



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ**  
**MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**LEVOSİMENDAN'IN NB2a HÜCRE KÜLTÜRÜ ÜZERİNE**  
**ETKİLERİ**

**Dr. TÜLÜN ÖZTÜRK**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMANLAR**

**Prof. Dr. KAMİL VURAL**

**Prof.Dr. ERCÜMENT ÖLMEZ**

**Prof: Dr. FATMA SULTAN KILIÇ**

**MANİSA- 2018**





**TÜRKİYE CUMHURİYETİ**  
**MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**LEVOSİMENDAN'IN NB2a HÜCRE KÜLTÜRÜ ÜZERİNE**  
**ETKİLERİ**

**Dr. TÜLÜN ÖZTÜRK**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMANLAR**

**Prof. Dr. KAMİL VURAL**

**Prof.Dr. ERCÜMENT ÖLMEZ**

**Prof: Dr. FATMA SULTAN KILIÇ**

**MANİSA- 2018**

**BEYAN**

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

**Öğrencinin Adı, Soyadı**

**Dr. TÜLÜN ÖZTÜRK**

**İmza**

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans çalışmalarım sürecinde tez çalışmamda danışmanlık görevini üstlenerek yönlendiren, bilgi ve becerilerini paylaşan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Kamil VURAL' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bu süreçte, her zaman bilimsel desteklerini aldığım Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Hocalarım, Sayın Prof. Dr.ERCÜMENT ÖLMEZ'e, Sayın Doç. Dr. Tuğba ÇAVUŞOĞLU'na ve Histoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. M. İbrahim Tuğlu'ya çok teşekkür ederim.

Saygılarımla

Prof. Dr. Tülün Öztürk

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
TABLolar DİZİNİ.....	III
GRAFİKLER DİZİNİ.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	V
RESİMLER DİZİNİ.....	VI
KISALTMALAR.....	VII
ÖZET .....	1
SUMMARY.....	2
GİRİŞ .....	4
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>6</b>
<b>2.1. KALP CERRAHİSİ YOĞUN BAKIMINDA DELİRYUM, AJİTASYON.....</b>	<b>6</b>
2.1.1.Kardiyopulmoner baypasın nörolojik etkileri .....	6
2.2.  Levosimendan ve nöroproduktivite ve nörotoksisite.....	7
2.3.  APOPİTOZ .....	8
2.3.1.  Apoptozun Safhaları .....	10
2.3.2.  Apoptozun Oluşum Yolları.....	12
2.4.  Nörotoksisite ve Nöroprotektivite DeneYleri.....	14
2.4.1.  Nörotoksisite Tarama Testi .....	15
2.4.2.MTT Boyama.....	16
2.4.3.TUNEL yöntemi .....	17
<b>3. MATERYAL VE METOD .....</b>	<b>18</b>
3.1.  NÖROTOKSİTE TARAMA YÖNTEMİ.. .....	18
3.2.  MTT METABOLİZMASI. ....	19
3.3.  TUNEL BOYAMASI .....	20
3.4.  İSTATİSTİK .....	22

<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>23</b>
<b>4.1. NÖROTOKSİSİTE TARAMA TESTİ SONUÇLARI .....</b>	<b>23</b>
<b>4.2. MTT METABOLİZMASI SONUÇLARI .....</b>	<b>26</b>
<b>4.3. TUNEL BOYAMA SONUÇLARI .....</b>	<b>27</b>
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>30</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>36</b>
<b>7. KAYNAKLAR.....</b>	<b>37</b>
<b>8. EKLER.....</b>	<b>43</b>



## TABLÖLAR DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> TUNEL Boyama Protokolü .....	21
--	----



## GRAFİKLER DİZİNİ

- Grafik 1:** NB2a hücrelerinde LVS'in farklı konsantrasyonlarında % nörit inhibisyonu üzerine etkisi. Kontrol grubuna göre \*\*\* $p < 0.001$ .....**24**
- Grafik 2:** Kontrol grubuna göre Levosimendan'ın değişik konsantrasyonlarında hücre canlılığı ve proliferasyonuna üzerine etkileri,  $p > 0.05$ .....**27**
- Grafik 3:** NB2a hücrelerine 10 ve 30 uM konsantrasyonlarda LVS uygulamasında apoptotik hücre sayısında anlamlı bir fark olmadığı görüldü,  $P > 0.05$ .....**29**

## ŞEKİLLER DİZİNİ

**Şekil 1:** Apoptotik süreç ve hücrede meydana gelen değişiklikler. ....12



## RESİMLER DİZİNİ

<b>Resim 1:</b> MTT Metabolizması ve kontrol X400 Nb2a Hücresi. ....	<b>25</b>
<b>Resim 2:</b> -cAMP ile farklılaştırılan NB2a Kültür Hücresi görüntüsü x400.....	<b>25</b>
<b>Resim 3:</b> Negatif kontrol hücrelerinin görüntüsü x400.....	<b>25</b>
<b>Resim 4:</b> NB2a hücrelerinde 1 $\mu$ M LVS ile oluşturulan görüntüsü x400. ....	<b>26</b>
<b>Resim 5.</b> Levosimendan 10 ve 30 $\mu$ M uygulama sonrası NB2a hücrelerinin TUNEL boyaması görüntüleri.....	<b>28</b>

## **KISALTMALAR**

**LVS:** Levosimendan

**NB2a:** Nöroblastoma Kanser Hücre Dizini

**ATP:** Adenozin Trifosfat

**NTT:** Nörotoksisite Tarama Testi

**MTT:** 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromid

**KPB:** Kardiyopulmoner baypasa

**cAMP:** Siklik AMP

**Apaf-1:** Apoptotik proteaz aktivasyon faktörü-1

**TNF:** Tümör Nekroz Faktör

**TRAIL:** TNF Related Apoptoz Inducing Ligand

**ER:** Endoplazmik retikulum

**TUNEL:** TdT-dUTP nick-end-labelling

**TdT:** Terminal deoksinükleotidil transferaz

**ANOVA:** Tek Yönlü Varyans Analizi

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle's Medium

**PBS:** Phosphate-buffered Saline

**DAB:** Diaminobenzidin

**Tezin başlığı:** Levosimendan'ın NB2a Hücre Kültür Hattındaki Etkileri

**Öğrencinin adı:** Dr. Tülün ÖZTÜRK

**Danışmanın adı:** Prof. Dr. Kamil VURAL

**Anabilim Dalı:** Farmakoloji

## ÖZET

**Amaç:** levosimendan'ın (LVS) kültürde nörotoksik etkilerinin olup olmadığının araştırılmasıdır. LVS' nin çeşitli mekanizmalar aracılığı ile etki ettiği bilinmektedir. Fosfodiesteraz III'ü inhibe ettiği  $K_{ATP}$  açtığı, böylece kardiyoprotektif etkili olduğu iyi bilinmektedir. Levosimendan, kalbin kasılma gücünü oksijen tüketimini artırmadan kuvvetlendirir ve anti-oksidan, anti-inflammatuar, inotropik ve vazodilatatör özelliklere sahiptir. Levosimendan, kalp cerrahisi sırasında kalbin pompa gücü azalmış olgularda kullanımı tercih edilmektedir. Levosimendan'ın nöronları indirek olarak koruduğu gösterilmiştir, ancak direct neuronlar üzerine etkisi bilinmemektedir. Bu çalışmada, LVS'nin nörotoksik etkileri olup olmadığı NB2a dizin hücrelerinde araştırıldı.

**Gereç ve Yöntem:** Bu amaçla LVS' nin (0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30 ve 100  $\mu$ M) toksik etkileri Nörotoksisite Tarama Testi (NTT) ile, apoptotik etkileri TUNEL yöntemi ile ve hücre canlılık testi MTT yöntemi ile incelendi.

**Bulgular:** NTT testinde, Levosimendanın tüm konsantrasyonlarında ılımlı nörotoksik etkileri saptanmadı. İlaveten, 1 $\mu$ M konsantrasyonda nörit inhibisyonu yapmadığı gibi nörit uzamasını anlamlı bir derecede artırdı. Hücre proliferasyonunu olumsuz yönde etkilemedi ve apoptotik hücre sayısı kontrol grubundan farklı değildi ( $p>0.05$ ).

**Sonuçlar:** Levosimendanın direk nöroprotektif etkileri  $K^+$  açıcı kanallar üzerinden yaptığı olumlu etkiler, genetik transkripsiyon mekanizmalarını düzenleyerek gösterdiği hipotezleri ile açıklanabilir. Ayrıca fosfodiesteraz

inhibisyonu, kalsiyum desensitizasyonu ile de nöronal koruyucu etkiye sahiptir. Levosimendan, hasatlığın doğasına bağlı olarak veya işlemin kendisinden kaynaklanan risklere bağlı olarak beyin hasarı riskine sahip hastalarda güvenle kullanılabilir.

**Anahtar Sözcükler:** Nörotoksisite, in vitro, levosimendan, NB2a, MTT



## SUMMARY

### Effects of Levosimendan on the NB2a Cell Culture Line

**Aim:** The aim of this project is to explore whether the levosimendan (LVS) has neurotoxic effect on culture. It's known that the LVS effects through various mechanisms. It's also very well known that LVS inhibites Phosphodiesterase III and opens the  $K_{ATP}$  channels, so it has cardioprotective effect. Levosimendan is preferred to use in patients who have decreased ejection fraction during cardiac surgery. LVS protects neurons indirectly, but it doesn't know the effect on neurons directly. In the present study, we examined whether Levosimendan has neurotoxic effects using NB2a.

**Material and Method:** For this aim, the toxic effects of LVS (0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30 ve 100  $\mu$ M) has been tested by neurite outgrow and apoptotic effects of LVS has been tested TUNEL method and MTT cell viability test.

**Results:** There were no descript moderate neurotoxic effects in all consantrations on NTT test. Additionally, LVS with 1 $\mu$ M consantration didn't inhibit the neurits and also it significantly increased the lengh of neurite. Levosimendan didn't effect the cell proliferation negatively and the number of apoptotic cell didn't different than those controll cell ( $p>0.05$ ).

**Conclusion:** These direct neuroprotective effects of LVS might be explained with hypothesis that LVS effects positively on  $K_{ATP}$  and adjusts the mechanisms of genetic transcription. Additionally, LVS has neuronal protective effect by inhibiting Phosphodiesterase III and decreasing exaggerated  $Ca^{2+}$  influx. Levosimendan can use securely in patients that have a risk for a brain injury due to the nature of disease or the procedure itself.

**Keywords :** Neurotoxicity, in vitro, levosimendan, NB2a, MTT

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Levosimendan(LVS), kalbin kasılma gücünü oksijen tüketimini artırmadan kuvvetlendiren anti-oksidan, anti-inflammatuar etkili inotropik ve vazodilatatör özelliklere sahip bir ilaçtır (Papp ve ark.2012; Farmakis ve ark. 2016). Bu özellikleri ile Levosimendan, kalp cerrahisi geçirecek veya geçirmekte olan, kalbin pompa gücü azalmış kalp problemlili olgularda özellikle tercih edilmektedir (Putzu ve ark. 2018; Chen ve ark. 2018).

Levosimendan'ın üç mekanizma ile kardiyoprotektif etkili olduğu iyi bilinmektedir. Bununla beraber santral sinir sistemi üzerine olumlu etkileri ile nörolojik olarak ta koruyucu etkisi gösterilmiştir. Ön yükü ve ard yükü düşürerek kardiyak işi azaltır, kalp hücrelerinde mitokondride K<sup>+</sup> duyarlı ATP kanallarını açarak miyokard iskemisine karşı hücrenin stabilizasyonunu sağlar, homeostazisi korur ve mitokondriyal fonksiyonları düzeltir. Levosimendan'ın fosfodiesteraz III'ü inhibe ederek etki gösterdiği ile ilgili farklı çalışmalar da mevcuttur (Kivikko ve ark. 2002; Jorgensen ve ark. 2008; Papp ve ark. 2012).

Kalp cerrahisi sonrası kardiyopulmoner baypasa (KPB) bağlı geçici bilişsel fonksiyonların ve nörolojik fonksiyonların bozukluğu yaygındır ve nedenleri çok çeşitlidir. Bunlar, serebral embolizasyon, serebral iskemi reperfüzyon, KPB sonrasında ısınma döneminde hipertermi, KPB'a sistemik inflammatuar yanıtı içermektedir. Bişsel fonksiyon bozukluğu hastaneden taburcu edilen hastaların % 53'ünde, KPB sonrası 5. yılda ise % 42 'inde saptanmıştır. Bu dönemde kullanılan kardiyak ilaçların nörolojik yan etkileri önem taşımaktadır (Magruder ve ark. 2018; Cheung ve Messé. 2018).

Levosimendanın, kalp üzerine olumlu etkileri aracılığı ile kardiyak debiyi artırıp damarlar üzerine diatatör etkileri ile beyinin kan akımını hızlandırırarak (Lafci B ve ark. 2008; Guerrero-Oriach ve ark. 2016; Roehl ve ark. 2012; Kelm ve ark. 2014) veya deneysel çalışmalarda direkt nöronlar üzerine etkisi ile (Shimizu ve ark. 2002;



Roehl ve ark. 2010; Toller ve ark. 2015) nöronları koruyucu olduğu bildirilmiştir. Bu amaçla kullanımı esnasında nörotoksik etkileri üzerine bilgiye rastlanmamıştır.

