, atropin ise yüksek konsantrasyonlarda GnRH salınımında azalmaya sebep olmuş fakat istatistiksel bir fark elde edilmemiştir. Sıçan hipotalamus örneklerinden elde edilen sonuçlar nikotinik reseptör blokajının etkisini gösterirken çalışmamız ise atropin ile daha çok muskarinik reseptör blokajının etkisini saptamıştır.

GnRH, salınımı kalsiyuma bağımlıdır. Morales A ve ark. [139] 17 β -estradiol (E2) ve estradiol-peroksidazın (E HRP) ACh tarafından indüklenen hücre içi kalsiyum Ca²⁺ yükselmeleri üzerindeki akut etkilerini GT1-7 hücrelerinde incelemişlerdir. ACh'e maruz kalma Ca²⁺'nin geçici artışlarına neden olurken, E2 veya E-HRP ile ön tedavi bu yanıtı azalttığını bildirmişlerdir. Ne 17 α -estradiol ne de sentetik antiöstrojenler veya tamoksifen ACh ile indüklenen Ca²⁺ sinyalinde herhangi bir değişiklik meydana getirmediği için etki E2 için spesifik olduğu sonucuna varmışlardır. GT1-7 hücrelerinde ACh ile indüklenen Ca²⁺ artışının, fizyolojik E2 konsantrasyonları tarafından östrojene özgü bir membran bağlanma bölgesinin varlığı ile uyumlu bir şekilde akut olarak modüle edildiği sonucuna varmışlardır. Çalışmamızda da ACh artan konsantrasyonlarda

GT1-7 hücreleri GnRH mRNA ekspresyonunda anlamlı artışlar gözlemlenmiştir fakat atropin etkisi sınırlı kalmıştır. Farklı olarak nöronal faktörlerin etkisi olabileceğini gösterdik. Bununla beraber sonuçlarımız birçok faktörün GnRH salınımı ile ilişkili olabileceğini işaret etmektedir.

Morales A ve ark. [140] başka bir çalışmada ACh ile indüklenen Ca^{2+} sinyalleri üzerindeki östrojen eylemlerinin altında yatan yolu belirlemeyi amaçlamışlardır. 8-Bromoguanozin 3',5'-siklik monofosfat ve C-tipi natriüretik peptit estradiolün etkisini taklit ettiğini bulmuşlardır. Aksine ne dibutil cAMP, forskolin ne de sodyum nitroprussid, ACh'ye yanıt olarak Ca^{2+} 'nin herhangi bir modifikasyonunu indüklediğini bildirmişlerdir. Estradiolün kalsiyum geçişleri üzerindeki etkisi, iki farklı cGMP'ye bağımlı protein kinaz (PKG) inhibitörü tarafından tamamen bloke edilmiş ve ek olarak, inositol 1,4,5-trifosfat (IP3) reseptörünün fosforilasyonu, estradiol tarafından hızla indüklendiğini görmüşlerdir. Hücreleri bir PKG inhibitörü ile ön işleme tabi tuttukları zaman tamamen bloke edildiğini bildirmişlerdir. Fizyolojik estradiol konsantrasyonlarının, sonunda endoplazmik retikulumdan kalsiyum salınımını değiştiren bir PKG'ye bağlı IP3 reseptör fosforilasyonunu indükleyen, zarla ilişkili guanilat siklaz içeren bir mekanizma yoluyla ACh'nin neden olduğu Ca^{2+} geçişlerini azalttığı sonucuna varmışlardır. Estradiolün plazma zarına bağlanması mGC'yi aktive edebilir, cGMP üretimini hızlandırabilir, PKG'yi aktive edebilir ve ardından endoplazmik retikulumda IP3 reseptörlerinin PKG'ye bağlı fosforilasyonunu aktive edebilir. Sonuç olarak, IP3 reseptör fosforilasyonu, ACh ile uyarılmış IP3'ün endoplazmik retikulumdan kalsiyum salma potansiyelinin azalmasına neden olur. Bu adımların çoğu teyit edilmese de, böyle bir işlevsel organizasyon, hücresel düzeyde, estradiolün plazma zarında hareket ederek GnRH nöronlarının aktivitesini nasıl modüle ettiğini kısmen açıklamaya hizmet edecektir. Çalışmamızda da ACh artan konsantrasyonlarda GT1-7 hücreleri GnRH mRNA ekspresyonunda anlamlı artışlar gözlemlenmiştir fakat atropin etkisi sınırlı kalmıştır. Farklı olarak nöronal faktörlerin etkisi olabileceğini gösterdik. Bununla beraber sonuçlarımız birçok faktörün GnRH salınımı ile ilişkili olabileceğini işaret etmektedir konuyla ilgili yapılan geniş bir gözden geçirme bu durumu doğrulamaktadır. GABA, glutamat, dopamin, serotonin, norepinefrin, epinefrin, histamin, ATP, adenosin, nitrik oksit, karbon monoksit ve prostaglandin E2, glutamatın GnRH salınımı üzerine modülatör etkileri analiz edilmiştir. Nörotransmitterler, gazotransmitterler ve gliotransmitterlerin *in vivo* veya *ex*

vivo GnRH nöronlarındaki aktiviteyi ve/veya GnRH salgısını doğrudan modüle ettiği gösterilmiştir [135].

