

Nöroblastoma Hücre Kültüründe Glutamat Aracılı Oluşturulan Nörotoksositeye Oksitosinin Etkileri

Effects of Oxytocin on Glutamate Mediated Neurotoxicity in Neuroblastoma Cell Culture

Börte GÜRBÜZ ÖZGÜR¹, Kamil VURAL², Mehmet İbrahim TUĞLU³

¹Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

²Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye

³Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada insan nöroblastoma SH-SY5Y hücre kültüründe glutamat ile oluşturulan nörotoksitede, oksitosinin nörit büyümesi, hücre canlılığı, hücre proliferasyonu ve apoptozise olan etkilerinin araştırılması ve olası nöroprotektif etkinliğinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Oksitosinin, glutamatın toksisitesi üzerine etkileri insan nöroblastoma SH-SY5Y hücre hattında Nörotoksosite Tarama Testi (NTT), apoptotik etkileri terminal deoksiniükleotidil transferaz kırık-uç işaretlenmesi (TUNEL) yöntemi ve hücre canlılık testi 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT) yöntemi ile incelendi. Nörotoksosite tarama testinde; hücre kültürüne glutamat 32 µM konsantrasyonunda eklenerek nörotoksosite oluşturuldu. Oksitosin 1, 3, 10, 30 ve 100 µM konsantrasyonlarında eklenerek nörit inhibisyonuna etkisi incelendi. Glutamat uygulamasının apoptozise neden olduğu TUNEL yöntemi ile gösterildi. Glutamat ile birlikte oksitosinin farklı dozlarda verildiğinde ortaya çıkan antiapoptotik etki apoptotik endeks ile değerlendirildi.

Bulgular: Glutamatın doz bağımlı nörotoksik etki gösterdiği ve 32 µM konsantrasyonda nörit uzamasını %50 oranında azalttığı saptandı. Glutamat ile oluşan nörit uzaması inhibisyonunun oksitosin uygulanarak doza bağımlı olarak azaldığı gösterildi. Özellikle oksitosinin 10 µM konsantrasyonlarından itibaren anlamlı olarak nörit inhibisyonunu azalttığı ve nöroprotektif etki gösterdiği tespit edildi. Hücre canlılık testi (MTT) sonucuna göre glutamatın hücre proliferasyonunu %50 azalttığı konsantrasyon 54 µM olarak belirlendi. Ardından oksitosin uygulaması ile glutamatın hücre proliferasyonuna olan olumsuz etkisini oksitosinin doza bağımlı olarak anlamlı olarak azalttığı görüldü.

Sonuç: Glutamatın farklı konsantrasyonlarda hücre çoğalması ve canlılığı üzerinde anlamlı toksik etkiye sahip olduğu; oksitosinin ise glutamat ile oluşan nörit inhibisyonunu azalttığı, nöroprotektif etkisi olduğu, hücre canlılığını artırdığı ve antiapoptotik etkilerinin olduğu gösterildi.

Anahtar Sözcükler: İn vitro, nöroprotektif, nörotoksosite, oksitosin, SY5Y

ABSTRACT

Introduction: We aimed to investigate the effects of oxytocin on neurite growth, cell viability, cell proliferation and apoptosis to demonstrate its neuroprotective effect on glutamate induced neurotoxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cell culture.

Method: The effect of oxytocin on the toxic effects of glutamate in human neuroblastoma SH-SY5Y cell line with the Neurotoxicity Screening Test (NTT), apoptotic effects by Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling (TUNEL) method and cell viability test by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) method. In the NTT test; Neurotoxicity was induced by adding glutamate at a concentration of 32 µM to the cell culture. Oxytocin was added at 1, 3, 10, 30 and 100 µM concentrations and its effect on neurite elongation was investigated. It was demonstrated by TUNEL method that application of glutamate caused apoptosis. Afterwards, when glutamate and different doses of oxytocin were given, antiapoptotic effect was evaluated with the apoptotic index.

Results: Glutamate was found to have a dose-dependent neurotoxic effect and reduced neurite elongation by 50% at a concentration of 32 µM. It was shown that the inhibition of neurite elongation caused by glutamate decreased in a dose-dependent manner by applying oxytocin. Especially oxytocin was found to significantly reduce neurite inhibition and show a neuroprotective effect starting from 10 µM concentrations. The concentration at which glutamate reduces cell proliferation by 50% was determined as 54 µM in MTT. Subsequently, it was observed that the adverse effect of glutamate on cell proliferation significantly decreased with oxytocin administration, depending on the dose.

Conclusion: It was found that different concentrations of glutamate have a significant toxic effect on cell proliferation and viability, glutamate inhibits neurite elongation in a dose-dependent manner; oxytocin reduces neurite inhibition caused by glutamate, has a neuroprotective effect, increases cell viability and has antiapoptotic effects.

Keywords: In vitro, neuroprotective, neurotoxicity, oxytocin, SY5Y

Cite this article as: Gürbüz Özgür B, Vural K, Tuğlu Mİ. Nöroblastoma Hücre Kültüründe Glutamat Aracılı Oluşturulan Nörotoksositeye Oksitosinin Etkileri. Arch Neuropsychiatry 2024;61:24–29.

GİRİŞ

Glutamat santral sinir sistemindeki en önemli eksitator nörotransmitterlerden biridir. Glutamat sadece nörotransmisyonunda değil, aynı zamanda nöral gelişim, sinaptik plastisite, hafıza ve öğrenme becerisi ile ilgili önemli rol oynar (1). Glutamat aynı zamanda önemli bir nörotoksindir. Hipoksik hasar, hipoglisemi, inme, epilepsi, depresyon ve parkinson ile ilişkili durumlarda glutamat reseptörlerinin aşırı uyarımı söz konusudur. Glutamatın nörotoksik etkisi birçok nörolojik ve psikiyatrik hastalık ile ilişkilendirilmiştir (2–5). Normal koşullar altında, glutamat beyin gelişimi sırasında hücrenin hayatta kalması, göçü ve farklılaşmasından sorumluyken aşırı miktarda glutamat oksidatif stres veya eksitotoksosite yoluyla nöronal hücre ölümüne yol açar (6). Otizmin patofizyolojisi ile ilişkilendirilen nörokimyasal anormalliklerden birinin gama aminobütirik asit (GABA) inhibisyonundaki baskılanma olduğu (7) ve bu baskılanmanın GABA sentezleyen glutamat dekarboksilazın ekspresyonundaki azalma nedeniyle olabileceği ileri sürülmüştür (8). Otizmlili bireylerin beyin dokularında glutamaterjik yolakla ilişkili eksitator aminoasit taşıyıcısı ve glutamat reseptörünü içeren birçok genin ekspresyonunda artış bildiren çalışmaların (9,10) yanı sıra otizmin hipoglutamaterjik bir bozukluk olduğu yönünde bulgular sunan çalışmalar da olduğu görülmektedir (11,12). Glutamatın nörotoksik etkisi nedeni ile nöron kültürü çalışmalarında nörotoksosite oluşturmak için glutamat kullanılmaktadır (13–15).