Moleküllerin nörotoksik etkilerinin. Araştırıldığı pek çok yöntem olmakla birlikte hücresel düzeyde toksik etkiyi belirgin şekilde gösteren hücre kültürü çalışmaları genellikle tercih edilmektedir. Kültürdeki nöronların farklılaşması (nörit oluşumu) hücrelerin iyi olmasının genel bir göstergesi olan fizyolojik bir süreçtir. Nörit oluşumunun ölçümü, nörotoksisite değerlendirilmesi için kullanışlı bir in vitro model sağlar (NTT) ve çok çeşitli ajanların nörotoksik potansiyellerini göstermede kullanılır. (Setou ve ark. 2003)

Siklik AMP (cAMP), nöronları diferansiyasyona yönlendiren moleküllerden biridir. Bu şekilde nöron karakteri ortaya çıkmaktadır. Böylece cAMP varlığında, nöronlar nörit uzatarak biri birileriyle kontak kurmaya başlarlar. Tipik nöron karakteristikiği böylece ortaya çıkmaktadır. Ancak bu aşamada eğer nöron toksik etkiye maruz kalır ise nörit uzatamaz ve diferansiyasyonunu tamamlayamaz. Bu bulgu nörotoksik etkiyi gösteren bir belirteçtir.

Yapılan bazı çalışmalarda levosimendanın hücre içerisinde mitokondrilerdeki  $K_{ATP}$  kanallarını aktive ederek nöroprotektif etki gösterebileceği savunulmuştur. Ancak bu mekanizma açık değildir (Shimizu ve ark. 2002). Levosimendan'ın nöronların fonksiyonlarını değiştirmesi tespit edilebilirse, daha karmaşık nörolojik sistemleri değiştirme potansiyellerini daha iyi değerlendirmek mümkün olabilir.

Bu çalışmada inotropik ajan Levosimedan'ın fare nöroblastoma hücre dizininde (NB2a) nörotoksisite tarama testi ile nörotoksik veya nöroprotektif etkileri araştırılmıştır. Levosimendan'ın nörotoksik etkisi, kullanılan terapötik dozlara (0,3 mM) eşdeğer olacak düzeyde ve çok daha yüksek konsantrasyonlarda hücre kültürüne verilerek, farklı konsantrasyonlarda LS' nin, nöronlar üzerindeki (dentrit uzama inhibisyonu, hücre çoğalması, hücre ölümü) etkileri in vitro olarak araştırılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

## **2.1. KALP CERRAHİSİ YOĞUN BAKIMINDA DELİRYUM, AJİTASYON**

### **2.1.1. Kardiyopulmoner Baypasın Nörolojik Etkileri.**

KPB sonrası geçici bilişsel fonksiyonların ve nörolojik fonksiyonların bozukluğu yaygındır ve nedenleri çok çeşitlidir. Bunlar, serebral embolizasyon, serebral iskemi reperfüzyon, KPB sonrasında ısınma döneminde hipertermi, KPB'a sistemik inflammatuar yanıtı içermektedir. Bilişsel fonksiyon bozukluğu hastaneden taburcu edilen hastaların % 53'ünde, KPB sonrası 5. yılda ise % 42 'inde saptanmıştır. Nörolojik problemler; Tip I (Taburculukta stupor-koma ve fokal nörolojik bulgular) ve Tip II (Entellektüel fonksiyonlarda bozulma, hafızada yetersizlik, nöbetler) olarak sınıflandırılmaktadır. KPB sonrası nörolojik problem yaşayan hastalarda hastane mortalitesi ve hastanede kalış süreleri yükselmektedir. Hastane mortalitesi Tip I varlığında % 21 ve tip II de % 2 olarak bildirilmiştir. Başarılı bir cerrahi sonrası gelişen nörolojik bozukluklar hasta, yakınları ve sosyal açıdan yıkım olmaktadır (Fontes ve ark. 2014; Hudetz ve ark. 2011; Sauër ve ark. 2017).

Deneysel çalışmalarda, KPB' lı kardiyak cerrahi, generalize inflammatuar yanıtı yol açmanın yanında, mikrogaz veya makroateromatöz serebral embolizasyonlar ile gelişen fokal iskemiler de non-spesifik inflamasyonu tetiklemektedir (Hudetz ve ark. 2011; Fontes ve ark. 2014; Sauër ve ark. 2017).

). Mikro-makro embolileri önleyici veya inflammatuar yanıtı önleyici tedbirlerin nöroprotektif etkili olduğu gösterilmiştir. Heparin kaplı devreler inflammatuar yanıtı azaltarak nörolojik sonuçları düzeltmiştir. (Baikoussis ve ark. 2014; Sukumaran ve ark. 2018) Aprotinin in anti-inflammatuar etkisi ile nöroprotektif etkisine katkıda bulunabileceği bildirilmiştir (Harmon ve ark. 2004).

## **2.2. LEVOSİMENDAN VE NÖROPRODÜKTİVİTE VE NÖROTOKSİSİTE**

Levosimendan'ın kardiyak hücrelerde inodilatör etkisi iyi bilinmektedir. Kalp kasında Troponin C'nin kalsiyuma duyarlılığını artırarak pozitif inotropik etki ile kalp kasında kasılma gücünü artırır. Myositlerde kalsiyumun hücre içinde aşırı birikimine neden olmaz ve kalbin oksijen tüketimini artırmaz. Bu özellikleri ile de kalp yetmezliğinde kullanılmaktadır. LVS, bazı damarların düz kaslarının membranlarında bulunan adesine 3',5'-triphosphate-sensitive potassium ( $K_{ATP}$ ) kanallarını aktive ederek veya Fosfodiesteraz III'ü inhibe ederek vazodilatör etki etmektedir.  $K_{ATP}$  kanalları üzerine agonistik etki etmesi nedeni ile levosimendanı deneysel ve klinik çalışmalarda, kardiyomyositlerde iskemi/reperfüzyon hasarını ve apoptozisi önlediği gösterilmiştir. (Scheiermann ve ark. 2011). Levosimendan (0,009-3.2  $\mu$ M) konsantrasyonlarında, domuz epikardiyum damarlarında, yüksek konsantrasyonlarda, voltaj duyarlı ve kalsiyumla aktive edilen potasyum kanallarını aktive ederek vazodilatasyon yaptıkları gösterilmiştir (Pataricza ve ark. 2003).

Klinik çalışmalarda, kardiyomyositlerde, levosimendan, oksidatif ve nitrosatif stres faktörlerini artırmaz ve kardiyomyositlerde apoptotik hücre ölümünü inhibe eder. Levosimendanın, iskemik önkoşullama için önemli faktör olan  $mitoK_{ATP}$  kanallarını aktive ettiği bildirilmiştir. Klinikte, özellikle inotropik destek gerektiren myokard iskemisi ve kalp yetmezliği olgularında,  $mitoK_{ATP}$  kanallarının LVS ile farmakolojik modülasyonu (Pleiotropic effects) ile hastalarda yararlı etki edebileceği bildirilmiştir. (Parissis ve ark. 2008)

Levosimendanın nöronlar üzerine etkisi sınırlı çalışılmıştır.  $K_{ATP}$  kanalları üzerine agonistik etkisi ile nöroprotektif etki gösterebileceği savunulmuştur. Ancak bu mekanizma açık değildir. (Kivikko ve ark. 2002; Jorgensen ve ark. 2008; Papp ve ark. 2012).

Levosimendan'ın nöronal hücre dizininde, nöronların fonksiyonlarını değiştirmesi veya klorpirifosfat ile oluşturulmuş nörotoksisite üzerine olumlu etkisi tespit edilebilirse, daha karmaşık nörolojik sistemleri değiştirme potansiyellerini daha iyi değerlendirmek mümkün olabilir.

### 2.3. APOPİTOZ

Gelişmiş organizmalarda gereksinim duyulmayan ve/veya fonksiyonu bozulan hücrelerin kontrollü ve programlı ölümüne apopitoz denir. Apopitozun, organizmalarda gelişmede ve homeostazın sürdürülmesinde vazgeçilmez bir rolü vardır. Yunancada “Dökülen Yaprak” anlamına gelen apopitoz; patolojide “Programlı Hücre Ölümü”nü ifade etmektedir. Apopitoz terimi ilk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie adlı araştırmacılar tarafından kullanılmıştır. Apopitozun genetik düzenlenmesi hakkındaki bilgiler *Caenorhabditis elegans* ile yapılan ayrıntılı incelemeye dayanmaktadır (Kiechle ve Zhang 2002; Çolakoğulları 2007).

Apopitoz, ölüm için programlanmış hücrelerde; hücrelerin kendi nükleer DNA'larını, nükleer ve sitoplazmik proteinlerini parçalayacak enzimleri aktive eden, kontrollü bir şekilde düzenlenmiş intrasellüler programla yürütülen bir hücre ölümü yolağıdır. Hücrenin plazma membranı sağlam kalır, ancak yapısı değişir. Bu değişim sonrası hücre fagositoz için hedef haline gelir. Ölü hücre, içeriği dışarı sızmadan hızlıca temizlenir ve bu nedenle organizmada inflamatuvar reaksiyona yol açmaz (Scatena 2012).

Apopitotik hücre ölüm programı, Bcl-2 ailesi proteinleri, kaspazlar ve apopitotik proteaz aktive edici faktörler olmak üzere üç ana bileşen içermektedir. Bu anahtar bileşenlerin biyokimyasal aktivasyonu, apopitozda gözlenen morfolojik değişikliklerden, mitokondriyal hasardan, çekirdek zarı kırılmalarından, DNA fragmentasyonundan, kromatin kondansasyonundan ve apopitotik cisimciklerin şekillenmesinden sorumludur. Ayrıca kanser, nörodejenerasyon, otoimmünite, kalp hastalıkları ve diğer bozukluklar gibi geniş bir alana yayılan hastalıkların patogenezi apopitozun kötü regülasyonu ile ilişkilidir. Apopitoz; istenmeyen ya da potansiyel olarak zararlı hücreler ile birlikte ömrünü tamamlamış hücreleri ortadan kaldırılmasında rol oynar. Aynı zamanda, hücreler onarılamayacak ölçüde zarar gördüklerinde ve özellikle de hasar hücrenin DNA'sını etkilediğinde ise apopitoz patolojik bir olaydır. Böyle durumlarda, onarılamayacak derecede hasar görmüş hücreler apopitoz ile yok edilir (Çolakoğulları 2007). Sonuçta apopitozun rol aldığı pek çok patolojik ve fizyolojik süreç vardır. Apopitoz, organizmanın normal işleyişi sırasında görülen ve düzenli olarak sürmesi gereken bir tür hücre ölüm şeklidir.

Hızlanmış veya yavaşlamış apopitoz hastalık belirtisi olabilir (Çolakoğulları 2007; Scatena 2012).

### **Fizyolojik Nedenlere Bağlı Apopitoz:**

1. Embriyogenezde (implantasyon, organogenez, gelişimsel involüsyon ve metamorfoz) hücrelerin programlı ölümü.

2. Hormona bağlı doku involüsyonu (Menstürel siklusta, menopozda ovaryan atrezide, laktasyon gösteren memenin regresyonunda, kastrasyon sonrası prostat atrofisinde).

3. Çoğalma gösteren hücre gruplarında hücre sayısının devamlılığının (homeostazis) sağlanması (kemik iliği ve timustaki immatür lenfositler, germinal merkezdeki B hücreleri ve intestinal kriplerdeki epitel hücreleri).

4. Olgunlaşmalarını tamamladıktan sonra ya da önce potansiyel olarak zararlı self-reaktif lenfositlerin elimine edilmesi.

5. Akut inflamatuvar yanıtta nötrofiller veya immün bir yanıtta görev alıp kullanılmış konak hücrelerinin ölümü.

6. Sitotoksik T hücreleri tarafından gerçekleştirilen hücre ölümü (virüsle enfekte hücreler, neoplastik hücreler ve transplant reaksiyonu) (Kiechle ve Zhang 2002; Parissis ve ark. 2008).

### **Patolojik Nedenlere Bağlı Apopitoz**

1. Çeşitli etkenler (radyasyon, sitotoksik kanser ilaçları, hafif derecede hipoksi ve ısı gibi) ile oluşan DNA hasarı. DNA hasarı ve tümör süpresör gen p53'ü de kapsayan mekanizma ile apopitoz indüklenir. DNA hasara uğrayınca hücrede p53 birikir ve hücre döngüsünü G1 fazında durdurur. DNA onarım süreci başarısız olduğunda ise p53 apopitozu tetikler. Ayrıca p53 mutasyona uğradığında veya yok olduğunda apopitozu uyarmada yetersiz kalır. Bu durum bazı kanserlerde olduğu gibi hücrenin sağ kalımına ve anormal çoğalmasına sebep olur.

2. Katlanmış proteinlerin birikimi (Santral sinir sistemi ve diğer organlarda endoplazmik retikulumda stres oluşturan protein birikimi).

3. Bilinen bazı enfeksiyonlara bağlı hücre ölümü (adenovirüs, HIV enfeksiyonu ya da dokuda immün yanıt oluşturan viral hepatitler).

4. Duktus obstrüksiyonundan sonra organ parankiminde patolojik atrofi (pankreas, parotis ve böbrek).

5. Tümörlerde hücre ölümü (çoğunlukla gerileyen tümörlerde olmakla birlikte bazen de aktif büyüyen tümörlerde) (Kiechle ve Zhang 2002; Çolakoğulları 2007; Scatena 2012).

Apoptoz, hücre bölünme oranını hücre ölümü oranıyla dengeleyerek doku homeostazının dengelenmesinde ve gelişim sürecinde oldukça önemli bir rol oynamaktadır. Günümüzde kullanılan birçok ilaç, apoptozu indüklemeye yetilerinden dolayı tümör hücrelerini öldürmektedir ve ilaç direnci çalışmalarında apoptozun rolü giderek artan bir şekilde çalışılmaktadır. Apoptoz, gebelik ve nörodejeneratif bozukluklar gibi birçok hastalığın çeşitli aşamalarında rol almaktadır. Apoptozun, doku homeostazındaki ve Alzheimer ve Parkinson gibi yaşla bağlantılı dejeneratif bozukluklarda meydana gelen apoptotik hücre ölümünün gözlenmesindeki fizyolojik önem, apoptozun yaşlanmayla ilgili çalışmalarda kritik bir belirleyici parametre olabileceğini ileri sürmektedir (Altieri 2010; Scatena 2012).