GnRH salabilen olfaktör nöronlardan izole edilen FNC-B4 hücre hattı ile yapılan bir çalışmada GnRH'ye maruz kalmanın nestin ekspresyonunda azalmaya neden olduğu bildirilmişti [141]. FNC-B4 hücrelerinde GnRH için işlevsel bir otokrin feedback döngüsünün varlığını doğrulamak için hücreleri doğal GnRH ve GnRH agonisti buserelin ile uyarmış ve GnRH ekspresyonunun RT-qPCR yöntemi ile zamana bağlı artışını gösterilmiştir. Eş zamanlı inkübasyon ile Buserelinin GnRH salgısında bu uyarıcı etkisini, GnRH antagonisti olan cetrotorelix tamamen ortadan kaldırmıştır [141]. Çalışmanın sonuçları GnRH ve/veya analoglarının cinsiyet faktörleri dışında nöronal faktörlerin modülasyonda da rol oynadığını göstermektedir. Ancak çalışmamızda muskarinik reseptör aktivasyonu ile elde edilen GnRH artışı sonucu nestin ekspresyonunda azalma görülmedi. Olasılıkla diğer çalışmada elde edilen azalma GnRH'nin dışardan uygulanması sonucunda farklı mekanizmaları harekete geçirmiş olmasına bağlıdır. RT-qPCR sonuçlarımızda hiçbir grupta istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilemedi fakat ACh için artış yönünde sonuçlar elde ettik.

Kramer PR. ve ark. [142] fare embriyonunun periferik ve merkezi sinir sisteminin GnRH salınımı yapan hücrelerinin alındığı bölgeye göre nestin ekspresyonunun değiştiği göstermişlerdir. Çalışmada prenatal farelerin nazal plakodunda nestin ekspresyonunun olduğu saptanmıştır. Hücrelerin bazıları GnRH ile birlikte nestin ekspresyonunu sağlamıştır. Çalışmamızda ACh artışının GnRH mRNA ekspresyon artışını istatistiksel olarak desteklememiş olsa da nestinin GnRH nöronları için de fonksiyonel olduğu görülmektedir.

Luo J ve ark. [143] NGF'nin hipogonadizmdeki rolünü farelerde incelemişlerdir. NGF uygulanması, serum LH, FSH, testosteron ve intratestiküler testosteron konsantrasyonlarında önemli bir artışa neden olmuştur. Gonadal hormonlardaki yükselmeye birlikte, boşalma gecikmesi ve boşalma süreleri dahil olmak üzere bozuk cinsel davranışların tümünün kontrol hayvanının seviyelerine geri yükseldiğini göstermişlerdir. Bu sonuçlar NGF'nin intranazal uygulamasının seks hormonlarını ve cinsel davranışları normalleştirebileceğini göstermiştir. Ayrıca NGF'nin hipotalamustaki GnRH nöronları üzerinde etki edip etmediğini doğrulamak için, farelerin preoptik alan (POA) ve medial bazal hipotalamus (MBH) hipotalamus eksplantlarını kullanmışlardır ve NGF'nin GnRH salınımını önemli ölçüde arttırdığını göstermişlerdir. Ek olarak, hipotalamusta GnRH ekspresyonunu analiz etmişlerdir. Sonuçlar, GnRH

ekspresyonunun NGF uygulamasından sonra önemli ölçüde up regüle olduğunu gösterilmiştir. Bu veriler ile NGF'nin GnRH nöronlarını aktive ederek ve GnRH salınımını artırarak LH ve testosteron salgılanmasını desteklediğini ileri sürmüşlerdir. Çalışmamızda özellikle artan ACh konsantrasyonunda NGF ekspresyonu ciddi oranda artmıştır. Bununla beraber GnRH ekspresyonu da artmıştır. Burada bu sorunun yanıtı aranmalıdır. ACh'in aktivasyonu ile artan NGF'ni GnRH ekspresyonunu artırmaktadır?

Sánchez C ve ark. [144] GnRH analoglarının insan prostat adenokarsinomundan alınan primer hücre kültürlerinde TrkA ve p75 nörotrofin reseptörlerinin ekspresyonu üzerindeki etkisini araştırmışlardır. GnRH analoglarının proliferatif ve apoptotik aktiviteler üzerindeki etkisini doğrulamak için, prostat kanserinden aldıkları primer hücre kültürleri, leuprolid ve NGF varlığında veya yokluğunda cetrorelix ile tedavi etmişlerdir. Beklendiği gibi, GnRH'nin hem agonisti hem de antagonisti, hücre sayısında bir azalmayı ve apoptotik hücrelerde bir artışı etkili bir şekilde indüklediğini görmüşlerdir. Cetrorelix, leuprolide göre biraz daha yüksek bir etki gösterdiğini ve GnRH etkilerinin NGF varlığında daha belirgin olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışma NGF ve GnRH'nin birlikte hareket ettiğine dair başka bir kanıt sunmaktadır. Çalışmamızda özellikle artan ACh konsantrasyonunda NGF ekspresyonu ciddi oranda artmıştır. Bununla beraber GnRH ekspresyonu da artmıştır. Yukarıdaki iki kanıta göre burada bu sorunun yanıtı aranmalıdır. ACh'in aktivasyonu ile artan NGF'ni GnRH ekspresyonunu artırmaktadır?

Yumurtalığın işleyişi, steroid sekresyonunu, foliküler gelişim ve yumurtlamanın düzenlenmesi otonomik sistemden etkilenir. NGF, yumurtalık noradrenerjik nöronları ve merkezi sinir sistemindeki kolinerjik nöronları düzenlediği bulunan ilk nörotrofik faktördü. Benitez A ve ark. [145] bunla ilgili yaptıkları çalışmada amacı, NGF'nin in vivo olarak overin sempatik ve kolinerjik sisteminin aktivasyonuna katılan nörotrofik faktörlerden biri olup olmadığını ve normal veya patolojik durumlar sırasında foliküler gelişimdeki rolünü belirlemeyi amaçlamışlardır. Estrojen analogu estradiol valeratın sıçanlarda polikistik over modelinde uygulamasının, NGF'ye bağlı bir mekanizma yoluyla ACh seviyelerini arttırdığını bulmuşlardır. Sıçanlarında NGF'nin yumurtalık içine uygulanması, enzim aktivitesini etkilemeden tirozin hidroksilaz ve asetilkolinesteraz ekspresyonunu arttırdığı, yumurtalık ACh seviyelerini düşürdüğü gösterilmiştir. Bunun aksine yumurtalık hücrelerinin NGF'ye in vitro maruz kalması hem kolin asetil transferazı hem de veziküler ACh taşıyıcı ekspresyonunu arttırmış, Bu çalışmanın sonuçlarımızla ilgili en önemli bulgusu NGF'nin ACh üretimini uyarmasıdır.