Nöropeptid bir hormon olan oksitosinin bağlanma, sosyal tanıma ve saldırganlık da dâhil olmak üzere karmaşık sosyal davranışlarda düzenleyici etkileri vardır. Ek olarak doğum ve laktasyonun nöroendokrin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (16). Oksitosinin sitoprotektif etkilerini antienflamatuvar, antiapoptotik ve antioksidan özellikleri aracılığı ile gösterdiğini ortaya koyan çalışmalar vardır (17,18). Glutamat ile oksitosin ilişkisi incelendiğinde, oksitosinin spinal kordda reseptörlerine bağlanarak glutamat seviyelerini azalttığı gösterilmiştir (19). Hücre canlılığı üzerine etkileri incelendiğinde oksitosinin hücre canlılığı ve nörit büyümesi üzerine olumlu etkileri bulunmuştur (20).

Bu çalışmanın amacı; glutamat uygulanarak oluşturulan nörotoksik etkiye karşı oksitosinin insan nöroblastoma hücre hattında etkilerini araştırmaktır.

YÖNTEM

Araştırmanın hipotezi "insan nöroblastoma hücre kültüründe glutamat aracılı oluşturulan nörotoksosite modelinde oksitosin nörotoksik etkileri azaltmaktadır" olarak belirlendi. Çalışma için etik kurul onayı Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Etik Kurulu'ndan 13/09/2017 tarih ve 20.478.486 karar numarası ile alındı. Çalışma Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2018–209 numaralı proje ile desteklendi.

Veri Toplama Araçları

Kullanılan hücre dizini İnsan Nöroblastoma hücre hattı SH-SY5Y'dir (American Type Culture Collection, USA) (ATCC CRL-2266). Glutamat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), oksitosin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), hücre kültürü medyum, fetal bovin serum, penisilin/streptomisin ve tripsin gibi reaktifler Gibco'dan (Invitrogen Inc., Grand Island, New York, USA) alındı.

Veri Toplama Yöntemi

Nörotoksosite Tarama Yöntemi

Hücre kültürü: SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri kültür ortamında (flask içinde) %10 fetal calf serum ve %1 penisilin/streptomisin solüsyonu (10000 U/10 mg) Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM): F12 ile proliferasyon medyumunu 37°C ve %5 CO₂ koşullarını sağlayan etüv içinde çoğaltıldı (21).

Öne Çıkan Noktalar

- Oksitosin, glutamatın hücre proliferasyonuna olan olumsuz etkisini azalttığı,
- Oksitosinin farklı dozlarda glutamat toksisitesine hücre proliferasyonunda etkisi olduğu,
- Oksitosin uygulamasının glutamat toksisitesine bağlı hücre ölümüne engel olduğu,
- Glutamat varlığında oksitosinin farklı dozlarında antiapoptotik etkisi olduğu belirlendi.

Diferansiyasyon (farklılaşma) medyum: %0,1 penisilin/streptomisin solüsyonu+0,5 mM d-cAMP+gentamisin solüsyonu üzerine 100 ml tamamlanacak şekilde yüksek glukozlu DMEM ilavesi ile elde edildi.

Oksitosinin Nörotoksosite Tarama Testi

İlk gün tüm kuyucuklara (well) 500 µl hacimde proliferasyon medyumunu içerisine her kuyucukta 15.000 hücre olacak şekilde SH-SY5Y nöroblastoma hücresi konuldu. Yirmi dört saat sonra ilk üç kuyucukta proliferasyon medyumunu (negatif kontrol) ve geri kalan tüm kuyucuklardan medyum çekilerek serum içermeyen DMEM içine dibütiril cAMP (1 mM) diferansiyasyon medyumunu eklendi. Üç kuyucuğa herhangi bir madde eklenmedi (pozitif kontrol). Diğer kuyucuklara her üç kuyucuğa bir konsantrasyon olacak şekilde 0,1, 1, 3, 10, 30 ve 100 µM konsantrasyonda oksitosin konuldu. Yirmi dört saat sonra hücreler 10 dakika %4 formaldehid (PBS) içinde fikse edildikten sonra üç dakika Coomassie Blue boyasında (%0,6) bekletildi. Boyanmış örnekler daha sonra PBS ile yıkandı. Daha sonra ışık mikroskobu altında rastgele seçilen 10 farklı sahadan 100 hücredeki nörit uzunlukları görüntü analiz sistemi ile ölçüldü. Ölçülen nörit uzunluğu değerleri % inhibisyon ile değerlendirildi (22).

Glutamatın Nörotoksik Etki Düzeyi

Glutamat uygulaması öncesinde hücre kültürüne eklenecek dozu tespit etmek amacıyla tüm kuyucuklara 500 µl hacimde proliferasyon medyumunu içerisine her kuyucukta 16.000 hücre olacak şekilde SH-SY5Y hücresi konuldu. Yirmi dört saat sonra ilk üç kuyucukta proliferasyon medyumunu (negatif kontrol), geri kalan tüm kuyucuklardan medyum çekilerek serum içermeyen DMEM içine dibütiril cAMP (1 mM) diferansiyasyon medyumunu ve glutamat 20 mmol/L, 40 mmol/L, 60 mmol/L ve 80 mmol/L konsantrasyonlarda uygulandı. 24 saat sonra hücreler 10 dakika %4 formaldehid (PBS) içinde fikse edildikten sonra üç dakika Coomassie Blue boyasında (%0,6) bekletildi. Boyanmış örnekler daha sonra PBS ile yıkandı. Işık mikroskobu altında rastgele seçilen 10 farklı sahadan 100 hücredeki nörit uzunlukları görüntü analiz sistemi ile ölçüldü. %50 nörit inhibisyonu yapan konsantrasyon araştırıldı.