Nekroz, birçok hasar verici koşullar altında oluşan hücre ölümünün patolojik bir modudur. Nekrotik hücre ölümü hücre şişmesini ve organel parçalanmasını takiben lizis ve hücre içeriğinin dışarı salınmasını içermektedir. Bu yapıdaki hücre ölümü, etrafta bulunan dokulara zarar verebilir (Altieri 2010; Scatena 2012).

### **2.3.1. Apoptozun Safhaları**

Apoptoz belli olaylar ile başlatılan, düzenli, temelde kaskad zincirini takip eden, dört basamaktan oluşan, enerji bağımlı bir süreçtir.

Sinyal (başlama) fazı: Apoptozun başlangıç safhasıdır. Apoptotik uyarıcı olarak bir sinyal yaratır. Membran aracılığıyla alınan bu sinyaller apoptozun pozitif veya negatif belirleyicileri olabilir. Yüzey ölüm reseptörlerinin (özellikle tümör nekroz faktör (TNF) ailesi üyelerinin), mitokondriyal yolun veya diğer uyarıcıların apoptozu başlatmasını içerir.

Kontrol ve hazırlık fazı: İntrasellüler pozitif veya negatif düzenleyici moleküller apoptozu uyarır, başlatır ya da durdurur. Bu olaylar spesifik proteinlerle gerçekleştirilir. Burada başlatıcı kaspazlar ve bazı kinazların/fosfatazların aktivasyonu yer alır. Bu proteinler tüm sürecin ilerlemesinde rol aldıkları için önemlidirler. Büyük

ölçüde mitokondriyal fonksiyonu düzenleyerek apopitotik süreçte yer alırlar. Apopitoz mitokondride iki değişikliğe yol açar;

1. Mitokondrial şişme: Apopitotik sinyal mitokondri zarında permeabilite değişimi,

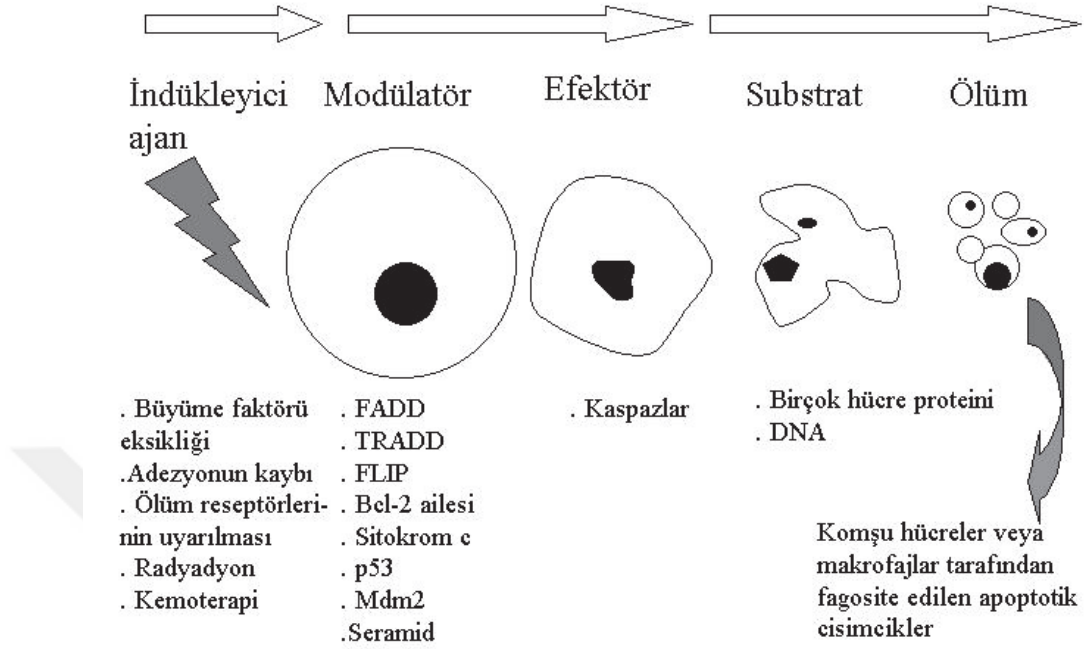
2. Sitokrom C sitoplazma içine salınır ve proteolitik olayların gelişimi hazırlanır (Kiechle ve Zhang 2002; Altieri 2010).

Uygulama fazı: Bu evreden büyük ölçüde kaspaz protein ailesi sorumludur. Kaspazlar (sistein bağımlı aspartat spesifik proteaz) kalsiyum bağımsız hücre içi sistein proteaz sınıfının en önemli bölümünü oluştururlar. İnaktif öncüller olarak hücre sitoplazmasında bulunurlar ve çoğu proapopitotiktir. Biyolojik fonksiyonlarına göre 3 gruba ayrılırlar:

1. Sitokin aktivasyonu yapanlar: Kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 14
2. Apopitozu başlatanlar: Kaspaz 2, 8, 9, 10
3. Apopitozu yürütenler (efektör grup): Kaspaz 3, 6, 7

Başlatıcı kaspazlar apopitotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara iletirler. Efektör kaspazlar ise proteolitik etki göstererek apopitotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar (Çolakoğulları 2007; Scatena 2012). Apopitozun uygulama fazı proteolitik bir kaskattır. Kaspazlar hücre iskeleti ve nükleer matriks proteinlerini parçalayarak hücre iskeletini yıkarlar. Ölü hücrelerin fagositozla eliminasyonu; Apopitotik hücre ve parçalarının yüzeylerinde bulunan işaretleyici moleküller, komşu hücreleri ve fagositleri uyarır (Kiechle ve Zhang 2002; Çolakoğulları 2007).

## APOPTOTİK SÜREÇ



**Şekil 1.** Apoptotik süreç ve hücrede meydana gelen değişiklikler (Kiechle ve Zhang2002).

### 2.3.2. Apoptozun Oluşum Yolları

Apoptotik hücre ölümü farklı sinyal ileti mekanizmaları aracılığıyla uyarılabilmektedir. Bu sinyal ileti mekanizmaları: mitokondriyal yol (intrinsik), ölüm reseptörleri (ekstrinsik) yolu ve endoplazmik retikulum aracılı yoldur.

#### Mitokondriyal yol (Intrinsik)

Intraselüler ölüm sinyallerinin proapoptotik moleküllere iletilerek aktivasyonlarının sağlandığı süreçleri içerir. Sitokrom c, sitozolik apoptotik proteaz aktivasyon faktörü-1 (Apaf-1) ve pro-kaspaz-9 ile apoptozom oluşturmak üzere birleşir (Abbasoğlu ve Hoşal 2001; Lanneau ve ark. 2008). Sitokrom c'nin mitokondriden sitozole salıverilmesi hücre ölüm yolunu etkinleştirir. Sitokrom c'nin salıverilmesini takiben, prokaspaz 9 ve Apaf-1 sitozolde bir araya gelerek "apoptozom" olarak adlandırılan bir kompleks oluşturur. Bu kompleks içinde prokaspaz 9 etkinleşerek kaspaz 9'a dönüşür ve kaspaz 9, kaspaz 3 ve 7'yi etkinleştirir. Böylece apoptotik süreç gelişir (Lanneau ve ark. 2008).



Mitokondriyal yolun kontrolü, Bcl-2 ailesine ait pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerinin dengesine bağlıdır. Bcl 2 ailesine ait proteinler, sitokrom c'nin mitokondri membranından sitozole salınımını denetlerler. Sitokrom c, mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirine ait bir proteindir. Son yıllarda anlaşılan önemiyle apoptoz sürecinde merkezi bir konuma oturmuştur. Bu yüzden de sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınması apoptoz yoluna girmiş bir hücrede geri dönüşümsüz bir döneme girildiğini işaret eder (Thornberry ve Lazebnik 1998; Abbasoğlu ve Hoşal 2001).

### **Ölüm reseptörleri yolu (Ekstrinsik)**

Apoptozun dış sinyallerle tetiklendiği yoldur. Ölüm reseptörleri olarak bilinen tümör nekroz faktör (TNF) reseptör ailesinin plazma membran proteinlerine bağlanması ile tetiklenir. Apoptozin ölüm reseptörleri yolu, TNF ailesi hücre yüzey reseptörlerin kendileriyle ilişkili apoptoz uyarıcı ligandlar (TRAIL), Fas ligantları ya da bazı malign ve normal hücrelerin kendilerine özgü reseptörleriyle birleşmesiyle gerçekleşir (Çolakoğulları 2007). Ölüm reseptörleri; TNF reseptör gen ailesine aittir. Bilinen altı tane ölüm reseptörü (CD95 (APO-1/Fas), TRAIL (TNF Related Apoptoz Inducing Ligand)-R1, TRAILR2, TNF-R1, DR3 ve DR6) vardır. Adaptör proteinler, reseptörle gelen sinyal sonucunda kaspazlara bağlanıp onları aktive ederler (Li ve ark. 1997; Thornberry ve Lazebnik1998). Duyarlı ligandların bağlanmasıyla üç TNFR ya da Fas molekülü kompleks oluşturmak üzere bir araya gelir ve TNFR ve Fas trimerlerinin sitoplazmik bölümleri sırasıyla TRADD ve FADD/Mort-1 adlı adaptör proteinlerine bağlanırlar. Reseptörlerin sitoplazmik kısımları, adaptör proteinler ve proteazlar bir "Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi (DISC)"ni oluştururlar. Proteazların aktivasyonu apoptotik sinyali üretir (Çolakoğulları 2007). DISC, kaspaz-8'in doğrudan aktivasyonuna öncülük eder. Kaspaz-8 de kaspaz-3'ü aktive eder ve apoptoz oluşur (Lanneau ve ark. 2008).

### **Endoplazmik Retikulum Aracılı Yol**

Endoplazmik retikulum (ER), protein biyosentezinde ve katlanmasında, hücre içi kalsiyum dengesinin düzenlenmesinde önemli rol oynar. Hücre içi kalsiyum ( $Ca^{+2}$ ) homeostazisinin bozulması ve intraluminal oksitadif çevresinin değişmesi de dâhil olmak üzere çeşitli şartlar, ER'un stresini artırabilir ve apoptoza yol açabilir. Dış uyaranlar, hücre içinde  $Ca^{+2}$  artışına neden olabilir. Bununla birlikte cAMP gibi hücre

içi ikincil haberciler de aktive edilir. Bu da kaspaz kaskadına sebep olur ve apoptozu başlatır . ER'un stresinin apoptozun gelişimine etkisinin ne olduğu tam olarak anlaşılmasına rağmen, son çalışmalar, ER proteazlarının, kaspaz-7 ve kaspaz-12 nin apoptozu katıldığını öne sürmektedir (Sreedhar ve Csermely 2004; Öktem ve ark. 2001).

#### **2.4. Nörotoksikite ve nöroprotektivite deneyleri**

Moleküllerin nörotoksik etkilerini araştırdığımız birçok yöntem olmakla birlikte hücresel düzeyde toksik etkiyi belirgin şekilde gösteren kültür çalışmaları çoğu kez tercih edilmektedir. Kültürdeki nöronların farklılaşması (nörit uzatması) fizyolojik bir sürecidir. Nörit uzatmasının ölçümü, nörotoksikite değerlendirilmesi için kullanışlı bir in vitro model sağlar (NTT) ve çok çeşitli ajanların nörotoksik potansiyellerini göstermede kullanılır (Setou ve ark. 2003).

Nörotoksik etki 2 şekilde gözlenir. Toksik etkiye maruz kalan hücre etki şiddetli ise ölür veya hafif yada ılımlı bir toksik etki ise nörit inhibisyonu olur. Nöronlar üzerine toksik etki ılımlı ise kullanılan ilaçlar nörit uzatmasını inhibe ederken şiddetli toksik etkide hücre ölümü gerçekleşir. Şiddetli Nörotoksikitenin göstergesi de hücre çoğalmasının azaldığının gösterilmesi ile konur. Hücre canlılığının değerlendirildiği yöntemler ise MTT veya triptan blue boyamasıdır (Setou ve ark. 2008).

d-cAMP nöronları diferansiyasyona yönlendiren maddelerden biridir. Bu şekilde kültür ortamında hücreler nöron karakterini kazanır ve üremesi yavaşlar. Böylece nöronlar nörit uzatarak biri birileriyle kontak kurmaya başlarlar. Tipik nöronal karakteristik böylece ortaya çıkmaktadır. Ancak bu aşamada nöron toksik etkiye maruz kalır ise nöritlerini geri çeker ve diferansiyasyonunu tamamlayamaz. Bu bulgu nörotoksik etkiyi bize gösteren iyi bir süreçtir (Setou ve ark. 2008).

Sinir sisteminde nöronlar sahip oldukları akson ve dentritler aracılığı ile diğer nöron ve nöroglial hücreler ile haberleşmeyi sağlarlar. Dentritler, nöron yüzeyini artırarak diğer hücrelerden input almayı sağlarlar. Nöronal hücre, membranının yapısal komponentlerinin korunması için gerekli faktörleri üreterek, hücre fonksiyonunu korur. Bunlardan bir tanesi olan myelin, aksonun etrafını sarar. Böylelikle hücre algılama iletişim birleştirme ve saklama işlemlerini yürütür. Hücre toksik bir etkiye

maruz kalırsa perikaryon direkt etkilenir veya trofik faktörler kaybolarak sinaps bozulur. Burada hasarı belirleyen toksisitenin şiddet ve süresi ile kalıcılığıdır. Oluşan mekanizmaya bağlı olarak, dejenerasyon süreci hızlı veya yavaş gerçekleşebilir (Harry ve ark. 1998; Ehrich ve ark. 1999). Geciken nörotoksik etki, nöropati target esteraz (NTA) enzim düzeyini kültür ortamında ölçerek gösterilebilir. Nöroprotektif etki ise herhangi bir maddenin nöronda meydana getirdiği toksik etkileri azaltan veya yok eden moleküller için söz edilir.