Genel olarak, NGF'nin, yumurtalık fonksiyonunu düzenlemek için sempatik ve kolinerjik sistemlerin çıktısını dengeleyerek, ikili otonomik kontrol sisteminde homeostazi sürdürmede kilit bir faktör olduğu görülmektedir. Bu sonuçlara ek olarak sonuçlarımız da NGF'nin üreme ve gelişme ile ilgili önemli rollerini işaret etmektedir.

GDNF, periferik sinir sistemindeki iskelet kası dahil nöronal hedef dokular tarafından sentezlenir ve salgılanır; Vianney JM ve ark. [146] ACh uygulamasını takiben elektrik stimülasyonunda iskelet kası miyotüpleri tarafından GDNF üretimi incelenmiştir. Sonuçlar, ACh ve kısa süreli elektrik stimülasyonunun GDNF salgılanmasını azalttığını, karbakol veya uzun süreli elektrik stimülasyonu ile tedavinin ise iskelet kası tarafından GDNF üretimini arttırdığını göstermektedir. Ek bir sinir büyüme faktörü uygulamasının ACh doku seviyeleri üzerinde hiçbir etkisi olmamıştır, bu da sinir büyüme faktörünün ACh sentezini doğrudan artırmadığını düşündürmektedir. Çalışmamızda iskelet kası hücrelerinden farklı olarak nöron özelliklerine sahip hücreler kullanılmıştır. Hücreler 24 saat süre için ACh uyarımına maruz bırakılmıştır ayrıca elektrik stimülasyonu gibi ikinci bir uyarıcı kullanılmamıştır. Buna göre karbakol ile miyotüplerde elde edilen artış çalışmamızda ACh ile özellikle artan konsantrasyonlarda GT1-7 hücrelerinde görülmüştür.

Trofik faktörler, in vivo ve in vitro olarak striatumdaki kolinerjik internöronların hayatta kalmasında ve sinir lifi büyümesinde önemli rol oynar. Fischer HP ve ark. [147] sinir büyüme faktörü ve yeni faktörlerin glial hücre dizisinden türetilen nörotrofik faktör GDNF ve nörtürinin yanı sıra diğer trofik faktörlerin striatal ACh doku seviyeleri üzerindeki etkilerini araştırmak için organotipik bir dilim modeli kullanmışlardır. Çalışmalarında tek başına bir nörotrofik faktörün ACh seviyelerinde değişikliğe neden olmadığını bildirmişlerdir. Başka bir sonuçta bu durumu desteklemektedir. Yapılan çalışmada Glial hücre dizisinden türetilen nörotrofik faktör GDNF'nin, gelişmekte olan ve erişkin nöromüsküler kavşakta asetilkolin salınımını akut olarak değiştirmedikini göstermektedir [148]. Bu sonuçlar GDNF'nin ACh ekspresyonuna etkisini bildirmektedir fakat çalışmamızda ilk defa bu trofik faktörün ACh stimülasyonu sonucu ekspresyonu değerlendirilmiştir. Her ne kadar GDNF uygulaması ACh ekspresyonuna etki etmese de sonuçlarımıza göre ACh uygulaması GDNF ekspresyonunda 10 ve 100 µM konsantrasyonda artışa neden olmaktadır.

Kolinerjik reseptör uyarım ve blokajında β -Tubulin III ekspresyonunun nasıl etkilendiğine yönelik bilgi mevcut değildir. Çalışmamızda bununla ilgili ilk veriler sunulmuştur. Çok yüksek katsayılarla olmasa da ekspresyonunda artış gerçekleşmiştir.

Çalışmamızın sonuçlarına göre kolinerjik reseptörlerin GnRH ekspresyonu üzerine etkisi bulunmaktadır. Bu etki ACh stimölasyon ile artış meydana getirmekte fakat atropin blokajı ile belirgin bir değışiklik oluşturmamaktadır. Ayrıca nöronal faktörlerin de kolinerjik sistemin uyarımı ile arttığı görölmektedir. Ek olarak bu artış GnRH artışı ile paraleldir. Bu nedenle sonuçlarımız ve diğer çalışmalara ait sonuçlar nöronal faktörler ile GnRH ekspresyonu arasında bir ilişkinin varlığını ve bu ilişkilerin kolinerjik sistem aktivasyonu ile arttığını işaret etmektedir. Bununla beraber sonuçlarımız kolinerjik sistemin uyarımı ile artan nöronal faktörlerin mi GnRH ekspresyon artışını sağladığı veya farklı mekanizmaların mı aktif rol oynadığı sorularının ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bu soruların yanıtları için özellikle *in vitro* çalışmalar tasarlanmalı ve mekanizmalar araştırılmalıdır.