Glutamat ile Oluşturulan Nörotoksosite Üzerine Oksitosinin Etkisi

Glutamat uygulaması öncesinde hücre kültürüne eklenecek dozu tespit etmek amacıyla tüm kuyucuklara 500 µl hacimde proliferasyon medyumunu içerisine her kuyucukta 16.000 hücre olacak şekilde SH-SY5Y hücresi konuldu. Yirmi dört saat sonra ilk üç kuyucukta proliferasyon medyumunu (negatif kontrol), geri kalan tüm kuyucuklardan medyum çekilerek serum içermeyen DMEM içine dibütiril cAMP (1 mM) diferansiyasyon medyumunu ve glutamat 32 µM konsantrasyonunda eklenerek nörotoksosite oluşturuldu. Her üç kuyucuğa, 1, 3, 10, 30 ve 100 µM konsantrasyonda oksitosin konuldu. Kültür tabağındaki üç kuyucuğa herhangi bir madde eklenmedi (pozitif kontrol). Yirmi dört saat sonra hücreler 10 dakika %4 formaldehid (PBS) içinde fikse edildikten sonra üç dakika Coomassie Blue boyasında (%0,6) bekletildi. Boyanmış örnekler daha sonra PBS ile

yıkandı. Işık mikroskobu altında rastgele seçilen 10 farklı sahadan 100 hücredeki nörit uzunlukları görüntü analiz sistemi ile ölçüldü. Ölçülen nörit uzunluğu değerleri % inhibisyon ile değerlendirildi.

Hücre Canlılık Testi (MTT) Metabolizması

Hücre canlılık testi çalışması, 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromidin mor formazan ürününe redüksiyonu, hücre yaşamı ve proliferasyonu ölçmek için kullanılan bir yöntemdir. İlk gün, tüm kuyucuklara 300 µl hacimde proliferasyon medyumuna içerisine her kuyucukta 16.000 hücre olacak şekilde SH-SY5Y nöroblastoma hücresi konularak 24 saat inkübasyona bırakıldı. Yirmi dört saat hücreler proliferasyon medyumuna içerisinde ilk kuyucuktan başlayarak sırasıyla negatif kontrol, 1, 3, 10, 30 ve 100 µM konsantrasyonlarda oksitosin konularak deney düzeneği oluşturuldu. Aynı deney 24 saat glutamat ile toksite oluşturulduktan sonra sırasıyla negatif kontrol, 1, 3, 10, 30 ve 100 µM konsantrasyonlarda olacak şekilde oksitosin konularak tekrarlandı. İkinci gün proliferasyon medyumunda hücreler bekletildi. Üçüncü gün, oksitosin içeren medyum çekilerek hücrelerden uzaklaştırıldı ve her bir kuyucuğa 100 µl taze medyum konuldu ve üzerine 10 µl 12 mM MTT stok solüsyonundan eklendi. İnkübatörde dört saat 37°C'de bekletildi. İnkübasyon sonrası MTT içeren medyum pipetle çekilerek uzaklaştırıldı. Hücrelere 50 µl DMSO (DMSO, A3672, Darmstadt, Germany) eklendi, oda ısısında 10 dakika süreyle bekletildi. Absorbans 570 nm'de dalga boyu seçicisi sistemli mikropilaka okuyucu spektrofotometrede (ELx800UV, BioTek) tespit edildi. Her deney 3 kez tekrarlandı. Kontrol grubuna göre ölçülen absorbanslar karşılaştırılarak oksitosinin koruyucu etkisi hakkında bilgi edinildi (22).

Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling (TUNEL) Boyaması

Apoptotik hücre ölümünün belirlenmesinde Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling (TUNEL) boyama yöntemi kullanıldı. Glutamatlı ve glutamatsız hücreler PBS'de hazırlanmış %4'lük paraformaldehid solüsyonu (pH 7,4) ile fikse edildikten sonra 3 defa 5'er dakika PBS ile yıkandı. Daha sonra 1/500 oranında PBS ile dilüe edilen 20-µg/ml Proteinaz-K 15 dakika uygulandı. Beşer dakika üç kez PBS ile yıkamayı takiben beş dakika hidrojen peroksit ile muamele edildikten sonra yeniden beşer dakika üç kez PBS ile oda ısısında yıkandı. Örnekler beş dakika Equilibration buffer ile oda ısısında tutulduktan sonra TdT-enzimi ile nemli atmosferik ortamda 37°C'de 60 dakika plastik slipler kesitleri kapatacak şekilde bekletildi. Sürenin ardından Stop Wash Buffer ile 10 dakika bekletildikten sonra Antidioksigenin Peroksidaz konjugatı ile 30 dakika muamele edilen örnekler beşer dakika üç kez PBS ile yıkandı. Ardından DAB (Diaminobenzidin) ile boyama yapıldı, birkaç kez distile su ile yıkama yapıldı. Artalan boyaması Mayer's Hematoksileni ile yapıldı. Kör yöntemle

TUNEL pozitif hücreler saptanmaya çalışıldı. İmmünohistokimyasal değerlendirilmede boyanın yoğunluğu ve dağılımına göre körlemesine semi-kantitatif puanlama yapıldı. Apoptotik endeks için doku kesitlerinin fotoğrafları çekildi ve 10 farklı alanda toplam hücre miktarı ve TUNEL pozitif hücreler sayılarak formüle göre endeks hesaplandı (23).

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz GraphPad programı (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) ile yapıldı. Tanımlayıcı veriler ortalama ± standart hata ile belirtildi. Farklı dozlardaki oksitosin ile kontrol grubunun, glutamat ile kontrol grubunun ve glutamat ile oksitosin gruplarının karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulandı. Anlamlılığın hangi grupta olduğunu belirlemek için post hoc testi olarak Tukey kullanıldı. İstatistiksel olarak anlamlı p değeri 0,05'in altı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Oksitosinin Nörotoksitite Tarama Testi

Oksitosinin farklı dozlarda nörit uzamasına etkisinin kontrol grubuna göre farklı olmadığı görüldü ($p>0,05$).