Kültür ortamında hücreler için gerekli ve önemli şartlar vardır. Dış ortamdaki hücreler aynı vücuttaki gibi optimal sıcaklık, pH, O<sub>2</sub> ve besinleri kültür ortamında hiçbir eksik olmadan kullanır. Kullanılan medyum plazmaya benzemektedir. İnkübatör ile hem sıcaklık optimumuna getirilirken aynı zamanda hücre oksijenlenmesi sağlanmaktadır. Hücreler bu optimal koşullarda kültür tabaklarında (flask) çoğalırlar. Nörotoksik bileşikler ise bu süreçte hücresel kritik mekanizmaları etkileyerek (aksonal transport gibi) nörit uzamasını inhibe ederler. Böylece nöron diğer hücreler ile temasını sağlayacak nöritlerden yoksun kalır. Bu süreç fare kaynaklı nöroblastoma NB2a hücre dizininde oldukça iyi ve hassas olarak gözlenip ölçülebilmektedir. Ancak şiddetli toksik etki hücre ölümüne yol açarken ılımlı veya hafif toksik etki ise etkinin şiddetine göre nörit uzamasını engeller. Normal olarak, kültür ortamında nöronların farklılaşması sürecinde nörit uzatma (neurite Outgrowth) fizyolojik bir süreçtir ve bu süreç nöronun sağlıklı geliştiğini gösteren oldukça iyi bir indikatördür (McLean ve ark. 1998; Flaskos ve ark. 1999). Hücreyi öldürmeyen ancak nörotoksik etki gösteren moleküllerin belirlenmesinde bu ölçüm sıkça kullanılan gelen bir yöntemdir. Nörit uzaması izlenerek, yeni moleküllerin nörotoksik aktiviteleri araştırılmaktadır. Saptanan inhibisyonun derecesi ile, uygulanan maddelerin nörotoksik etki gücü paralellik gösterir. Nörotoksik etki çok güçlü ise nöron ölümü gerçekleşir.

#### **2.4.1. Nörotoksisite Tarama Testi (NTT)**

İn vitro test tekniklerinde, nörotoksik maddelerin hücre üzerine etkisi selektif bir şekilde olmaktadır. Bu spesifik duyarlılık bileşiğin ekstrasellüler farklı konsantrasyonuna da bağlıdır. Toksik maddenin fizikokimyasal özelliklerinin toksik etkiyi direkt olarak etkilediği bilinmektedir. Hücre ile kültür ortamı ilişkisi toksik etkide önemlidir. İn vitro ortamda nöronların temel fonksiyonu olan nörit uzaması, aksonal transport gibi kritik hücresel olaylara bağlıdır. **Nörit uzaması,**

mikrotubil birleştirici protein ve nörofilament proteini gibi nörit için özel yapısal elemanlara bağlı gelişir. Biyolojik, kimyasal ve çevresel toksik maddeler nörit uzamasını engeller. Nörit geliştiren faktör, nöronotrofik faktör ve glial maturasyon faktörü nörit uzamasının gelişim sürecinde rol oynarlar. Bu nedenlerle nörit uzamasının izlenmesi yeni moleküllerin nörotoksik aktivitelerini araştırmak için kullanılabilir (Stone ve ark. 2001; Shea 1999).

Bu çalışmada levosimendanın fare nöroblastoma hücre dizininde (NB2a) nörotoksisite tarama testi ile nörotoksik etkisi olup olmadığı değerlendirildikten sonra nörotoksik etkisi görülmeyen maddeler için nöroprotektif etkilerini olup olmadığının araştırıldığı bir yöntemdir. Klinikte uygulanan etkin konsantrasyonlarda nöronlar üzerindeki etkileri, çoğalma ve ölüm gibi davranış mekanizmaları, in vitro olarak araştırıldığı bir yöntemdir.

#### **2.4.2. MTT Boyama**

İlk olarak Mosmann tarafından tanımlanan ve daha sonra Alley ve ark. tarafından geliştirilen 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromid (MTT) yöntemi, hücre canlılığının belirlenmesi için sıklıkla kullanılan kolorimetrik bir yöntemdir. Deneyin esası; formazan oluşumuna bağlı olarak hücre yaşayabilirliğinin ölçülmesidir. MTT, kültür ortamındaki mitokondriyal aktivitesi devam eden canlı hücrelerin kantitasyonunu sağlar. En sık kullanım alanları: Sitokinlerin, büyüme faktörlerinin medyum komponentlerinin hücreler üzerine etkilerinin araştırılması ve sitotoksik ajanların etkinliğinin test edilmesidir. MTT suda çözünen bir tetrazolium tuzu olup fenol kırmızısı içermeyen medium veya tuz solüsyonlarında hazırlandığında sarımtırak bir solüsyon oluşturur. Tetrazolium halkasının dehidrogenaz enzimlerince parçalanması sonucu MTT. mor renkli çözünmeyen formazan'a dönüşür. Bu dönüşümü sağlayan ortamda var olan canlı hücrelerin mitokondriyeleridir. Oluşan bu formazan izopropanol veya başka bir çözücü yardımı ile çözünür hale getirilir ve oluşan renk reaksiyonu spektrofotometrik olarak okunup kantite edilir (Sjogren ve ark. 2000).

MTT, aktif olarak absorbe olur ve mitokondriyal redüktaz enzimi ile formazan'a indirgenir. Oluşan bu renkli çözeltilinin miktarı 570 nm dalga boylarında ölçüm yapılarak hesaplanır. Bu olay sadece canlı hücrelerde gerçekteşebileceği için bu test, hücre canlılığının ölçütü olarak güvenle kullanılmaktadır (Negoescu ve ark. 1996).

### 2.4.3. TUNEL yöntemi

DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağlar. Apoptotik parçalanma sonucu DNA uçları, DNA polimeraz veya Klenow fragmenti kullanılarak işaretlenebilmektedir. Ancak terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) kullanılarak yapılan işaretleme göreceli olarak daha duyarlı bir yöntem olarak bulunmuştur. Konvansiyonel parafin kesitleri, TdT ve nonizotopik işaretli nükleotidler (sıklıkla biyotinli dUTP) kullanılarak yapılan in situ işaretleme ardından floresan veya enzimatik görüntüleme, apoptotik hücreleri diğerlerinden ayırmada yeterli olmaktadır. Bu yöntem yaygın olarak “TdT-dUTP nick-end-labelling” sözcüklerinin kısaltılması olan “TUNEL” yöntemi adıyla anılmaktadır (Negoescu ve ark. 1996).



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Ab. D. Hücre Kültürü Laboratuvarında tamamlanmıştır.

**Hücre dizin Hücresi:** Fare kaynaklı nöroblastoma 2a hücreleri (NB2a)

#### 3.1. Nörotoksite Tarama Yöntemi

Nöroblastoma hücreleri flask içerisinde %5 fetal calf serum, %5 horse serum, %1 penisilin/streptomisin solüsyonu (10000 U/10mg) ve %0,1 gentamisin (50 mg/ml) içeren yüksek glukozlu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ile 37C° ve %5 CO<sub>2</sub> koşullarını sağlayan etüv içinde çoğaltıldı (Vural ve Tuğlu 2011)

#### **Proliferasyon medyumu:**

%5 fetal calf serum + %5 horse serum + %0.1 penisilin/streptomisin solüsyonu + gentamisin solüsyonu eklenmiş yüksek glukozlu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ile elde edildi.

#### **Diferensiyasyon (farklılaşma) Medyumu:**

100 ml tamamlanacak şekilde yüksek glukozlu DMEM; %0.1 Penisilin/streptomisin solüsyonu + 1 mM d-cAMP + 25 µg/ml gentamisin ile elde edildi.

#### **Nörotoksite Tarama Testi**

İlk gün, tüm kuyucuklara 500 µl hacimde proliferasyon medyumu konmuş her bir kuyucukta 20 000 hücre olacak şekilde NB2a kondu. 24 saat sonra ilk üç kuyucuğa proliferasyon medyumu (negatif kontrol) ve geri kalan tüm kuyucuklardaki medyum çekilerek farklılaşma medyumu (diferensiyasyon medyumu) eklendi. İlk altı kuyucuktan ilk üçüne diferensiyasyon medyumu (pozitif kontrol) sonraki üç kuyucuğa proliferasyon medyumu (negatif kontrol) kondu. Diğer her üç kuyucukta bir konsantrasyon olacak şekilde 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 ve 100 uM konsantrasyonda levosimendan konuldu. İnkübatörde 37 C %5 CO<sub>2</sub> ortamda bir gün bekletildi.

24 saat sonra hücreler 10 dakika %4 formaldehid (PBS içinde) fikse edildikten sonra 3 dakika Coomassie Blue boyasında (% 0.6) boyanması için beklendi.

Boyanmış örnekler daha sonra 10 dakika arayla PBS ve distile su ile 2 kez yıkandı.

Ölçüm yapılmak üzere her üç kuyucuk içerisinde ışık mikroskobu altında rasgele seçilen 10 farklı sahadan 100 hücredeki nörit uzunlukları ölçüldü. Ölçülen nörit uzunluğu değerleri % inhibisyon ile değerlendirildi (Vural ve Tuglu 2011).

$$\% \text{ inhibisyon: } \frac{\text{Pozitif kontrol nörit uzunluğu} - \text{İlaç nörit uzunluğu}}{\text{Pozitif kontrol nörit uzunluğu} - \text{Negatif kontrol nörit uzunluğu}} \times 100$$

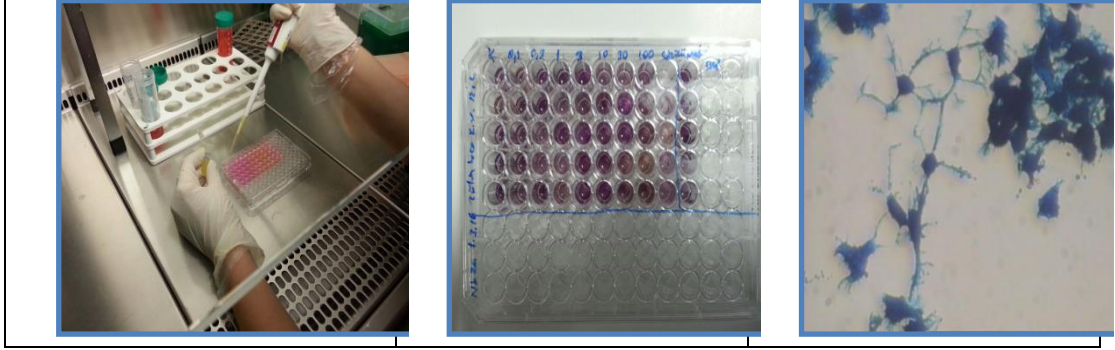
### 3.2. MTT Metabolizması

MTT 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2, 5 difeniltetrazolyum bromid'in mor formazan ürününe redüksiyonu, hücre yaşamı ve çoğalmasını tahmin etmek için kullanılan bir yöntemdir. İlk gün, tüm kuyucuklara 300 µl hacimde proliferasyon medyumuna içerisine her kuyucukta 16 000 hücre olacak şekilde NB2a hücresi konularak 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra ilk kuyucuktan başlayarak sırasıyla negatif kontrol, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30 ve 100 µM konsantrasyonlarda levosimendan eklendi. Negatif kontrol kuyucuklarına sadece proliferasyon medyumuna konuldu ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. Üçüncü gün, levosimendan içeren medyumları çekilerek hücrelerden uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuğa 100 µl taze medyum konuldu. Üzerine 10 µl 12 mM MTT stok solusyonundan eklendi. İnkübatörde 4 saat 37C°'de bekletildi.

İnkübasyon sonrası MTT içeren medyum pipetle çekilerek uzaklaştırıldı. Hücrelere 50 µl DMSO (DMSO, A3672, Darmstadt, Germany) eklendi, oda ısısında 10 dk süreyle bekletildi.

Absorbans 570 nm'de dalga boyu seçicisi sistemli mikropilaka okuyucu spektrofotometrede (ELx800UV, BioTek) tespit edildi.

Deney 3 kez tekrarlandı. Kontrol grubuna göre ölçülen absorbanslar karşılaştırılarak grupların hücre proliferasyonu hakkında bilgi edinildi. (Vural ve Tuglu 2011; Aydemir ve ark. 2018)



**Resim 1:** MTT Metabolizması ve kontrol X400 Nb2a Hücresi.

### 3.3. TUNEL BOYAMASI

Apoptotik hücre ölümünün belirlenmesinde Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling (TUNEL, S7101, Millipore, USA) boyama yöntemi kullanıldı.

Hücreler her bir kuyucuğa yaklaşık 45.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilerek yirmidört saat inkübe edildi. Ertesi gün hücrelere farklı konsantrasyonlarda levosimendan uygulanarak yirmi dört saat bekletildi. Yirmi dört saat sonra hücrelere % 4'lük paraformaldehid solüsyonu ile 30 dk fiksasyon işlemi uygulandı.

Bu işlem sonrasında önce distile su ve PBS ile 5'er dakika ara ile 3 kez yıkandı. Yıkama işleminden sonra PBS ile 1/500 oranında dilüe edilen 20- $\mu$ g/ml Proteinaz-K 37<sup>0</sup>C'de 15 dakika uygulandı. 5'şer dakika 3 kez PBS ile yıkamayı takiben 5 dk %3'lük hidrojen peroksit ile muamele edildikten sonra yeniden 5'şer dakika 3 kez PBS ile oda ısısında yıkandı. Örnekler 5 dk Equilibration buffer ile oda ısısında tutulduktan sonra TdT-enzimi ile 37<sup>0</sup>C de 1 saat plastik slipler kesitleri kapatacak şekilde bekletildi. Süre bitiminde Stop Wash Buffer ile 10 dk bekletildikten sonra Antidioksigenin Peroksidaz Konjugatı ile 30 dk muamele edilen örnekler 5'şer dakika 3 kez PBS ile yıkandı. Ardından DAB (Diaminobenzidin) ile boyama yapıldı ve birkaç kez distile su ile yıkandı. Boyama Mayer's Hematoksileni ile yapıldı (Tablo 1).