5. KAYNAKLAR

- [1]. Schally, A.V., *Use of GnRH in preference to LH-RH terminology in scientific papers*. Hum Reprod, 2000. **15**(9): p. 2059-61.
- [2]. Baba, Y., H. Matsuo, and A.V. Schally, *Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. II. Confirmation of the proposed structure by conventional sequential analyses*. Biochem Biophys Res Commun, 1971. **44**(2): p. 459-63.
- [3]. Schally, A.V., et al., *Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones*. Science, 1971. **173**(4001): p. 1036-8.
- [4]. Mellon, P.L., et al., *Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis*. Neuron, 1990. **5**(1): p. 1-10.
- [5]. Wetsel, W.C., et al., *Metabolism of pro-luteinizing hormone-releasing hormone in immortalized hypothalamic neurons*. Endocrinology, 1991. **129**(3): p. 1584-95.
- [6]. Whyte, D.B., et al., *A neuron-specific enhancer targets expression of the gonadotropin-releasing hormone gene to hypothalamic neurosecretory neurons*. Mol Endocrinol, 1995. **9**(4): p. 467-77.
- [7]. Bloem, B., R.B. Poorthuis, and H.D. Mansvelder, *Cholinergic modulation of the medial prefrontal cortex: the role of nicotinic receptors in attention and regulation of neuronal activity*. Front Neural Circuits, 2014. **8**: p. 17.
- [8]. Caksen, H., et al., *Deadly nightshade (Atropa belladonna) intoxication: an analysis of 49 children*. Hum Exp Toxicol, 2003. **22**(12): p. 665-8.
- [9]. Xiao, N. and Q.-T. Le, *Neurotrophic Factors and Their Potential Applications in Tissue Regeneration*. Archivum immunologiae et therapiae experimentalis, 2016. **64**(2): p. 89-99.
- [10]. Maggi, R., et al., *GnRH and GnRH receptors in the pathophysiology of the human female reproductive system*. Hum Reprod Update, 2016. **22**(3): p. 358-81.
- [11]. Tzoupis, H., et al., *Gonadotropin-Releasing Hormone and GnRH Receptor: Structure, Function and Drug Development*. Curr Med Chem, 2020. **27**(36): p. 6136-6158.
- [12]. Ortmann, O., J.M. Weiss, and K. Diedrich, *Gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) and GnRH agonists: mechanisms of action*. Reprod Biomed Online, 2002. **5 Suppl 1**: p. 1-7.

- [13]. Stamatiades, G.A. and U.B. Kaiser, *Gonadotropin regulation by pulsatile GnRH: Signaling and gene expression*. Mol Cell Endocrinol, 2018. **463**: p. 131-141.
- [14]. Gobello, C., *New GnRH analogs in canine reproduction*. Anim Reprod Sci, 2007. **100**(1-2): p. 1-13.
- [15]. Comminos, A.N., C.N. Jayasena, and W.S. Dhillon, *The relationship between gut and adipose hormones, and reproduction*. Hum Reprod Update, 2014. **20**(2): p. 153-74.
- [16]. Stamatiades, G.A., R.S. Carroll, and U.B. Kaiser, *GnRH-A Key Regulator of FSH*. Endocrinology, 2019. **160**(1): p. 57-67.
- [17]. LIPOSITS, Z., et al., *Morphological Characterization of Immortalized Hypothalamic Neurons Synthesizing Luteinizing Hormone-Releasing Hormone*. Endocrinology, 1991. **129**(3): p. 1575-1583.
- [18]. Mason, A.J., et al., *A deletion truncating the gonadotropin-releasing hormone gene is responsible for hypogonadism in the hpg mouse*. Science, 1986. **234**(4782): p. 1366-71.
- [19]. Seeburg, P.H. and J.P. Adelman, *Characterization of cDNA for precursor of human luteinizing hormone releasing hormone*. Nature, 1984. **311**(5987): p. 666-668.
- [20]. Mason, A.J., et al., *The hypogonadal mouse: reproductive functions restored by gene therapy*. Science, 1986. **234**(4782): p. 1372-8.
- [21]. Kanasaki, H., et al., *How is GnRH regulated in GnRH-producing neurons? Studies using GT1-7 cells as a GnRH-producing cell model*. Gen Comp Endocrinol, 2017. **247**: p. 138-142.
- [22]. Wetsel, W.C., *Immortalized hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons: a new tool for dissecting the molecular and cellular basis of LHRH physiology*. Cell Mol Neurobiol, 1995. **15**(1): p. 43-78.
- [23]. Loikkanen, J., et al., *Glutamate increases toxicity of inorganic lead in GT1-7 neurons: partial protection induced by flunarizine*. Arch Toxicol, 2003. **77**(12): p. 663-71.
- [24]. Korsching, S. and H. Thoenen, *Nerve growth factor in sympathetic ganglia and corresponding target organs of the rat: correlation with density of sympathetic innervation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(11): p. 3513-6.
- [25]. Beltrán-Parrázal, L., et al., *GABA inhibition of immortalized gonadotropin-releasing hormone neuronal excitability involves GABA(A) receptors negatively coupled to cyclic adenosine monophosphate formation*. Endocrine, 2001. **14**(2): p. 189-95.
- [26]. Chen, T., et al., *p53 Mediates GnRH Secretion via Lin28/let-7 System in GT1-7 Cells*. Diabetes Metab Syndr Obes, 2020. **13**: p. 4681-4688.

- [27]. Li, H., et al., *MiR-375 potentially enhances GnRH expression by targeting Sp1 in GT1-7 cells*. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2021. **57**(4): p. 438-447.
- [28]. Gregory, L.C., et al., *The phenotypic spectrum associated with OTX2 mutations in humans*. *Eur J Endocrinol*, 2021. **185**(1): p. 121-135.
- [29]. Liu, S., *Neurotrophic factors in enteric physiology and pathophysiology*. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 2018. **30**(10): p. e13446-e13446.
- [30]. Rosser, A. and C.N. Svendsen, *Stem cells for cell replacement therapy: a therapeutic strategy for HD?* *Mov Disord*, 2014. **29**(11): p. 1446-54.
- [31]. de Munter, J.P., E. Melamed, and E. Wolters, *Stem cell grafting in parkinsonism--why, how and when*. *Parkinsonism Relat Disord*, 2014. **20 Suppl 1**: p. S150-3.
- [32]. Heese, K., J.W. Low, and N. Inoue, *Nerve growth factor, neural stem cells and Alzheimer's disease*. *Neurosignals*, 2006. **15**(1): p. 1-12.
- [33]. Xie, Y., et al., *Transport of nerve growth factor encapsulated into liposomes across the blood-brain barrier: in vitro and in vivo studies*. *J Control Release*, 2005. **105**(1-2): p. 106-19.
- [34]. Korsching, S. and H. Thoenen, *Nerve growth factor in sympathetic ganglia and corresponding target organs of the rat: correlation with density of sympathetic innervation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1983. **80**(11): p. 3513-3516.
- [35]. Shooter, E.M., *Early days of the nerve growth factor proteins*. *Annu Rev Neurosci*, 2001. **24**: p. 601-29.
- [36]. Luo, J., et al., *NGF Rescues Spermatogenesis in Azoospermic Mice*. *Reprod Sci*, 2021. **28**(10): p. 2780-2788.
- [37]. Rocco, M.L., L. Calzà, and L. Aloe, *NGF and Retinitis Pigmentosa: Structural and Molecular Studies*. *Adv Exp Med Biol*, 2021. **1331**: p. 255-263.
- [38]. Ferlini, C., et al., *Looking at drug resistance mechanisms for microtubule interacting drugs: does TUBB3 work?* *Curr Cancer Drug Targets*, 2007. **7**(8): p. 704-12.
- [39]. De Gendt, K., et al., *Expression of Tubb3, a beta-tubulin isotype, is regulated by androgens in mouse and rat Sertoli cells*. *Biol Reprod*, 2011. **85**(5): p. 934-45.
- [40]. Sullivan, K.F. and D.W. Cleveland, *Identification of conserved isotype-defining variable region sequences for four vertebrate beta tubulin polypeptide classes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. **83**(12): p. 4327-31.
- [41]. Ranganathan, S., et al., *Cloning and sequencing of human betaIII-tubulin cDNA: induction of betaIII isotype in human prostate carcinoma cells by acute*