Glutamatın Nörotoksitite Tarama Testi

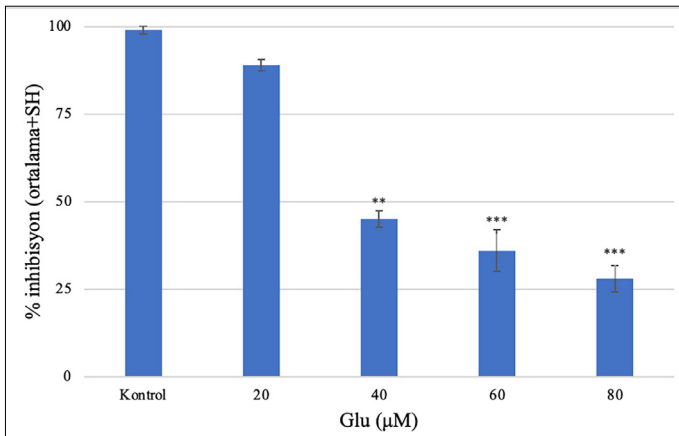
SH-SY5Y kültür ortamında glutamatın doz bağımlı bir şekilde anlamlı bir ılımlı nörotoksik etkisi görüldü (Şekil 1). Glutamatın 32 µM konsantrasyonda nörit uzamasını %50 oranında azalttığı saptandı. SH-SY5Y hücrelerinde glutamat ile oluşan nörotoksitenin oksitosin uygulanarak doza bağımlı olarak azaldığı saptandı. Özellikle oksitosinin 10 µM konsantrasyonlarından itibaren oldukça anlamlı nörit inhibisyonunu azalttığı ve nöroprotektif etki gösterdiği tespit edildi ($p<0,05$) (Şekil 2).

Hücre Canlılık Testi Metabolizması Sonuçları

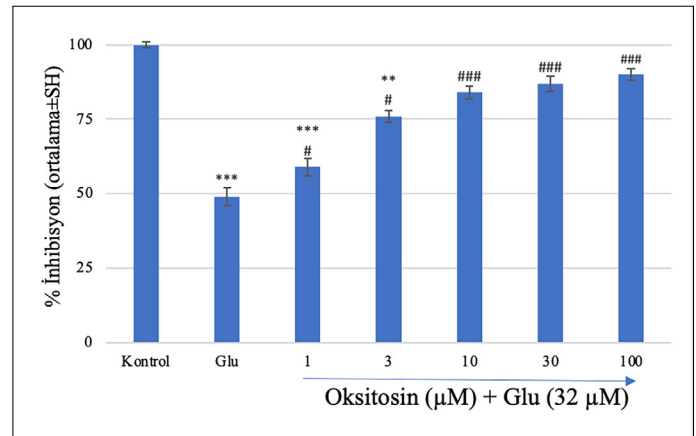
Oksitosin uygulamasının hücre çoğalmasında azaltmayı anlamlı derecede artırdığı saptandı ($p>0,001$) (Şekil 3, 4). Farklı konsantrasyonlarda uygulanan glutamatın hücre çoğalması ve canlılığı üzerinde anlamlı ($p<0,05$) bir toksik etkiye sahip olduğu saptandı. Glutamatın hücre proliferasyonunu %50 azalttığı konsantrasyon (IC50) 54 µM olarak belirlendi. Glutamatın IC50 dozunda gösterdiği nörotoksik etkiye karşı farklı konsantrasyonlarda uygulanan oksitosinin hücre çoğalması ve canlılığı üzerinde anlamlı ($p<0,05$) bir etkiye sahip olduğu saptandı (Şekil 5).

Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling Boyama Sonuçları

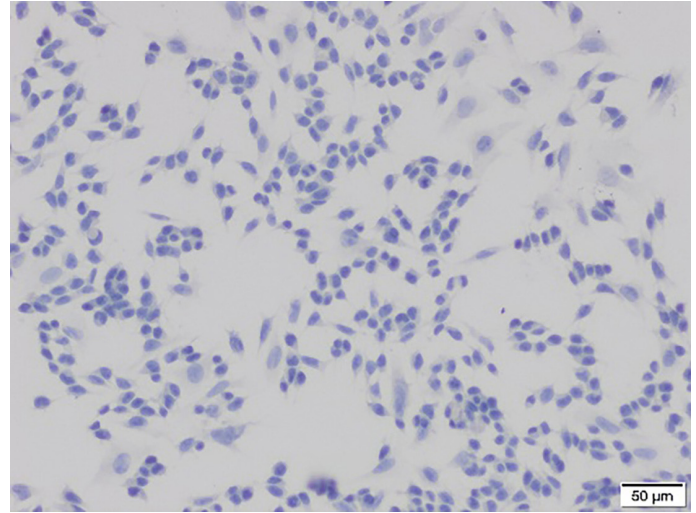
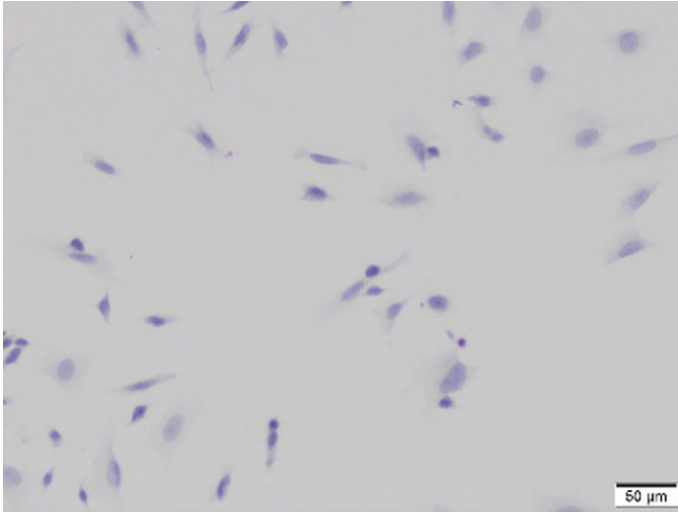
54µM glutamat uygulanan hücre kültürüne oksitosin 10, 30 ve 100 µM dozlarında uygulanarak apoptotik etkiler gözlenmeye çalışıldı. Sadece glutamat uygulanan grup ile oksitosin uygulanan gruplar arasında



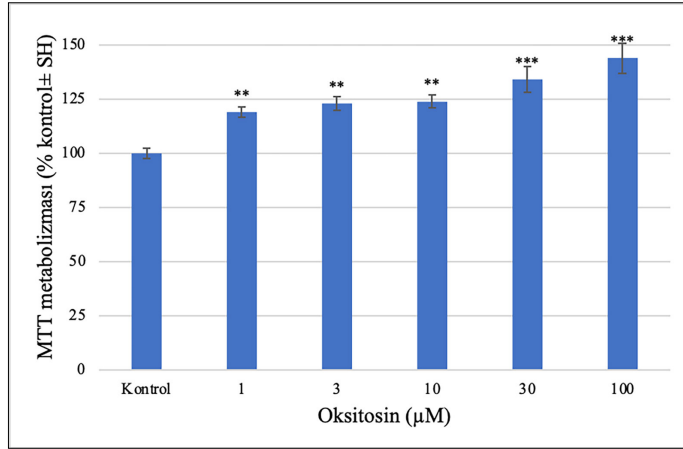
Şekil 1. Glutamat uygulanan hücrelerde nörit uzamasının inhibisyonu (kontrol grubuna göre, * $p<0,01$, ** $p<0,001$).