Kör yöntemle TUNEL pozitif hücreler saptandı. Daha sonra istatistiksel olarak gruplar değerlendirildi.



**Tablo 1:** TUNEL Boyama Protokolü

<b>İŞLEM</b>	<b>MADDE</b>	<b>SÜRE</b>
<b>FİKSASYON</b>	%4'LÜK PARAFORMALDEHİT	30 DAKİKA
<b>YIKAMA</b>	PBS	3×5 DAKİKA
	PROTEİNAZ-K (37°C etüvde)	1 SAAT
<b>YIKAMA</b>	PBS	3×5 DAKİKA
<b>PEROKSİDAZ BLOK</b>	%3 HİDROJEN PEROKSİT	5 DAKİKA
<b>YIKAMA</b>	PBS	3×5 DAKİKA
<b>EQUILIBRATION BUFFER</b>		10 SANİYE
<b>ENZİM</b>	Tdt ENZİMİ (37°C etüvde)	1 SAAT
<b>STOP WASH BUFFER</b>		10 DAKİKA
<b>YIKAMA</b>	PBS	3×1 DAKİKA
<b>ANTI-DİOKSİGENİN</b>	PEROKSİDAZ KONJUGATI	30 DAKİKA
<b>YIKAMA</b>	PBS	3×5 DAKİKA
<b>BOYAMA</b>	DAB (Diamino benzidin)	10 DAKİKA
<b>YIKAMA</b>	DİSTİLE SU	3×5 DAKİKA
<b>ARTALAN BOYAMA</b>	MAYER'S HEMATOKSİLEN	3 DAKİKA
<b>YIKAMA</b>	DİSTİLE SU	10 DAKİKA
<b>KAPAMA</b>	KAPATMA MEDYUMU	

### 3.4. İSTATİSTİK

İstatistiksel değerlendirme SPSS 11.0 versiyon ile yapıldı. Tüm veriler ortalama  $\pm$  Standart hata olarak belirtildi. İstatistiksel değerlendirilme tek yönlü varyans analizi (ANOVA ) ve Post-hoc test olarak Tukey's B ile yapıldı. \*P<0,05 değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



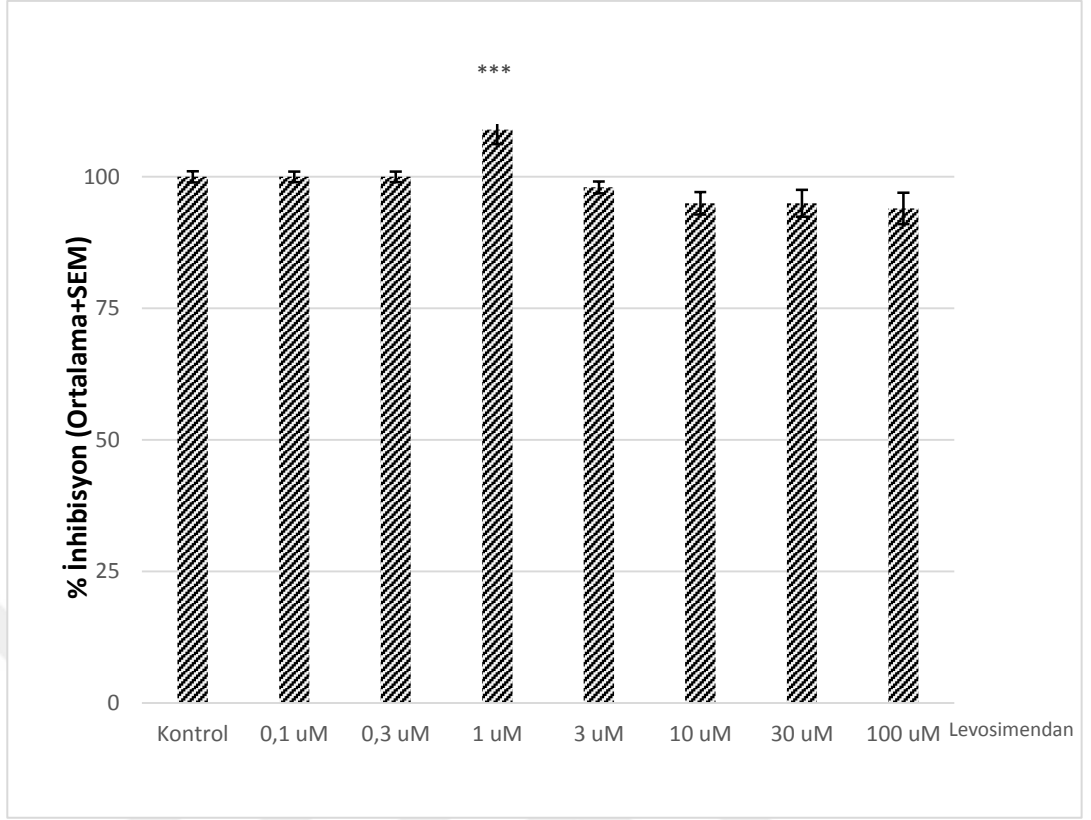
## 4. BULGULAR

Levosimendanın (LVS) nöron kültüründe nörit inhibisyonuna olan etkisi ile ilgili literatürde bir kanıt yoktur. Bu nedenle nöronlar üzerine ılımlı toksik etkisi olup olmadığını ortaya koyan nörotoksite tarama testi (NTT) ve hücreye yüksek toksik etkinin göstergesi kabul edilen hücre ölümüne neden olup olmadığının araştırılmasında kullanılan ve hücre kaybını gösteren MTT testi üzerine etkileri araştırıldı. Ayrıca ortaya çıkan hücre ölümü, nekroz sonucu mu yoksa apoptoza bağlı bir kayıp olup olmadığı, TUNEL testi kullanılarak araştırılmıştır.

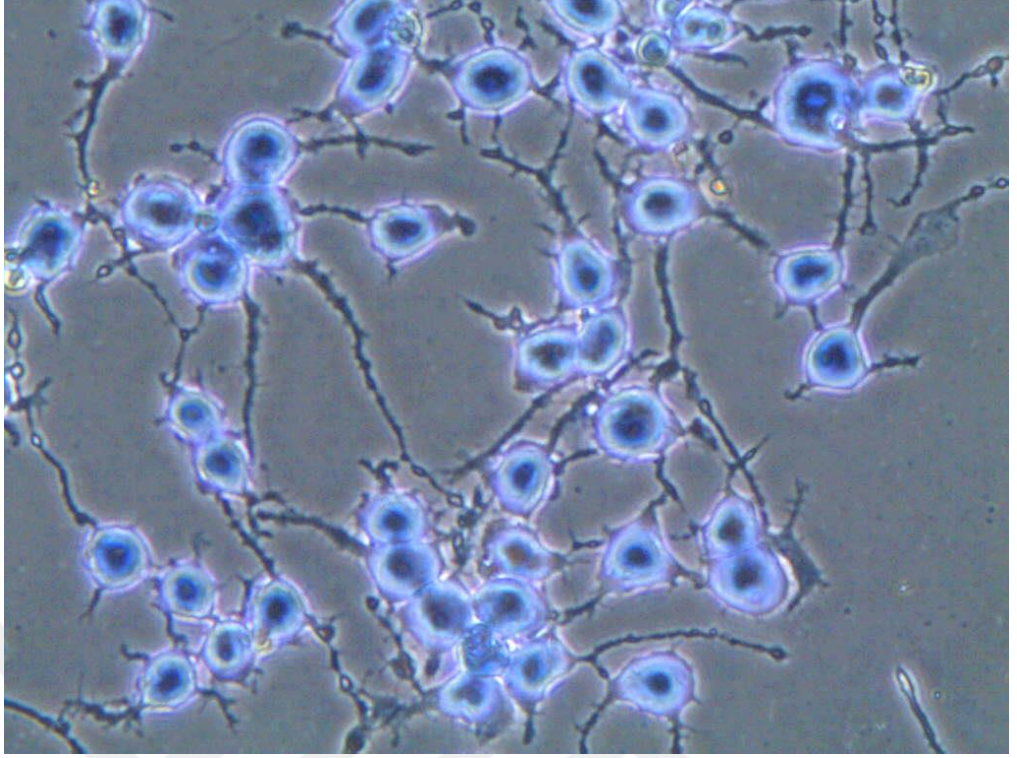
Kültür ortamındaki NB2a hücrelerinin farklılaşma medyumu ile uygulanan cAMP ile 48 saatlik kültür ortamındaki görüntüleri alındı (Resim 1). Hücrelerin sağlıklı ve morfolojik olarak iyi oldukları ve proliferasyon medyumu içindeki hücrelerin nörit uzatmadıkları görüldü (Resim 2).

### 4.1. Nörotoksisite Tarama Testi Sonuçları

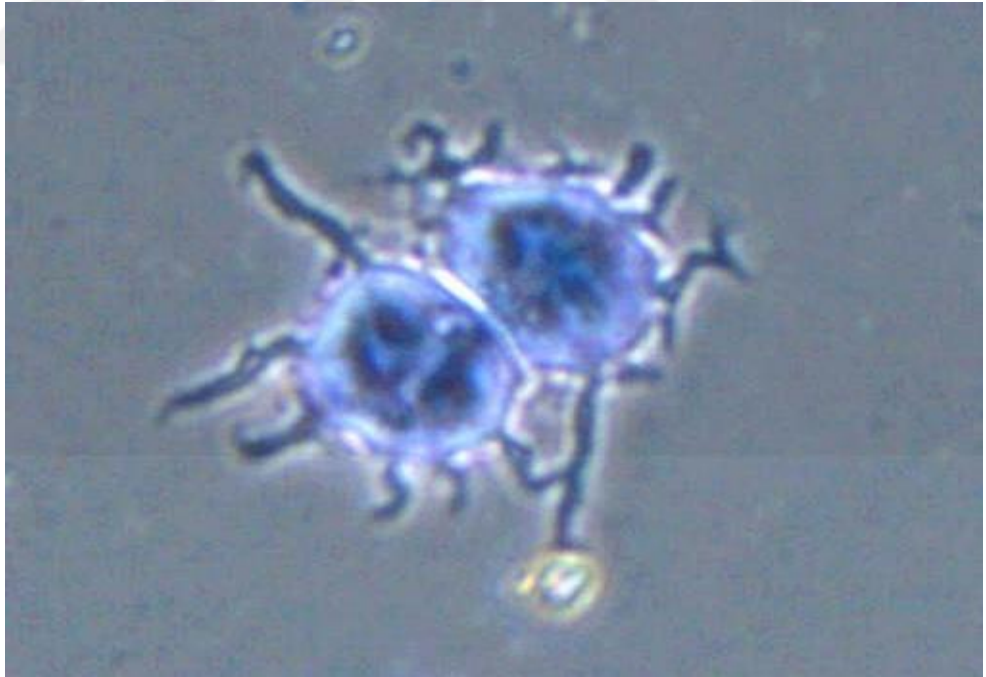
Fare kaynaklı Nöroblastoma hücrelerine (NB2a), kültür ortamında levosimendanın 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30 ve 100  $\mu$ M dozları uygulandı. Her bir LVS dozu için deney üç kez tekrarlandı. Her kuyucuktan alınan rastgele seçilen 10 sahadan 100 hücrenin görüntüleri üzerinden nörit uzunlukları saptandı. % nörit uzunlukları değerlendirildiğinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (Grafik 1)  $p>0.05$ .



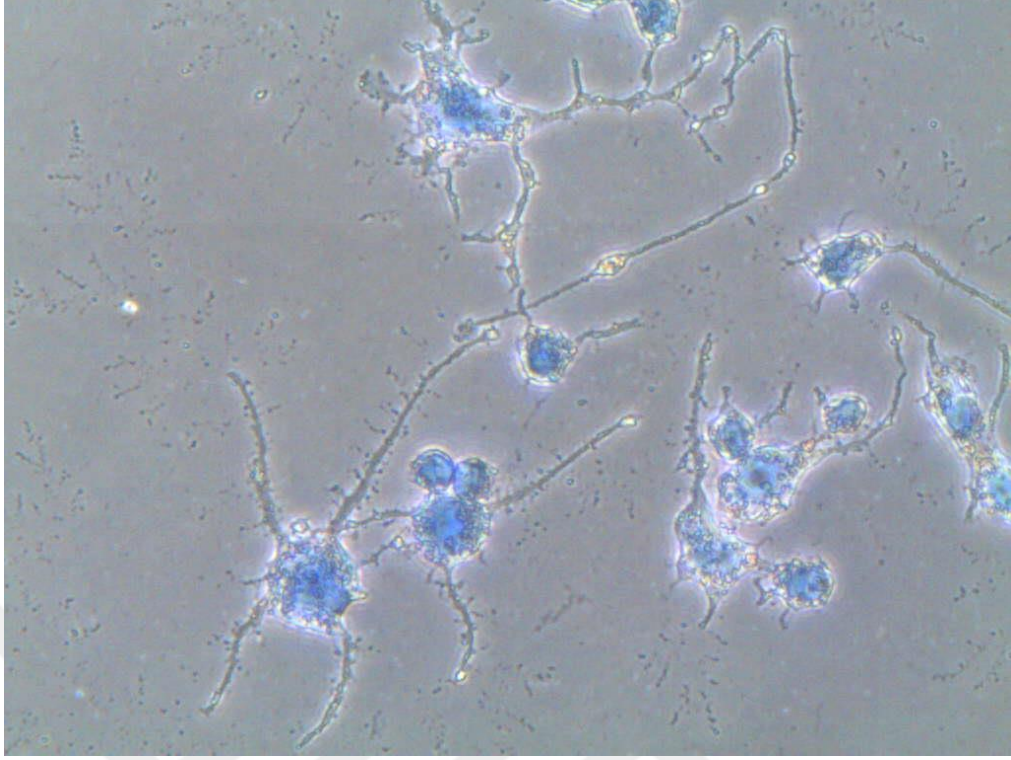
**Grafik 1:** NB2a hücrelerinde LVS'in in farklı mikromolar( $\mu\text{M}$ ) konsantrasyonlarında % nörin inhibisyonu üzerine etkisi, kontrol grubuna göre  
\*\*\* $p < 0,001$