- exposure to antimicrotubule agents. Biochim Biophys Acta*, 1998. **1395**(2): p. 237-45.
- [42]. Venter, J.C., *Identification of new human receptor and transporter genes by high throughput cDNA (EST) sequencing. J Pharm Pharmacol*, 1993. **45 Suppl 1**: p. 355-60.
 - [43]. Sieber-Blum, M., et al., *Characterization of epidermal neural crest stem cell (EPI-NCSC) grafts in the lesioned spinal cord. Mol Cell Neurosci*, 2006. **32**(1-2): p. 67-81.
 - [44]. Bergsland, M., et al., *The establishment of neuronal properties is controlled by Sox4 and Sox11. Genes Dev*, 2006. **20**(24): p. 3475-86.
 - [45]. Raspaglio, G., et al., *Hypoxia induces class III beta-tubulin gene expression by HIF-1alpha binding to its 3' flanking region. Gene*, 2008. **409**(1-2): p. 100-8.
 - [46]. Akalovich, S., et al., *5-FU resistant colorectal cancer cells possess improved invasiveness and β (III)-tubulin expression. Exp Oncol*, 2021. **43**(2): p. 111-117.
 - [47]. Rodrigues-Amorim, D., et al., *Plasma β -III tubulin, neurofilament light chain and glial fibrillary acidic protein are associated with neurodegeneration and progression in schizophrenia. Sci Rep*, 2020. **10**(1): p. 14271.
 - [48]. Na, H.Y., et al., *Expression of Class III Beta-Tubulin Is Associated with Invasive Potential and Poor Prognosis in Thyroid Carcinoma. J Clin Med*, 2020. **9**(12).
 - [49]. Gu  rette, D., et al., *Molecular evolution of type VI intermediate filament proteins. BMC Evol Biol*, 2007. **7**: p. 164.
 - [50]. Steinert, P.M., et al., *A high molecular weight intermediate filament-associated protein in BHK-21 cells is nestin, a type VI intermediate filament protein. Limited co-assembly in vitro to form heteropolymers with type III vimentin and type IV alpha-internexin. J Biol Chem*, 1999. **274**(14): p. 9881-90.
 - [51]. Michalczyk, K. and M. Ziman, *Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. Histol Histopathol*, 2005. **20**(2): p. 665-71.
 - [52]. Sahlgren, C.M., et al., *Cdk5 regulates the organization of Nestin and its association with p35. Mol Cell Biol*, 2003. **23**(14): p. 5090-106.
 - [53]. Szymańska-Chabowska, A., et al., *Nestin Expression as a Diagnostic and Prognostic Marker in Colorectal Cancer and Other Tumors. Clin Med Insights Oncol*, 2021. **15**: p. 11795549211038256.
 - [54]. Tampakis, A., et al., *Nestin and CD34 expression in colorectal cancer predicts improved overall survival. Acta Oncol*, 2021. **60**(6): p. 727-734.
 - [55]. Lv, J., et al., *Nestin is essential for cellular redox homeostasis and gastric cancer metastasis through the mediation of the Keap1-Nrf2 axis. Cancer Cell Int*, 2021. **21**(1): p. 603.