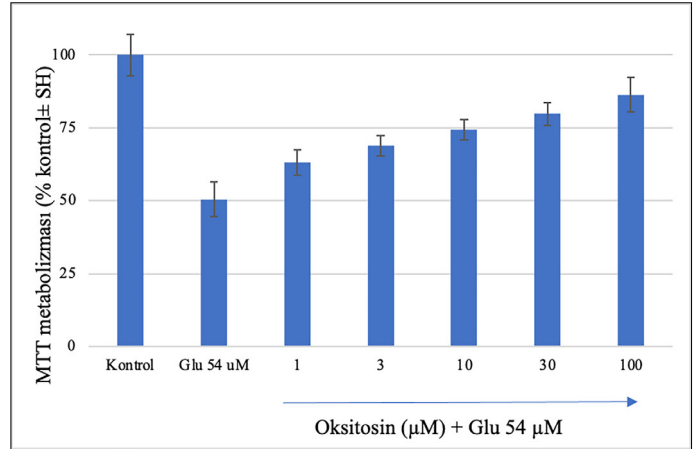
Şekil 2. Glutamat 32 µM ile oluşturulan nörit inhibisyonuna oksitosinin değişik konsantrasyonlarda etkisi (kontrol grubuna göre, * $p<0,01$, ** $p<0,001$; glutamat 32 µM grubuna göre, # $p<0,05$, ### $p<0,001$).



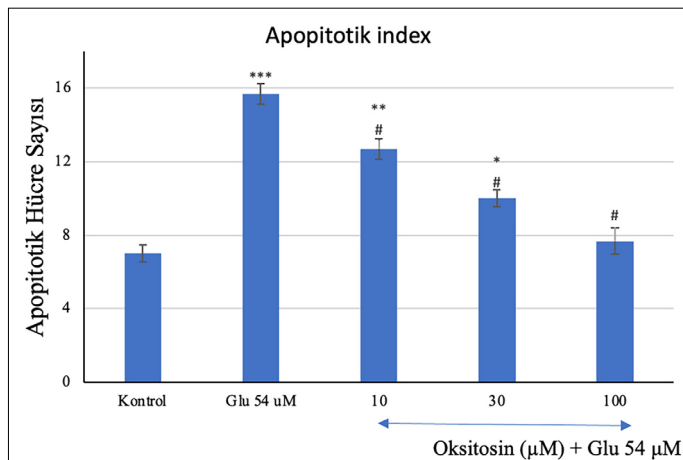
Şekil 3. Oksitosin varlığında kültür ortamında yapılan ve çoğalan SH-SY5Y hücrelerinin faz kontrast görüntüleri.



Şekil 4. Oksitosinin farklı konsantrasyonlarında hücre canlılık testi (MTT) metabolizması üzerine etkileri (kontrol grubuna göre, **p<0,01, ***p<0,001).



Şekil 5. Glutamat toksisitesinde oksitosinin farklı konsantrasyonlarında koruyuculuğu için hücre canlılık testi (MTT) metabolizması üzerine etkileri (glutamat 54 µM grubuna göre, *p<0,05).



Şekil 6. Oksitosin varlığında glutamat toksisitesinin apoptotik hücre sayılarına etkisi (kontrol grubuna göre, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001; glutamat 54 µM grubuna göre, #p<0,05).

apoptotik hücre sayısını istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) azalttığı görüldü (Şekil 6). Glutamat ile birlikte 100 µM oksitosin uygulanan grup ile kontrol grubu arasında apoptotik hücre sayıları arasında anlamlı bir fark görülmedi ($p>0,05$).

TARTIŞMA

Bu çalışmada insan nöroblastoma SH-SY5Y hücre kültüründe glutamat ile oluşturulan nörotoksitide oksitosinin nörit büyümesi, hücre canlılığı, hücre proliferasyonu ve apoptoze olan etkileri araştırıldı. Apoptotik hücre ölümünün belirlenmesinde TUNEL boyama, hücre canlılığı ve proliferasyonu MTT testi ve oksitosin ve glutamatın olası nörotoksik etkisi NTT testi ile belirlendi. Glutamat ile oluşan nörit inhibisyonunu oksitosinin doz bağımlı bir şekilde azalttığı, oksitosinin doza bağlı nöroprotektif etkisi olduğu ve antiapoptotik etkilerinin olduğu gösterildi.

Oksitosin reseptörlerinin glial ve nöroblastoma hücre hattı kültürlerinde varlığı gösterilmiştir (24). Oksitosin reseptörleri, G proteinine bağlı ikinci habercilerle ilişkilidir. Bunların aktivasyonu, sitozolik kalsiyumu artırır, bu da sinyalle düzenlenen protein kinazların aracılığıyla hücre iskeleti değişikliklerine neden olabilir (25). Nöronal hücrelerdeki yapısal değişiklikler, bir dizi nöropeptidin etkisi ile ilişkilidir. Ancak yapılan çalışmalar G proteinine bağlı reseptörler aracılığıyla hareket eden çeşitli nöropeptitlerin nörit büyümesini modüle edebileceğini ileri sürmektedir (26,27). Hücre iskeleti, nörit büyümesinde önemli bir rol oynar. Hücre iskeleti mikrotübülleri ve mikrofilamentler arasındaki etkileşim ve bunların dinamik değişiklikleri, nörit büyümesi ve nöronal farklılaşma için gereklidir (28). Oksitosinin SH-SY5Y, SK-N-SH ve U87-MG hücre hatlarında etkili olduğu ancak oksitosinin etkisini göstermede en duyarlı olan hücre hattının SH-SY5Y olduğu saptanmıştır (20). Bu nedenle çalışmamızda SH-SY5Y hücre hattını kullandık.