**Resim 2:** d-cAMP ile farklılaştırılan NB2a Kùltür Hùcreleri görüntüsü x400



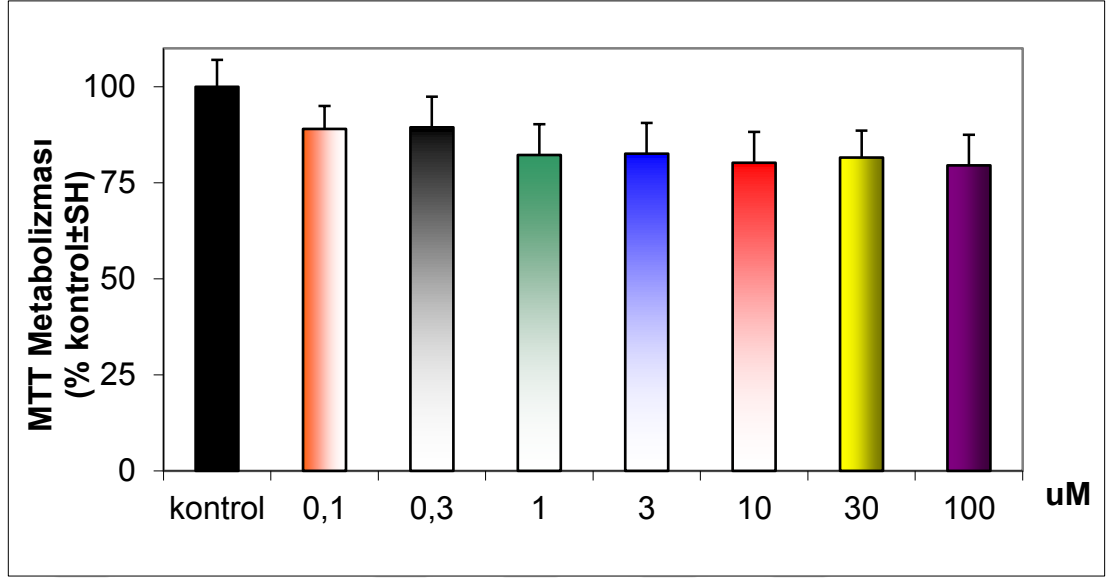
**Resim 3:** Negatif kontrol hùcrelerinin görüntüsü x400.



**Resim 4:** NB2a hücrelerinde 1 µM LVS ile oluşturulan görüntüsü x400.

#### 4.2. MTT Metabolizması Sonuçları

Nöroblastoma hücreleri levosimendanın 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 ve 100 µM dozları ile muamele edildiler. Sonra inkübe edilerek ilaç uygulanmayan bir kontrol grubu ile kıyaslanmak üzere MTT ölçümü yapıldı. Bu yöntem ile levosimendanın bu dozlarının NB2a hücrelerinin hücre çoğalması üzerine olası etkileri gözlemlendi. Farklı konsantrasyonlarda ilacın üç tekrar yapılarak elde edilen ölçümlerinde, hücre çoğalması üzerine ilacın 10 µM konsantrasyonundan itibaren kontrol grubuna göre hücre proliferasyonunda azalma görüldü. Ancak bu azalma kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşturmadı. ( $p > 0,05$ ). (Grafik 2)



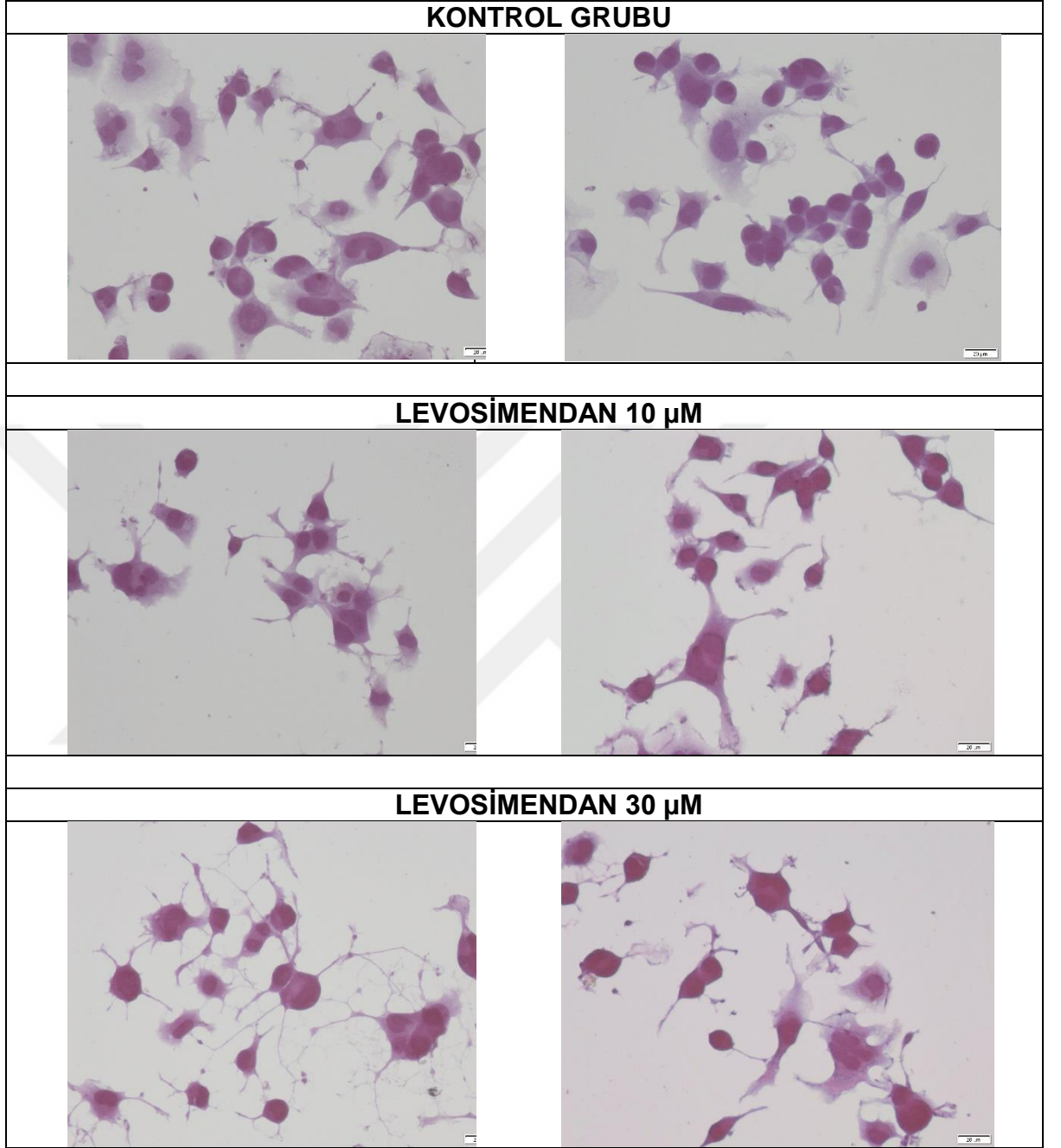
**Grafik 2:** Kontrol grubuna göre Levosimendan' ın farklı mikromolar ( $\mu\text{M}$ ) konsantrasyonlarında hücre canlılığı ve proliferasyonuna üzerine etkileri,  $p>0,05$ .

#### 4.3. TUNEL Boyama Sonuçları

Nb2a hücre hattı ile levosimendanın 10 ve 30  $\mu\text{M}$  dozları ile üç tekrar halinde TUNEL boyaması yapıldı. Yapılan boyamalarda ilaçların 2 farklı konsantrasyonunda toksik ve apoptotik etkileri gözlenmeye çalışıldı. Yapılan boyamalardan elde edilen gözlemlerde gelişen nöroblastoma hücrelerinin sağlıklı olduğu görüldü. Sağlıklı gelişen ve yapışan bu hücrelerin nörit uzattıkları da gözlendi. Görüntülenen NB2a hücreleri sağlıklı ve yapışan az miktarda nörit uzatmış hücreler olup toksik etki ve apoptoz gözlemlenmedi.

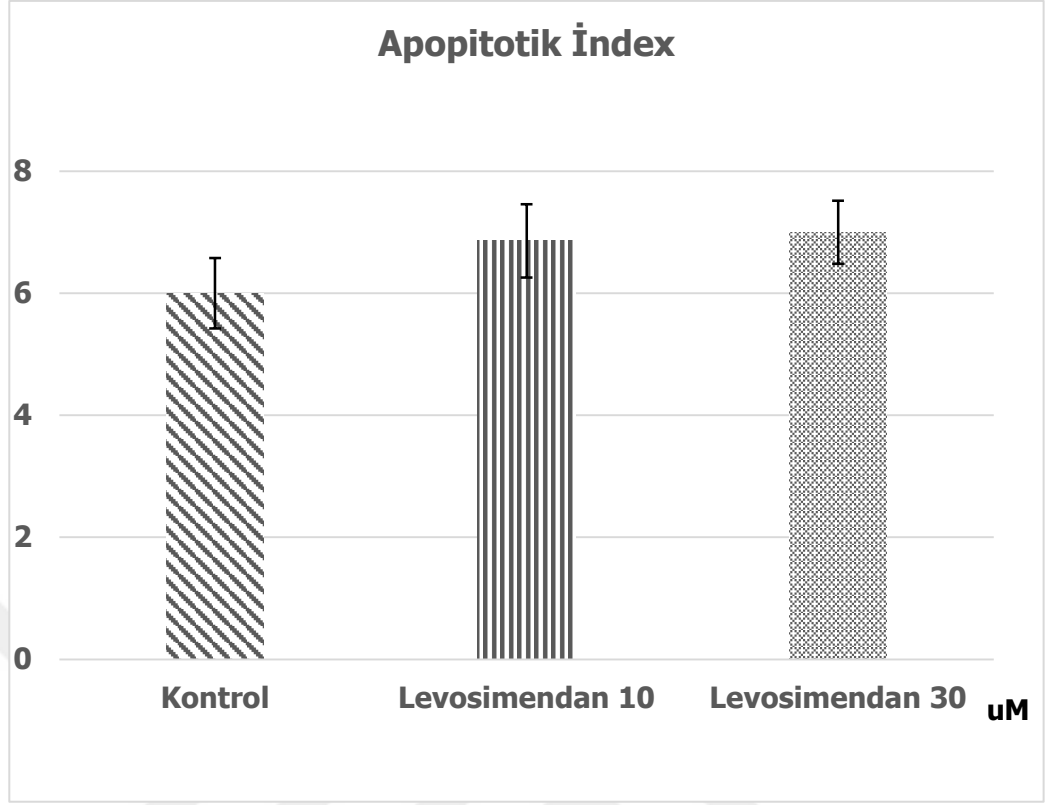
Fare kaynaklı nöroblastoma hücreler üzerinde levosimendanın uygulanan 2 farklı dozunda TUNEL pozitif boyanan hücrelerin sayısı apoptotik indeks olarak hesaplandı. Levosimendanın 10 ve 30  $\mu\text{M}$  dozları ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi. ( $p>0.05$ ).





**Resim 5.** Levosimendan 10 ve 30 mikromolar ( $\mu\text{M}$ ) uygulama sonrası NB2a hücrelerinin TUNEL boyaması görüntüleri.





**Grafik 3:** NB2a hücrelerine 10 ve 30 mikromolar ( $\mu\text{M}$ ) konsantrasyonlarda LVS uygulamasında apopitotik hücre sayısında anlamlı bir fark olmadığı görüldü,  $P>0,05$ .

## 5. TARTIŞMA

Çalışmamızda, LVS'ın kullandığımız konsantrasyonlarında NB2a hücre hatında, nörit inhibisyonu yapmadığı hatta 1 µM konsantrasyonda nörit uzamasını anlamlı bir şekilde artırdığı görüldü. Kontrol grubuna benzer düzeyde hücre proliferasyonu saptandı. Buna bağlı olartakta apoptotik hücre sayısında anlamlı bir fark bulunmadı.

Başlangıçtaki amacımız LVS'in, neuroblastoma hücre kültüründe olası nörotoksik etkilerinin olup olmadığını araştırmaktı. Bu konuda yapılan ilk araştırmadır. Literatürde levosimendan travmatik, iskemik deneysel beyin modellerinde çalışılmıştır. Bu çalışmada, levosimendan kullanılan yüksek konsantrasyonlarda bile ne ılımlı nörotoksik etki ne de ciddi ölüme yol açan bir toksik etkiye neden olmadığı hem hücre proliferasyonun ölçülmesiyle hem de nörit inhibisyonu yapmadığının gösterilmesiyle nörotoksik etkisi olmadığı gösterilmiştir.

Deneysel spinal kort veya beyin iskemi/reperfüzyon hasarı modellerinde, veya travmatik beyin hasarı deneysel modellerde levosimendan'ın nöronal hasarı azalttığı ve nörolojik fonksiyonları düzelttiği bildirilmiştir (Lafci ve ark 2008; Roehl ve ark. 2010; Roehl ve ark. 2012). Bizim çalışmamızda da özellikle klinikte kullanılan 1µM konsantrasyonda nörit uzamasını artırmıştır.