- [56]. Chen, H., et al., *Targeting Nestin(+) hepatic stellate cells ameliorates liver fibrosis by facilitating T β RI degradation*. J Hepatol, 2021. **74**(5): p. 1176-1187.
- [57]. Engele, J., D. Schubert, and M.C. Bohn, *Conditioned media derived from glial cell lines promote survival and differentiation of dopaminergic neurons in vitro: role of mesencephalic glia*. J Neurosci Res, 1991. **30**(2): p. 359-71.
- [58]. Chang, H.M., et al., *Neurotrophins and glial cell line-derived neurotrophic factor in the ovary: physiological and pathophysiological implications*. Hum Reprod Update, 2019. **25**(2): p. 224-242.
- [59]. Trupp, M., et al., *Multiple GPI-anchored receptors control GDNF-dependent and independent activation of the c-Ret receptor tyrosine kinase*. Mol Cell Neurosci, 1998. **11**(1-2): p. 47-63.
- [60]. Barker, R.A., et al., *GDNF and Parkinson's Disease: Where Next? A Summary from a Recent Workshop*. J Parkinsons Dis, 2020. **10**(3): p. 875-891.
- [61]. Behl, T., et al., *Gene Therapy in the Management of Parkinson's Disease: Potential of GDNF as a Promising Therapeutic Strategy*. Curr Gene Ther, 2020. **20**(3): p. 207-222.
- [62]. Chu, Y. and J.H. Kordower, *GDNF signaling in subjects with minimal motor deficits and Parkinson's disease*. Neurobiol Dis, 2021. **153**: p. 105298.
- [63]. Chen, C., et al., *Non-toxic HSC Transplantation-Based Macrophage/Microglia-Mediated GDNF Delivery for Parkinson's Disease*. Mol Ther Methods Clin Dev, 2020. **17**: p. 83-98.
- [64]. Sharif, M., M. Noroozian, and F. Hashemian, *Do serum GDNF levels correlate with severity of Alzheimer's disease?* Neurol Sci, 2021. **42**(7): p. 2865-2872.
- [65]. English, B.A. and C.K. Jones, *Chapter 14 - Cholinergic Neurotransmission*, in *Primer on the Autonomic Nervous System (Third Edition)*, D. Robertson, et al., Editors. 2012, Academic Press: San Diego. p. 71-74.
- [66]. Everitt, B.J. and T.W. Robbins, *Central cholinergic systems and cognition*. Annu Rev Psychol, 1997. **48**: p. 649-84.
- [67]. Sarter, M., et al., *Unraveling the attentional functions of cortical cholinergic inputs: interactions between signal-driven and cognitive modulation of signal detection*. Brain research. Brain research reviews, 2004. **48**(1): p. 98-111.
- [68]. Sarter, M., B. Givens, and J.P. Bruno, *The cognitive neuroscience of sustained attention: where top-down meets bottom-up*. Brain Res Brain Res Rev, 2001. **35**(2): p. 146-60.
- [69]. Bentley, P., et al., *Cholinergic enhancement modulates neural correlates of selective attention and emotional processing*. Neuroimage, 2003. **20**(1): p. 58-70.

- [70]. Buschman, T.J. and E.K. Miller, *Top-down versus bottom-up control of attention in the prefrontal and posterior parietal cortices*. Science, 2007. **315**(5820): p. 1860-2.
- [71]. Luck, S.J. and S.P. Vecera, *Attention*, in *Steven's handbook of experimental psychology: Sensation and perception*, Vol. 1, 3rd ed. 2002, John Wiley & Sons Inc: Hoboken, NJ, US. p. 235-286.
- [72]. Shah, N., et al., *Muscarinic receptors and ligands in cancer*. Am J Physiol Cell Physiol, 2009. **296**(2): p. C221-32.
- [73]. Ballard, C.G., et al., *Cholinesterases: roles in the brain during health and disease*. Curr Alzheimer Res, 2005. **2**(3): p. 307-18.
- [74]. Arai, Y., et al., *Subunit profiling and functional characteristics of acetylcholine receptors in GT1-7 cells*. J Physiol Sci, 2017. **67**(2): p. 313-323.
- [75]. Perry, E., et al., *Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness?* Trends Neurosci, 1999. **22**(6): p. 273-80.
- [76]. Bartus, R.T., et al., *The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction*. Science, 1982. **217**(4558): p. 408-14.
- [77]. Gorsky, M., et al., *The efficacy of pilocarpine and bethanechol upon saliva production in cancer patients with hyposalivation following radiation therapy*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2004. **97**(2): p. 190-5.
- [78]. Kreienbaum, M.A. and D.P. Page, *Stability of pilocarpine hydrochloride and pilocarpine nitrate ophthalmic solutions submitted by U.S. hospitals*. Am J Hosp Pharm, 1986. **43**(1): p. 109-17.
- [79]. Wiseman, L.R. and D. Faulds, *Oral pilocarpine: a review of its pharmacological properties and clinical potential in xerostomia*. Drugs, 1995. **49**(1): p. 143-55.
- [80]. Hawthorne, M. and K. Sullivan, *Pilocarpine for radiation-induced xerostomia in head and neck cancer*. Int J Palliat Nurs, 2000. **6**(5): p. 228-32.
- [81]. Ferguson, M.M., *Pilocarpine and other cholinergic drugs in the management of salivary gland dysfunction*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1993. **75**(2): p. 186-91.
- [82]. Kim, S., et al., *PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces*. Nucleic Acids Research, 2021. **49**(D1): p. D1388-D1395.
- [83]. Sanders, K.M., et al., *Anoctamins and gastrointestinal smooth muscle excitability*. Exp Physiol, 2012. **97**(2): p. 200-6.
- [84]. Jin, Z., *Muscarine, imidazole, oxazole, and thiazole alkaloids*. Natural product reports, 2011. **28**(6): p. 1143-1191.