Çalışmamızın ilk aşamasında glutamat ve oksitosinin nörotoksik etkileri belirlenmeye çalışılmış olup NTT testi ile nörit uzunlukları hesaplandı. Oksitosin tek başına nörotoksik etki göstermedi. Glutamatın ise doz bağımlı bir şekilde anlamlı bir ilımlı nörotoksik etkisi olduğu görüldü. Glutamatın nörit inhibisyonuna oksitosin uygulamasının doza bağımlı koruyucu etkisi olduğu saptandı. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada SH-SY5Y hücrelerinde vazopressin ve oksitosinin nörit büyümesine etkileri de karşılaştırılmış, oksitosinin anlamlı olarak nörit büyümesini daha fazla artırdığı gösterilmiştir (29). Başka bir çalışmada Magel2 nakavt farelerde oksitosinin nörit büyümesi ve sinaps oluşumu üzerine etkisi gösterilmiştir (30). Bakos ve ark. oksitosinin nöroblastoma hücre hattında hücre çoğalması ve hücre canlılığını artırmasının BDNF ya da NGF ile olmadığını bildirmişlerdir (20). Oksitosinin nörit büyümesi ve sinaps oluşum süreçlerinde etkin olduğu gösterilmiş (30,31) ancak bu süreçlerdeki spesifik moleküler mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

Oksitosinin ilaç uygulanmayan kontrol grubu ile kıyaslamasında SH-SY5Y hücrelerinde hücre çoğalması üzerine olası etkilerini gözlemledik. Oksitosin uygulanmasının MTT metabolizmasında toksik olmayıp hücre çoğalmasını artırdığı görüldü. Deneyde glutamatın hücre çoğalması ve canlılığına olan olumsuz etkisine karşı oksitosinin artan konsantrasyonlarda koruyucu etkisinin olduğu görüldü. Literatürde farklı nörotoksitite yapan kimyasal maddeler üzerine oksitosinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi incelenmiştir. Önceden oksitosin uygulanmış SH-SY5Y hücrelerinin hidrojen peroksit maruz kalması sonucunda hidrojen peroksitin hücre canlılığını azaltmasını etkilemediği; bunun yanı sıra nörotoksin 6-OHDA'nın oluşturduğu hücre canlılığını azaltmasını 1 µM dozda oksitosinin kestiği bildirilmiştir (20). Oksijen-glikoz yoksunluğuna (OGD) maruz bırakılan oksitosin ile inkübe edilmiş olgunlaşmamış hipokampal kültürlerin OGD'nin hemen ardından ve ayrıca reoksijenasyondan sonra önemli ölçüde daha yüksek bir canlılığa sahip olduğu gösterilmiştir (32).

Literatürde oksitosinin sitoprotektif etkileri üzerine yapılmış çalışmalar vardır. Sözü edilen sitoprotektif etkinin antioksidatif, antiapoptotik ve antiinflamatuvar yollarla sağlandığı savunulmaktadır (33-36). Oksitosinin nöroprotektif etkisi farklı deney hayvanı nöron hasarı modellerinde de araştırılmıştır. İskemik nöron hasarı modellerinde yapılan çalışmalarda oksitosinin nöroprotektif etkisini gösteren çalışmalar vardır (37,38). Panaitescu ve ark.'nın yaptıkları çalışmada perinatal asfiksiye bağlı hipokampal hasar oluşturulan rat modelinde oksitosin tedavisinin hem nöbet yükünü hem de hipokampal hasarı azalttığını bu nedenle perinatal asfiksidede oksitosinin potansiyel bir nöroprotektif rolü olduğunu bildirmişlerdir (39). Leuner ve ark., oksitosinin glukokortikoid ya da soğuk su yüzme stres testine tabi tutulan sıçanların hipokampüsünde hem hücre proliferasyonunu hem de nörojenezi artırdığını göstermişlerdir (40).

Sıçanlarda dopaminerjik nöronlarda rotenonun indüklediği hücre hasarında oksitosin uygulamasının kaspaz-3, kaspaz-8, Bax süpresyonu yaparak ve Bcl-2 ekspresyonunu artırma yolu ile apoptozisi azaltarak sitoprotektif etkisi olduğu bildirilmiştir (41). Yuan ve ark., yaptıkları çalışmada oksitosinin lipopolisakkaridin indüklediği mikrogliya hücrelerinde aşırı aktivasyonu azalttığı ve ERK/p38 MAPK sinyal yolağını inaktive ederek proenflamatuvar düzenleyicilerin ve sitokinlerin ekspresyonunu azalttığını göstermişlerdir. Ayrıca lipopolisakkarit uygulanmasının COX-2 ve iNOS ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı artırdığı, ancak önceden oksitosin uygulamasının COX-2 ve iNOS'un protein ekspresyonunu inhibe ettiğini bildirmişlerdir (42). Akman ve ark. tarafından yapılan çalışmada oksitosinin sisplatin kaynaklı nörotoksitede koruyucu etkisini endojen antioksidanları artırarak, lipid peroksidasyonunu ve yangıyı azaltarak gösterdiğini rapor etmişlerdir (43).

Çalışmamızda hücre kültüründe glutamat apoptozisi artırarak hücre ölümüne neden olmaktadır. Oksitosinin ise 10, 30 ve 100 µM dozlarda

glutamata bağlı artan apoptotik hücre sayısını azaltarak antiapoptotik etki gösterdiğini belirledik. Oksitosinin hipokampal nöronlarda metamfetaminin ve kortikosteronun indüklediği apoptozisi azalttığı ve bunu oksitosin reseptörleri yolu ile yaptığı bildirilmiştir (44,45).

Oksitosinin nazal uygulanmasının intraserebroventriküler uygulama sonrası ortaya çıkan davranışsal etkileri taklit eder şekilde etki ettiği bulunmuştur (46,47). Oksitosinin in vivo uygulanmasının ERK fosforilasyonunu inhibe ederek otizm spektrum bozukluğu benzeri semptomları etkili bir şekilde iyileştirdiği bildirilmiştir (48). Bu gibi durumların tedavisinde oksitosin kullanılabilirliği ve nöronal hasar oluşturan diğer durumlar da oksitosinin faydalı olabileceği öngörülmekle birlikte ileri deneysel uygulamalar ile gösterilmesi gerekmektedir.