Çeşitli iskemi reperfüzyon modellerinde levosimendan'ın nöroprotektif etkili olduğu gösterilmiştir. Lafci B ve ark. ları (Lafci ve ark 2008), abdominal aortayı klemplayerek oluşturdukları spinal kort iskemi reperfüzyon modelinde, levosimendan'ın geçici iskemik harabiyete bağlı inflammatuar yanıtı azalttığı, spinal kordun motor nöronları ve ön boynuzunda histopatolojik olarak gösterilmiştir. Aynı zamanda daha iyi nörolojik sonuçlar elde edilmiştir). Roehl ve ark. (Roehl ve ark. 2012), invitro travmatik beyin hasarı modelinde, beyin dokusunda travma yoğunluğu indeksi kullanarak, 0.01 veya 0.1 µM levosimendan'ın hem total hem sekonder doku hasarını önlediğini göstermişlerdir. Levosimendan doza bağlı nöroprotektif etki göstermiştir. Kelm RF ve ark. (Kelm ve ark. 2014) da, ratlarda asfiktik kardiyak arrest modeli uygulamışlar; kardiyak arrest ve resusitasyon sonrası 24. saatte post kardiyak arrest sendromunun tedavisinde levosimendan'ın etkinliğini araştırdıkları çalışmalarında LVS'ın miyokardiyal fonksiyon bozukluğunu önleyerek, kortikal

serebral kan akımını arttırarak, nörolojik hasarı önlediğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da hücre canlılığının bir göstergesi olan MTT yönteminde herhangi bir hücre kaybına yol açtığı görülmemiştir. Bu literatür bilgisi ile birleştirildiğinde LVS nöromları koruyucu etki gösterdiği söylenebilir.

Levosimendanın, nöron koruyucu etkileri, kalp üzerine ve damar üzerine sistemik olumlu etkilerine bağlanmıştır. Böylece, LVS beyin kan akımını hızlandırmakta ve iyileştirmektedir (Lafci ve ark 2008; Roehl ve ark. 2012). Bizim çalışmamızda, levosimendan NB2a hücrelerinde nörotoksisite tarama testinde nörit inhibisyonu yapmamıştır. Ayrıca MTT testinde de kontrole göre levosimendan uygulanan hücrelerde hücre proliferasyonunda anlamlı bir fark olmamıştır. Bu durum levosimendanın  $K^+$  açıcı kanallar üzerinden yaptığı olumlu etkiler veya genetik transkripsiyon mekanizmalarını düzenleyerek direk nöroprotektif etkiler gösterdiği hipotezi ile açıklanabilir.

Mito $K_{ATP}$  kanal açıcılarının direkt nöron üzerine koruyucu etkisi ve mekanizmaları tam olarak anlaşılamamıştır. Bu alanda olası açıklamalardan biri, mito $K_{ATP}$  kanallarının açılması ile,  $K^+$ 'un içeri girişi ve organelde depolarizasyon ve mitokondrinin matrix hacminde genişlemedir (Grover ve ark. 1990; Fryer ve ark. 2000). Mitokondride aşırı  $Ca^{+2}$  yüklenmesi, mitokondrinin harabiyetine yol açar, bu da hem nekroz hem de apoptotik formda hücre ölümüne neden olur. Bu mekanizma miyositler için iyi bilinen bir yoldur. Ancak, beyin ve miyosit hücreleri arasında hücre fizyolojisi ve anoksik hasara duyarlılıkları açısından derin farklılıklar olmasına karşın, aynı farmakolojik yaklaşıma benzer koruyucu etkiler gösterdiği söylenebilir (Hein ve ark. 2009). Bu deneysel modelde, beyinde primer hasar alanında oluşan fokal hasar, sonrası uzak alanda sekonder hasar gösterilebilmiştir. Bu deneysel travmatik beyin modelinde sekonder alan, strok sonrası nöron harabiyetine yakından benzemektedir. Bu benzer patolojiler, etyolojileri farklı da olsa beyin hasarında benzer nöroprotektif stratejileri destekler.

Shimizu K.ve ark. ları da (Shimizu ve ark. 2002), selektif Mito  $K_{ATP}$  kanal açıcısı diazoksit'in, rat kortikal noronlarında iskemi reperfüzyon hasarına karşı nöroprotektif etkisini göstermişlerdir. Selektif Mito  $K_{ATP}$  kanal antagonisti 5-hydroxydecanoate (5-HD) ile de bu etkinin geri döndüğü de gösterilmiştir. Çalışmalarında ayrıca uzun süreli iskemiye yanıtını değerlendirmemişlerdir. İzole beyin mitokondrilerinde, Mito  $K_{ATP}$

kanalları için gerekli zorunlu alt üniteleri saptamışlardır. Nöronal korumayı sağlayacak fonksiyonel organların bunlar olduğunu göstermişlerdir.

Guerrero-Oriach JL ve ark. ları (Guerrero-Oriach ve ark. 2016, kardiyak cerrahi geçiren ve potansiyel olarak nörolojik harabiyet yaşanan olgularda, levosimendan uygulamışlardır. Nörolojik harabiyetin göstergesi olan nöron spesifik enolaz değerlerinin başlangıç değerlerine göre farklılık göstermediğini, levosimendan'ın nöroprotektif etkili olduğunu bildirmişlerdir. Nörotoksisite tarama testi ile aldığımız sonuçlar da bu hususu desteklemektedir. 1  $\mu$ M konsantrasyonda anlamlı koruyucu etki saptadık.

Geçici iskemik ataklara karşı Levosimendan'ın nörolojik iyileştirici etkisi,  $K_{ATP}$ -bağımlı kanallara etkisi ile organ perfüzyonunu düzelterek ve inodilatör özelliklerine bağlanmıştır. Bunun yanında, olası direkt nöroprotektif özelliğinin olabileceğine de dikkat çekilmiştir. Deneysel spinal kort hasarı modelinde, LVS'in motor disfonksiyonu azalttığı bildirilmiştir (Lafci ve ark 2008). İn vitro travmatik beyin hasarı modelinde 0,01 ve 0,1  $\mu$ M konsantrasyonlarında levosimendan hem toplam doku hasarını hem de sekonder hasarı azaltmıştır. Bu modelde sekonder doku hasarı I/R hasarının patogenezine benzetilmiştir. Mitokondriyal  $mitoK_{ATP}$  kanallarının aktivasyonu ile beyin nasıl korunduğu açık olmamakla beraber, LVS akut olarak  $mitoK_{ATP}$  kanallarının aktive edebilmektedir. Böylece  $K^+$  hücre içine girerek depolarizasyon ve mitokondriyal matrix volümünde genişleme olmaktadır. Hücre ölümünün hem nekrotik hem de apoptotik formlarında görülen mitokondri harabiyeti ile mitokondrideki  $Ca^{++}$  aşırı yükü koreledir. Miyokard ve nöronlar arasında derin fizyolojik ve anoksiye duyarlık farklılıkları olmasına rağmen benzer farmakolojik yaklaşım ile aynı mekanizma ile korunmaktadırlar (Roehl ve ark. 2012).

Bin ve ark. ları (Bin ve ark. 2012), Çinde geliştirilen ve LVS benzer etkili, yeni, kalsiyum kanal duyarlılığını artırıcı ajan; piperfentonamine hidroklorid (PPTA)'in, fokal serebral iskemik hasara karşı lipid peroksidasyonunu inhibe ederek ve serbest radikalleri süpürerek antiapoptotik özelliği ile iskemik hasarı azalttığı bildirilmiştir. Yine iskemik hasara bağlı gelişen hafıza yetersizliğini, nöroinflamasyonu azaltarak giderdiği ve nöroprotektif etkili olduğunu gösterilmişlerdir. Kalsiyum duyarlılığını artırıcı ajanların, hipokampustaki CA1

nöronların iskem/reperfüzyon hasarını geri döndürmüştür. Bu etkilerini kısmen de olsa antiapoptotok özelliği ile yapmıştır. İskemik hasarın giderilmesinde gelecekte kullanılabilir tedavi aracı olabileceği bildirilmiştir. Bizim deneyimizde de çok yüksek konsantrasyonlarında dahi LVS apoptotik bir etkisi olmadığı gösterilmiştir.

Levosimendan, kalbin pompa gücü azalmış hastalarda, hücre içinde kalsiyum duyarlılığını artırarak etki eden inotropik bir ajandır. Kalp cerrahisi geçirecek veya geçirmekte olan hastalarda, kalp cerrahisi sonrası nörolojik komplikasyonlar sıktır ve bu morbidite-mortaliteden sorumlu önemli etkendir. Kardiyak cerrahi geçiren olguların % 83 'ünde değişik derecelerde bazı kognitif fonsiyon bozukluğu olduğu bildirilmiştir. Sonuçta bu tip cerrahilerde nörolojik harabiyet riski yüksektir (Guerrero-Oriach ve ark. 2016). Bu gibi durumlarda LVS koruyucu olabilir.

Kalsiyumun hücre içinde artması, nöron iskemisinin patofizyolojisinde önemli rol oynar ve nöron dejenerasyonunu tetikleyen biri dizi olayı başlatır. Kalsiyumun hücre içine girişi ile nitrik oksit sentaz, kalsiyum-duyarlı proteaz ve mitokondrial harabiyet aktive edilerek, hücre membranı, sitoskeleton ve genomik DNA kırılır (Lau 2010). Mitokondride içinde  $Ca^{++}$  alıkonmasında dramatik azalma, hücre ölümüne yol açar. (Arundine ve Tymianski 2003; Szydlowska ve Tymianski 2010). Hücrenin yaşaması ve apoptozis, kısmen fosfatidilinositol-3 kinaz (PI3K)-Akt sinyal yolağı ile ilgilidir. (Seta ve ark. 2001). LVS, PI3K–Akt yollarını regüle ederek kardiyak kontraktıl fonksiyonları düzeltmekte ve anti-iskemik özelliğini göstermektedir (Honisch ve ark. 2010; Wang ve ark. 2017). Beyinde de, kalsiyum duyarlılığını artıran ajanın iskem/reperfüzyon hasarında PI3K–Akt sinyallerine etki edip açık değildir. Ancak, Bin ve arkadaşları beyinde iskemik hasarın giderilmesinde kalsiyum duyarlılığını artırıcı ajanların, hücre içinde  $Ca^{++}$  homeostazisini sürdürerek, gelecekte iskemik stroğu tedavide yararlı olabileceklerini bildirmişlerdir (Bin ve ark. 2012).

LVS'in nöron hücrelerinde I/R hasarını apoptozisi önleyerek nöroprotektif etki gösterdikleri bildirilmiştir (Lafci ve ark 2008). Apoptozis iskemik hücrenin bir özelliğidir. I/R hasarı sonrasında hücre ölümünün düzenlenmesinde kritik önemdedir. LVS hücre içinde aşırı  $Ca^{++}$  birikimini engeller. I/R hasarında hücre içinde  $Ca^{++}$  un artması hücrede ilk bulgudur. LVS serbest radikalleri süpürerek, lipit peroksidasyonunu inhibe ederek serebral iskemiyeye karşı nöronları koruyucu etkisi

olduğu bilinmekle beraber apoptotik yolları uyurmadığı bizim çalışmamızda gösterilmiştir.

Bir diğer açıklayıcı etki mekanizması, *invivo* çalışmalarda gösterildiği gibi, fosfodiesteraz III'ün inhibisyonu, kalsiyum desensitizasyonu veya adenosin trifosfat duyarlı potasyum kanallarının ( $K^+_{ATP}$ ) açılmasına bağlı gelişen vazodilatasyondur (Lafci ve ark 2008) Bu mekanizmanın nöroproteksiyon için geçerliliği tartışılmaktadır. Kanser hücresi olan bizim nöronların çoğalma fazından nöron karakterine dönüşmesi yani diferansiye olması 2 faktore beğli olarak görülür. Birincisi ortamdan proteinlerin çekilmesi ikincisi ise dibutiril-cAMP. cAMP burada nörit uzamasını teşvik eden önemli faktördür. Nörit uzamasını sağlar. Nöronun sağlıklı klaması ile sonuçlanır. LVS klinikte kullanılan konsantrasyonlarda nörit uzamsını artırmıştır.

Beyin hasarı modellerinin farklılıkları mekanizmaların açıklanmasını sınırlamaktadır. *Invivo* modellerde, kapalı kafatası içinde sıkışmış şiş beyinle ilgili, global veya lokal iskemi ve diğer sistemik değişkenlerle ilgili hasar yolları devreye girmektedir (Roehl ve ark. 2010). Bu da *invivo* modellerin yetersizliğidir. Bu nedenden ötürü bulgularımızın hayvan deneyleri ile doğrulanması gerekir.

Levosimendan dozlarındaki farklılıklar, verilemesinde zamanlama, ilacın etkisini ve etki mekanizmalarının açıklanmasını sınırlamaktadır. Levosimendan'ın nöroprotektif özelliklerini gösterebilmesinde ilacın, patolojik olaydan önce veya hemen sonra verilmesi önem kazanmaktadır (Shimizu ve ark. 2002, Toller ve ark. 2015). Bizim çalışmamızda LVS akut olarak uygulanmış ve kronik kullanımda etkisi bilinmemektedir. Bu durumda açıklığa kazandırılması gerekmektedir. Ayrıca toksik nöronal hasara karşı etkisinde gösterilmesi LVS toksik hasara karşı etkisinin de bizlere gösterecektir.