- [85]. Rosecrans, J.A. and R. Young, *Discriminative Stimulus Properties of S(-)-Nicotine: "A Drug for All Seasons"*. Curr Top Behav Neurosci, 2018. **39**: p. 51-94.
- [86]. Trevor, A.J., B.G. Katzung, and S.B. Masters, *Basic & clinical pharmacology*. 2009; McGraw-Hill Medical.
- [87]. Hamel, A.G. and M.W. Recker, *Neostigmine Hyperinflation*. J Pharm Pract, 2018. **31**(4): p. 395-398.
- [88]. Srivastava, A. and J.M. Hunter, *Reversal of neuromuscular block*. Br J Anaesth, 2009. **103**(1): p. 115-29.
- [89]. McLean, D.J., et al., *Dose-dependent Association between Intermediate-acting Neuromuscular-blocking Agents and Postoperative Respiratory Complications*. Anesthesiology, 2015. **122**(6): p. 1201-13.
- [90]. Mantegazza, R., et al., *Current and emerging therapies for the treatment of myasthenia gravis*. Neuropsychiatr Dis Treat, 2011. **7**: p. 151-60.
- [91]. Katz, N.K. and R.J. Barohn, *The history of acetylcholinesterase inhibitors in the treatment of myasthenia gravis*. Neuropharmacology, 2021. **182**: p. 108303.
- [92]. Ing, E.B., et al., *The complication rate of edrophonium testing for suspected myasthenia gravis*. Can J Ophthalmol, 2000. **35**(3): p. 141-4; discussion 145.
- [93]. Camps, P. and D. Muñoz-Torrero, *Cholinergic drugs in pharmacotherapy of Alzheimer's disease*. Mini Rev Med Chem, 2002. **2**(1): p. 11-25.
- [94]. Khoury, R., J. Rajamanickam, and G.T. Grossberg, *An update on the safety of current therapies for Alzheimer's disease: focus on rivastigmine*. Ther Adv Drug Saf, 2018. **9**(3): p. 171-178.
- [95]. Winblad, B., et al., *IDEAL: a 6-month, double-blind, placebo-controlled study of the first skin patch for Alzheimer disease*. Neurology, 2007. **69**(4 Suppl 1): p. S14-22.
- [96]. Inglis, F., *The tolerability and safety of cholinesterase inhibitors in the treatment of dementia*. Int J Clin Pract Suppl, 2002(127): p. 45-63.
- [97]. Kwakye, G.F., et al., *Atropa belladonna neurotoxicity: Implications to neurological disorders*. Food Chem Toxicol, 2018. **116**(Pt B): p. 346-353.
- [98]. Renner, U.D., R. Oertel, and W. Kirch, *Pharmacokinetics and pharmacodynamics in clinical use of scopolamine*. Therapeutic drug monitoring, 2005. **27**(5): p. 655-665.
- [99]. Lakstygal, A.M., et al., *DARK Classics in Chemical Neuroscience: Atropine, Scopolamine, and Other Anticholinergic Deliriant Hallucinogens*. ACS Chem Neurosci, 2019. **10**(5): p. 2144-2159.

- [100]. Tytgat, G.N., *Hyoscine butylbromide: a review of its use in the treatment of abdominal cramping and pain*. *Drugs*, 2007. **67**(9): p. 1343-57.
- [101]. Samuels, L.A., et al., *The effect of hyoscine butylbromide on the first stage of labour in term pregnancies*. *Bjog*, 2007. **114**(12): p. 1542-6.
- [102]. Carmine, A.A. and R.N. Brogden, *Pirenzepine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in peptic ulcer disease and other allied diseases*. *Drugs*, 1985. **30**(2): p. 85-126.
- [103]. Miyazawa, A., Y. Fujiyoshi, and N. Unwin, *Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore*. *Nature*, 2003. **423**(6943): p. 949-55.
- [104]. Albuquerque, E.X., et al., *Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function*. *Physiol Rev*, 2009. **89**(1): p. 73-120.
- [105]. Haga, T., *Molecular properties of muscarinic acetylcholine receptors*. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 2013. **89**(6): p. 226-56.
- [106]. Felder, C.C., et al., *Therapeutic opportunities for muscarinic receptors in the central nervous system*. *J Med Chem*, 2000. **43**(23): p. 4333-53.
- [107]. Caulfield, M.P. and N.J. Birdsall, *International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors*. *Pharmacol Rev*, 1998. **50**(2): p. 279-90.
- [108]. Krejčí, A., et al., *Regulation of signal transduction at M2 muscarinic receptor*. *Physiol Res*, 2004. **53 Suppl 1**: p. S131-40.
- [109]. van der Zee, E.A. and P.G. Luiten, *Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory*. *Prog Neurobiol*, 1999. **58**(5): p. 409-71.
- [110]. Bonner, T.I., *The molecular basis of muscarinic receptor diversity*. *Trends Neurosci*, 1989. **12**(4): p. 148-51.
- [111]. Bonner, T.I., *New subtypes of muscarinic acetylcholine receptors*. *Trends Pharmacol Sci*, 1989. **Suppl**: p. 11-5.
- [112]. Hulme, E.C., N.J. Birdsall, and N.J. Buckley, *Muscarinic receptor subtypes*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1990. **30**: p. 633-73.
- [113]. Khurana, S., et al., *Vasodilatory effects of cholinergic agonists are greatly diminished in aorta from M3R-/- mice*. *Eur J Pharmacol*, 2004. **493**(1-3): p. 127-32.
- [114]. Yamada, M., et al., *Cholinergic dilation of cerebral blood vessels is abolished in M(5) muscarinic acetylcholine receptor knockout mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(24): p. 14096-101.

- [115]. Felder, C.C., *Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors*. *Faseb j*, 1995. **9**(8): p. 619-25.
- [116]. Ishii, M. and Y. Kurachi, *Muscarinic acetylcholine receptors*. *Curr Pharm Des*, 2006. **12**(28): p. 3573-81.
- [117]. Bonner, T.I., et al., *Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes*. *Science*, 1987. **237**(4814): p. 527-32.
- [118]. Bonner, T.I., et al., *Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes*. *Neuron*, 1988. **1**(5): p. 403-10.
- [119]. Eglen, R.M., S.S. Hegde, and N. Watson, *Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function*. *Pharmacol Rev*, 1996. **48**(4): p. 531-65.
- [120]. Peralta, E.G., et al., *Distinct primary structures, ligand-binding properties and tissue-specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors*. *The EMBO journal*, 1987. **6**(13): p. 3923-3929.
- [121]. Scarpero, H.M. and R.R. Dmochowski, *Muscarinic receptors: what we know*. *Curr Urol Rep*, 2003. **4**(6): p. 421-8.
- [122]. van Zwieten, P.A. and H.N. Doods, *Muscarinic receptors and drugs in cardiovascular medicine*. *Cardiovasc Drugs Ther*, 1995. **9**(1): p. 159-67.
- [123]. Nathanson, N.M., *A multiplicity of muscarinic mechanisms: enough signaling pathways to take your breath away*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000. **97**(12): p. 6245-6247.
- [124]. Eglen, R.M. and S.R. Nahorski, *The muscarinic M(5) receptor: a silent or emerging subtype?* *British journal of pharmacology*, 2000. **130**(1): p. 13-21.
- [125]. Wu, J., et al., *Brain Imaging of Nicotinic Receptors in Alzheimer's Disease*. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2010. **2010**: p. 548913.
- [126]. Taly, A., et al., *Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system*. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2009. **8**(9): p. 733-750.
- [127]. Lukas, R.J., et al., *International Union of Pharmacology. XX. Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits*. *Pharmacol Rev*, 1999. **51**(2): p. 397-401.
- [128]. Gotti, C. and F. Clementi, *Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology*. *Prog Neurobiol*, 2004. **74**(6): p. 363-96.
- [129]. Clarke, P.B., et al., *Nicotinic binding in rat brain: autoradiographic comparison of [3H]acetylcholine, [3H]nicotine, and [125I]-alpha-bungarotoxin*. *J Neurosci*, 1985. **5**(5): p. 1307-15.
- [130]. Sahin, M., W.D. Bowen, and J.P. Donoghue, *Location of nicotinic and muscarinic cholinergic and mu-opiate receptors in rat cerebral neocortex: evidence from thalamic and cortical lesions*. *Brain Res*, 1992. **579**(1): p. 135-47.