Oksitosinin nöroprotektif etkisinin saptandığı çalışmamızdan yola çıkarak nöroprotektif etkinin ortaya çıkış mekanizmalarının incelendiği ve glutamat aracılı nörotoksitenin rol oynadığı hastalıkların tedavisinde oksitosinin rolünün inceleneceği çalışmalara ışık tutacağını öngörmekteyiz.

Açıklama: Bu çalışma 19-23 Ekim 2022 tarihinde İzmir'de gerçekleştirilen 58. Ulusal Psikiyatri Kongresi'nde ödüle aday sözel bildiri olarak sunulmuştur.

Etik Komite Onayı: Çalışma için etik kurul onayı Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Etik Kurulu'ndan 13/09/2017 tarih ve 20.478.486 karar numarası ile alındı.

Hakem Değerlendirmesi: Dış Bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir- BGÖ, KV; Tasarım- BGÖ, KV, MİT; Denetleme- KV, MİT; Kaynaklar- KV, MİT; Malzemeler- KV, MİT; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi- BGÖ, KV, MİT; Analiz ve/veya Yorum- BGÖ, KV, MİT; Literatür Taraması- BGÖ, KV; Yazıyı Yazan- BGÖ, KV, MİT; Eleştirel İnceleme- KV, MİT.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2018-209 numaralı proje ile desteklendi.

KAYNAKLAR

- McEntee WJ, Crook TH. Glutamate: its role in learning, memory, and the aging brain. *Psychopharmacology (Berl)*. 1993;111:391-401. [Crossref]
- Glushakov AV, Dennis DM, Sumners C, Seubert CN, Martynyuk AE. L-phenylalanine selectively depresses currents at glutamatergic excitatory synapses. *J Neurosci Res*. 2003;72:116-124. [Crossref]
- Hynd MR, Scott HL, Dodd PR. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Int*. 2004;45:583-595. [Crossref]
- Sapolsky R. *Biology and human behavior: the neurological origins of individuality*, 2nd ed. Springfield, VA: Teaching Co.; 1996.
- Shinohe A, Hashimoto K, Nakamura K, Tsujii M, Iwata Y, Tsuchiya KJ, et al. Increased serum levels of glutamate in adult patients with autism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2006;30:1472-1477. [Crossref]
- Choi DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*. 1998;1:623-634. [Crossref]
- Hussman JP. Suppressed GABAergic inhibition as a common factor in suspected etiologies of autism. *J Autism Dev Disord*. 2001;31:247-248. [Crossref]
- Fatemi SH, Halt AR, Stary JM, Kanodia R, Schulz SC, Realmuto GR. Glutamic acid decarboxylase 65 and 67 kDa proteins are reduced in autistic parietal and cerebellar cortices. *Biol Psychiatry*. 2002;52:805-810. [Crossref]
- Purcell AE, Jeon OH, Zimmerman AW, Blue ME, Pevsner J. Postmortem brain abnormalities of the glutamate neurotransmitter system in autism. *Neurology*. 2001;57:1618-1628. [Crossref]
- Rubenstein JL, Merzenich MM. Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes Brain Behav*. 2003;2:255-267. [Crossref]
- Jamain S, Betancur C, Quach H, Philippe A, Fellous M, Giros B, et al. Linkage and association of the glutamate receptor 6 gene with autism. *Mol Psychiatry*. 2002;7:302-310. [Crossref]