- [131]. Clarke, P.B., *Nicotinic modulation of thalamocortical neurotransmission*. Prog Brain Res, 2004. **145**: p. 253-60.
- [132]. Hulme, E.C., *Muscarinic acetylcholine receptors: typical G-coupled receptors*. Symp Soc Exp Biol, 1990. **44**: p. 39-54.
- [133]. Lebbe, E.K., et al., *Conotoxins targeting nicotinic acetylcholine receptors: an overview*. Mar Drugs, 2014. **12**(5): p. 2970-3004.
- [134]. Fasoli, F. and C. Gotti, *Structure of neuronal nicotinic receptors*. Curr Top Behav Neurosci, 2015. **23**: p. 1-17.
- [135]. Spergel, D.J., *Modulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Neuron Activity and Secretion in Mice by Non-peptide Neurotransmitters, Gasotransmitters, and Gliotransmitters*. Front Endocrinol (Lausanne), 2019. **10**: p. 329.
- [136]. Krsmanovic, L.Z., et al., *Muscarinic regulation of intracellular signaling and neurosecretion in gonadotropin-releasing hormone neurons*. Endocrinology, 1998. **139**(10): p. 4037-43.
- [137]. Alizadeh Yegani, A., et al., *Biological behaviors of muscarinic receptors in mesenchymal stem cells derived from human placenta and bone marrow*. Iran J Basic Med Sci, 2020. **23**(1): p. 124-132.
- [138]. Richardson, S.B., J.A. Prasad, and C.S. Hollander, *Acetylcholine, melatonin, and potassium depolarization stimulate release of luteinizing hormone-releasing hormone from rat hypothalamus in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(8): p. 2686-9.
- [139]. Morales, A., et al., *Estradiol modulates acetylcholine-induced Ca²⁺ signals in LHRH-releasing GT1-7 cells through a membrane binding site*. Eur J Neurosci, 2003. **18**(9): p. 2505-14.
- [140]. Morales, A., et al., *Rapid modulatory effect of estradiol on acetylcholine-induced Ca²⁺ signal is mediated through cyclic-GMP cascade in LHRH-releasing GT1-7 cells*. Eur J Neurosci, 2005. **22**(9): p. 2207-15.
- [141]. Romanelli, R.G., et al., *Expression and function of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor in human olfactory GnRH-secreting neurons: an autocrine GnRH loop underlies neuronal migration*. J Biol Chem, 2004. **279**(1): p. 117-26.
- [142]. Kramer, P.R. and S. Wray, *Midline nasal tissue influences nestin expression in nasal-placode-derived luteinizing hormone-releasing hormone neurons during development*. Dev Biol, 2000. **227**(2): p. 343-57.
- [143]. Luo, J., et al., *Nasal delivery of nerve growth factor rescue hypogonadism by up-regulating GnRH and testosterone in aging male mice*. EBioMedicine, 2018. **35**: p. 295-306.

- [144]. Sánchez, C., et al., *Effect of GnRH analogs on the expression of TrkA and p75 neurotrophin receptors in primary cell cultures from human prostate adenocarcinoma*. Prostate, 2005. **65**(3): p. 195-202.
- [145]. Benitez, A., et al., *Nerve Growth Factor: A Dual Activator of Noradrenergic and Cholinergic Systems of the Rat Ovary*. Front Endocrinol (Lausanne), 2021. **12**: p. 636600.
- [146]. Vianney, J.M., D.A. Miller, and J.M. Spitsbergen, *Effects of acetylcholine and electrical stimulation on glial cell line-derived neurotrophic factor production in skeletal muscle cells*. Brain Res, 2014. **1588**: p. 47-54.
- [147]. Fischer, H.P., et al., *NGF but not GDNF or neurturin enhance acetylcholine tissue levels in striatal organotypic brain slices*. Int J Dev Neurosci, 1998. **16**(5): p. 391-401.
- [148]. Garcia, N., et al., *The glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) does not acutely change acetylcholine release in developing and adult neuromuscular junction*. Neurosci Lett, 2010. **480**(2): p. 127-31.

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Hilal DOLAS ÜREN

Eğitim Durumu

İlköğretim : Hacıkura İlköğretim Okulu – Alanya, 2009

Lise : A. Fevzi Alaettinoğlu Anadolu Lisesi – Alanya, 2013

Lisans :Balıkesir Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü– Balıkesir, 2019

Projeler

“Salvia macrochlamys BOISS. ET KOTSCHY Elde Edilen Tirozinaz Aktivitesinin Araştırılması” Araştırmacı, TUBITAK 2209-A Üniversite Öğrencileri Yurt İçi Araştırma Projeleri (2018,2019)

“GT1-7 Hücre Hattında Muskarinik Reseptörlerin Uyarımı ve Blokajının GnRH İle Nöronal Faktörlerin Ekspresyonuna Etkisi” Araştırmacı, 2021-04-02-LTP02 (2021-Halen)

Yabancı Dil Bilgisi

İngilizce