12. Rojas DC. The role of glutamate and its receptors in autism and the use of glutamate receptor antagonists in treatment. *J Neural Transm (Vienna)*. 2014;121:891–905. [\[Crossref\]](#)
13. Churchwell KB, Wright SH, Emma F, Rosenberg PA, Strange K. NMDA receptor activation inhibits neuronal volume regulation after swelling induced by veratridine-stimulated Na⁺ influx in rat cortical cultures. *J Neurosci*. 1996;16:7447–7457. [\[Crossref\]](#)
14. Dessi F, Charriaut-Marlangue C, Ben-Ari Y. Glutamate-induced neuronal death in cerebellar culture is mediated by two distinct components: a sodium-chloride component and a calcium component. *Brain Res*. 1994;650:49–55. [\[Crossref\]](#)
15. Lau A, Tymianski M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch*. 2010;460:525–542. [\[Crossref\]](#)
16. Björklund A, Hökfelt T, editors. *GABA and neuropeptides in the CNS*. Amsterdam, New York: Elsevier; 1985.
17. Erkanli Senturk G, Erkanli K, Aydın U, Yucel D, Isiksacan N, Ercan F, et al. The protective effect of oxytocin on ischemia/reperfusion injury in rat urinary bladder. *Peptides*. 2013;40:82–88. [\[Crossref\]](#)
18. Faghihi M, Alizadeh AM, Khori V, Latifpour M, Khodayari S. The role of nitric oxide, reactive oxygen species, and protein kinase C in oxytocin-induced cardioprotection in ischemic rat heart. *Peptides*. 2012;37:314–319. [\[Crossref\]](#)
19. Breton J-D, Veinante P, Uhl-Bronner S, Vergnano AM, Freund-Mercier MJ, Schlichter R, et al. Oxytocin-induced antinociception in the spinal cord is mediated by a subpopulation of glutamatergic neurons in lamina I-II which amplify GABAergic inhibition. *Mol Pain*. 2008;4:19. [\[Crossref\]](#)
20. Bakos J, Strbak V, Ratulovska N, Bacova Z. Effect of oxytocin on neuroblastoma cell viability and growth. *Cell Mol Neurobiol*. 2012;32:891–896. [\[Crossref\]](#)
21. McLean WG, Holme AD, Jannah O, Southgate A, Howard CV, Reed MG. The effect of benomyl on neurite outgrowth in mouse NB2A and human SH-SY5Y neuroblastoma cells in vitro. *Neurotoxicology*. 1998;19:629–632. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9745922/>
22. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65:55–63. [\[Crossref\]](#)
23. Aydemir I, Kum S, Tuğlu M. Histological investigations on thymus of male rats prenatally exposed to bisphenol A. *Chemosphere*. 2018;206:1–8. [\[Crossref\]](#)
24. Cassoni P, Sapino A, Stella A, Fortunati N, Bussolati G. Presence and significance of oxytocin receptors in human neuroblastomas and glial tumors. *Int J Cancer*. 1998;77:695–700. [\[Crossref\]](#)
25. Wang Y-F, Hatton GI. Interaction of extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 with actin cytoskeleton in supraoptic oxytocin neurons and astrocytes: role in burst firing. *J Neurosci*. 2007;27:13822–13834. [\[Crossref\]](#)
26. Cotta-Grand N, Rovere C, Guyon A, Cervantes A, Brau F, Nahon J-L. Melanin-concentrating hormone induces neurite outgrowth in human neuroblastoma SH-SY5Y cells through p53 and MAPKinase signaling pathways. *Peptides*. 2009;30:2014–2024. [\[Crossref\]](#)
27. Hobson S-A, Vanderplank PA, Pope RJ, Kerr NC, Wynick D. Galanin stimulates neurite outgrowth from sensory neurons by inhibition of Cdc42 and Rho GTPases and activation of cofilin. *J Neurochem*. 2013;127:199–208. [\[Crossref\]](#)
28. Stieess M, Maghelli N, Kapitein LC, Gomis-Ruth S, Wilsch-Brauninger M, Hoogenraad CC, et al. Axon extension occurs independently of centrosomal microtubule nucleation. *Science*. 2010;327:704–707. [\[Crossref\]](#)
29. Pierce M. Effects of arginine vasopressin and oxytocin on neurite outgrowth and cellular signaling in SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *FASEB J*. 2020;34:1. [\[Crossref\]](#)
30. Reichova A, Schaller F, Bukatova S, Bacova Z, Muscatelli F, Bakos J. The impact of oxytocin on neurite outgrowth and synaptic proteins in Magel2-deficient mice. *Dev Neurobiol*. 2021;81:366–388. [\[Crossref\]](#)
31. Bakos J, Srancikova A, Havranek T, Bacova Z. Molecular mechanisms of oxytocin signaling at the synaptic connection. *Neural Plast*. 2018;2018:4864107. [\[Crossref\]](#)
32. Ceanga M, Spataru A, Zagrean A-M. Oxytocin is neuroprotective against oxygen-glucose deprivation and reoxygenation in immature hippocampal cultures. *Neurosci Lett*. 2010;477:15–18. [\[Crossref\]](#)
33. Rashed LA, Hashem RM, Soliman HM. Oxytocin inhibits NADPH oxidase and P38 MAPK in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biomed Pharmacother*. 2011;65:474–480. [\[Crossref\]](#)
34. Authier S, Tanguay JF, Geoffroy P, Gauvin D, Bichot S, Ybarra N, et al. Cardiovascular effects of oxytocin infusion in a porcine model of myocardial infarct. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2010;55:74–82. [\[Crossref\]](#)
35. Szeto A, Nation DA, Mendez AJ, Dominguez-Bendala J, Brooks LG, Schneiderman N, et al. Oxytocin attenuates NADPH-dependent superoxide activity and IL-6 secretion in macrophages and vascular cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;295:E1495–E1501. [\[Crossref\]](#)
36. Petersson M, Lagumdžija A, Stark A, Bucht E. Oxytocin stimulates proliferation of human osteoblast-like cells. *Peptides*. 2002;23:1121–1126. [\[Crossref\]](#)
37. Kaneko Y, Pappas C, Tajiri N, Borlongan CV. Oxytocin modulates GABAAR subunits to confer neuroprotection in stroke in vitro. *Sci Rep*. 2016;6:35659. [\[Crossref\]](#)
38. Karelina K, Stuller KA, Jarrett B, Zhang N, Wells J, Norman GJ, et al. Oxytocin mediates social neuroprotection after cerebral ischemia. *Stroke*. 2011;42:3606–3611. [\[Crossref\]](#)
39. Panaitescu AM, Isac S, Pavel B, Ilie AS, Ceanga M, Totan A, et al. Oxytocin reduces seizure burden and hippocampal injury in a rat model of perinatal asphyxia. *Acta Endocrinol (Buchar)*. 2018;14:315–319. [\[Crossref\]](#)
40. Leuner B, Caponiti JM, Gould E. Oxytocin stimulates adult neurogenesis even under conditions of stress and elevated glucocorticoids. *Hippocampus*. 2012;22:861–868. [\[Crossref\]](#)
41. Erbaş O, Oltulu F, Taşkıran D. Amelioration of rotenone-induced dopaminergic cell death in the striatum by oxytocin treatment. *Peptides*. 2012;38:312–317. [\[Crossref\]](#)
42. Yuan L, Liu S, Bai X, Gao Y, Liu G, Wang X, et al. Oxytocin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in microglial cells and attenuates microglial activation in lipopolysaccharide-treated mice. *J Neuroinflammation*. 2016;13:77. [\[Crossref\]](#)
43. Akman T, Akman L, Erbas O, Terek MC, Taskiran D, Ozsaran A. The preventive effect of oxytocin to Cisplatin-induced neurotoxicity: an experimental rat model. *Biomed Res Int*. 2015;2015:167235. [\[Crossref\]](#)
44. Latt HM, Matsushita H, Morino M, Koga Y, Michiue H, Nishiki T, et al. Oxytocin Inhibits Corticosterone-induced Apoptosis in Primary Hippocampal Neurons. *Neuroscience*. 2018;379:383–389. [\[Crossref\]](#)
45. Li C, Wang H, Wang M, Chen C, Bai F, Ban M, et al. Oxytocin Attenuates Methamphetamine-Induced Apoptosis via Oxytocin Receptor in Rat Hippocampal Neurons. *Front Pharmacol*. 2021;12:639571. [\[Crossref\]](#)
46. Wang Z, Liu D, Wang F, Liu S, Zhao S, Ling E-A, et al. Saturated fatty acids activate microglia via Toll-like receptor 4/NF-kappaB signalling. *Br J Nutr*. 2012;107:229–241. [\[Crossref\]](#)
47. Lukas M, Neumann ID. Nasal application of neuropeptide S reduces anxiety and prolongs memory in rats: social versus non-social effects. *Neuropharmacology*. 2012;62:398–405. [\[Crossref\]](#)
48. Wang Y, Zhao S, Wu Z, Feng Y, Zhao C, Zhang C. Oxytocin in the regulation of social behaviours in medial amygdala-lesioned mice via the inhibition of the extracellular signal-regulated kinase signalling pathway. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2015;42:465–474. [\[Crossref\]](#)