Plaschkea ve ark.( Plaschkea ve ark. 2014), ratlarda deneysel orta mortalite düzeyinde sepsis yarattıktan 24 saat sonra 53  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bolus ve ardından 285  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{saat}$  sabit infüzyon dozunda, (48 dakika) intravenöz levosimendan uygulamışlardır. Sepsis sonrası 6. günde, levosimendan'ın rat korteks dokusunda ve kanda inflammatuar sitokin IL-(1 $\beta$ ), IL-6 ve TNF $\alpha$ ) düzeylerini düşürmediği ve apoptozisi azaltmadığı gösterilmiştir. Levosimendanın uzun sürede nöroprotektif etkili olmadığını bildirilmiştir. Levosimendan'ın dozuna ve/veya patolojiden uzun süre sonra uygulanmış olmasına bağlanmışlardır. Bizim çalışmamızda 24 saatlik uygulama ve

kandaki sabit konsantrasyonlarında nöronlara hasar vermediği gösterilmiştir. Bununla birlikte LVS kronik etkisi ve deney hayvanlarındaki etkisi mutlaka araştırılmalıdır. Bundan sonraki amacımıza uygun olarak deneysel hayvan modellerinde LVS etkisi araştırılacaktır. Bu noktaya olan bulgularımızla bile LVS nörotoksik bir etkisi olmadığı ve özellikle iskemik hadislerde nöronal hasar oluşturmadığı ve koruyucu etkisinin olması nedeniyle ilk kullanılması gereken ilaç olarak tercih edilmelidir.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Levosimendan'ın NB2a fare hücre kültür hattında herhangi bir şekilde ılımlı veya ciddi toksik etki göstermediği saptandı. Levosimendan hücre çoğalmasını etkilemedi. Kültür de oluşan hücre ölümleri apoptozisse değil nekroza bağlı olduğu apoptotik hücre sayısında bir değişme olmaması ile açıklanabilir. Bir  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda koruyucu etkisini artırdığı gözlemlendi. LVS, kalbin kasılma gücünü oksijen tüketimini artırmadan kuvvetlendiren anti-oksidan, anti-inflammatuar etkili inotropik ve vazodilatatör özelliklere sahip bir ilaçtır. (Papp ve ark.2012; Farmakis ve ark. 2016). Bu özellikleri ile Levosimendan, kalp cerrahisi geçirecek veya geçirmekte olan, kalbin pompa gücü azalmış kalp problemlili olgularda özellikle tercih edilmektedir (Putzu ve ark. 2018; Chen ve ark. 2018). Bu tür cerrahi girişimlerde ihtiyaç olduğunda LVS güvenle kullanılabilir ve özellikle beyin iskemi/reperfüzyon hasarı olan hastalarda kullanılması bu hasarı da engelleyebilir. Bununla birlikte kullandığımız yöntem, akut toksisite üzerine levosimendanın etkisini gösteren bir yöntemdir. Bu yöntem kronik toksisite durumlarında ilaçların nasıl bir etkisi olacağını göstermediği için kronik toksisite üzerine etkilerinin de sonraki çalışmalarla araştırılmalıdır. Bu ilaç uzun süreli kullanılan bir ilaç olmaması nedeniyle akut olaylarda nöronal hasar yapmadığı görülmüştür. Bununla birlikte akut ve subkronik nörotoksik hasar oluşan durumların tedavisinde ne tür etkisi olacağı bilinmemektedir. Bu konuda ileri çalışmalar yapılarak toksik hasar durumunda levosimendan ne yaptığı araştırılmalıdır. Eğer hasarı önleyici etkisi saptanırsa önemli bir tıbbi sorunun da çözüme kavuşacaktır. LVS kullanılması nöronal hasara neden olmadığı hatta 1 in  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda koruyucu olabileceği, nöronal hasarı olan hastalarda kullanılmasında sakınca oluşturmadığı, ancak bu bulguların hayvan deneyleri modelleri ile de gösterilemesi uygun olacaktır.



## 7. KAYNAKLAR

Abbasoğlu ÖE, Hoşal BM. Apoptosis: It's place in eye diseases. *T Klin J Ophthalmol* 2001; 10: 115-120.

Altieri DC. Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms, *Biochem J* 2010; 1;430(2): 199-205

Arundine M, Tymianski M. Molecular mechanisms of calciumdependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* 2003; 34(4-5): 325-337.

Aydemir I, Kum Ş, Tuğlu Mİ. Histological investigations on thymus of male rats prenatally exposed to bisphenol A. *Chemosphere*. 2018; 206:1-8.

Baikoussis NG, Papakonstantinou NA, Apostolakis E. The "benefits" of the mini-extracorporeal circulation in the minimal invasive cardiac surgery era. *J Cardiol* 2014; 63(6): 391-396.

Bin J, Wang Q, Zhuo YY, Xu JP and Zhang HT. Piperphentonamine (PPTA) attenuated cerebral ischemia-induced memory deficits via neuroprotection associated with anti-apoptotic activity. *Metab Brain Dis* 2012; 27: 495–505

Cheung AT, Messé SR. Preventing Brain Injury After Cardiopulmonary Bypass Will Require More Than Just Dialing Up the Pressure. *Circulation*. 2018; 24;137(17): 1781-1783.

Chen P, Wu X, Wang Z, Li Z, Tian X, Wang J, Yan T. Effects of levosimendan on mortality in patients undergoing cardiac surgery: A systematic review and meta-analysis. *J Card Surg*. 2018; 33(6): 322-329.

Çolakoğulları M. BCL-2 Proteinin apoptoz yollakları üzerine etkisinin incelenmesi. *Uludağ Üniversitesi sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi, 2007.*

Ehrich M, Correll L, Veronesi B. Neuropathy target esterase inhibition by organophosphorus esters in human neuroblastoma cells. *Neurotoxicology*, 1994; 15(2): 309-313.

Farmakis D, Alvarez J, Ben Gal T, Drito D, Fedele F, Fonseca C, Gordon AC, Gotsman I, Grossini E, Guarracino F, Harjola VP, Hellman Y, Heunks L, Ivancan V, Karavidas A, Kivikko M, Lomivorotov V, Longrois D, Masip J, Metra M, Morelli A, Nikolaou M, Papp Z, Parkhomenko A, Poelzl G, Pollesello P, Ravn HB, Rex S, Riha H, Ricksten SE, Schwinger RHG, Vrtovec B, Yilmaz MB, Zielinska M, Parissis J. Levosimendan beyond inotropy and acute heart failure: Evidence of pleiotropic effects

on the heart and other organs: An expert panel position paper, *Int. J. Cardiol.* 2016; 222: 303–312.

Flaskos J, McLean WG, Fowler MJ, Hargreaves AJ. Tricresyl phosphate inhibits the formation of axon-like processes and disrupts neurofilaments in cultured mouse N2a and rat PC12 cells. *Neurosci Lett* 1998; 242(2): 101-104

Fontes MT, McDonagh DL, Phillips-Bute B, Welsby IJ, Podgoreanu MV, Fontes ML, Stafford-Smith M, Newman MF, Mathew JP. Arterial hyperoxia during cardiopulmonary bypass and postoperative cognitive dysfunction. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2014; 28(3): 462-466.

Fryer RM, Eells JT, Hsu AK, Henry MM, and Gross GJ. Ischemic preconditioning in rats: role of mitochondrial KATP channel in preservation of mitochondrial function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278: H305–H312.

Grover GJ, Dzwonczyk S, and Sleph PG. Reduction of ischemic damage in isolated rat hearts by the potassium channel opener RP 52891. *Eur J Pharmacol* 1990; 191: 11–19.

Guerrero-Orriach JL, Ariza-Villanueva D, Florez-Vela A, Garrido-Sánchez L, Moreno-Cortés MI, Galán-Ortega M, Ramírez-Fernández A, Alcaide Torres J, Fernandez CS, Navarro Arce I, Melero-Tejedor JM, Rubio-Navarro M, Cruz-Mañas J. Cardiac, renal, and neurological benefits of reoperative levosimendan administration in patients with right ventricular dysfunction and pulmonary hypertension undergoing cardiac surgery: evaluation with two biomarkers neutrophil gelatinase-associated lipocalin and neuronal enolase. *Ther Clin Risk Manag* 2016; 21;12: 623-630.

Jorgensen K, Bech-Hanssen O, Houltz E, Ricksten SE. Effects of levosimendan on left ventricular relaxation and early filling at maintained preload and afterload conditions after aortic valve replacement for aortic stenosis. *Circulation.* 2008;117: 1075–1081.

Harmon DC, Ghori KG, Eustace NP, O’Callaghan SJF, O’Donnell AP, Shorten GD. Cardiothoracic Anesthesia, Respiration and Airway Aprotinin decreases the incidence of cognitive deficit following CABG and cardiopulmonary bypass: a pilot randomized controlled study. *Can J Anesth* 2004; 51(10): 1002–1009.

Harry GJ, Billingsley M, Bruinink A, Campbell IL, Classen W, Dorman DC, Galli C, Ray D, Smith RA, Tilson HA. In Vitro Techniques for the Assessment of Neurotoxicity. *Environ Health Perspect* 1998; 106: 131-158.

Hein M, Roehl AB, Baumert JH, Scherer K, Steendijk P, Rossaint R, Hein M, Roehl A, Rossaint R. Anti-ischemic effects of inotropic agents in experimental right. *Acta Anaesthesiol Scand* 2009; 53: 941-8.

Honisch A, Theuring N, Ebner B, Wagner C, Strasser RH, Weinbrenner C. Postconditioning with levosimendan reduces the infarct size involving the PI3K pathway and KATP-channel activation but is independent of PDE-III inhibition. *Basic Res Cardiol* 2010; 105: 155–167.

Hudetz JA, Iqbal Z, Gandhi SD, Patterson KM, Byrne AJ, Pagel PS. Postoperative delirium and short-term cognitive dysfunction occur more frequently in patients undergoing valve surgery with or without coronary artery bypass graft surgery compared with coronary artery bypass graft surgery alone: results of a pilot study. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2011; 25(5): 811-816

Kelm RF, Wagenführer J, Bauer H, Schmidtman I, Engelhard K, Noppens RR. Effects of levosimendan on hemodynamics, local cerebral blood flow, neuronal injury, and neuroinflammation after asphyctic cardiac arrest in rats. *Crit Care Med* 2014 ;42(6):e410-4197.

Kiechle FL, Zhang X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. *Clin Chim Acta* 2002; 326: 27-45

Kivikko M, Antila S, Eha J, Lehtonen L, Pentikäinen PJ. Pharmacokinetics of levosimendan and its metabolites during and after a 24-hour continuous infusion in patients with severe heart failure. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2002; 40: 465–471.

Lafci B, Yasa H, Ilhan G, Ortac R, Yilik L, Kestelli M, Goktogan T, Gurbuz A. Protection of the spinal cord from ischemia: comparative effects of levosimendan and iloprost. *Eur Surg Res* 2008; 41:1-7.

Lanneau D, Brunet M, Frisan E, Solary E, Fontenay M, Garrido C. Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2008; 12: 43–61.

Lau A, Tymianski M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch* 2010; 460:525–542.

Li P, Nijhava nDI, Srinivasula SM, Ahmad, M, Alnemri, ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; 91: 79-89.

McLean WG, Holme AD, Janneh 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.

Magruder JT, Fraser CD, Grimm JC, Crawford TC, Beaty CA, Suarez-Pierre A, Hayes RL, Johnston MV, Baumgartner WA. Correlating Oxygen Delivery During Cardiopulmonary Bypass With the Neurologic Injury Biomarker Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L1 (UCH-L1). *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2018; In Press, Corrected Proof: doi.org/10.1053/j.jvca.2018.05.021

Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, Drouet C, Robert C, Guillermet C, Brambilla C, Brambilla E. "In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations". *J Histochem Cytochem.* 1996; 44 (9): 959–968.

Öktem S, Özhan MH, Özol D. Apoptozisin Önemi. *Toraks Dergisi* 2001; 2(1):91-95

Papp, I, Édes, S. Fruhwald, S.G. De Hert, M. Salmenperä, H. Leppikangas, A. Mebazaa, G. Landoni, E. Grossini, P. Caimmi, A. Morelli, F. Guarracino, R.H.G. Schwinger, S. Meyer, L. Algotsson, B.G. Wikström, K. Jörgensen, G. Filippatos, J.T. Parissis, M.J.G. González, A. Parkhomenko, M.B. Yilmaz, M. Kivikko, P. Pollesello, F. Follath, Levosimendan: molecular mechanisms and clinical implications: consensus of experts on the mechanisms of action of levosimendan, *Int. J. Cardiol.* 2012; 159:82–87.

Parissis JT, Andreadou I, Bistola V, Paraskevaidis I, Filippatos G, Kremastinos DT. Novel biologic mechanisms of levosimendan and its effect on the failing heart. *Expert Opin Investig Drugs* 2008; 17(8):1143-50.

Pataricza J, Krassói I, Höhn J, Kun A, Papp JG. Functional role of potassium channels in the vasodilating mechanism of levosimendan in porcine isolated coronary artery. *Cardiovasc Drugs Ther* 2003; 17(2):115-121.

Plaschkea K, Benta F, Wagner S, Zorn M, Kopitzca J. In contrast to its anti-inflammatory and anti-apoptotic peripheral effect, levosimendan failed to induce a

long-term neuroprotective effect in a rat model of mild septic encephalopathy: A pilot study. *Neuroscience Letters* 2014; 560: 117– 121.

Putzu A, Clivio S, Belletti A, Cassina T. Perioperative levosimendan in cardiac surgery: A systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis. *International Journal of Cardiology*. 2018; 251: 22-31.

Roehl AB, Hein M, Loetscher PD, Rossaint J, Weis J, Rossaint R, Coburn M. Neuroprotective properties of levosimendan in an in vitro model of traumatic brain injury. *BMC Neurol* 2010; 10-97; 1-4.

Roehl AB, Zoremba N, Kipp M, Schiefer J, Goetzenich A, Bleilevens C, Kuehn-Velten N, Tolba R, Rossaint R and Hein M. The effects of levosimendan on brain metabolism during initial recovery from global transient ischaemia/hypoxia. *PMC* 2012; 12-81:1-10.

Sauër AC, Veldhuijzen DS, Ottens TH, Slooter AJC, Kalkman CJ, van Dijk D. Association between delirium and cognitive change after cardiac surgery. *Br J Anaesth*. 2017; 19(2):308-315.

Scatena R. Mitochondria and cancer: a growing role in apoptosis, cancer cell metabolism and dedifferentiation. *Adv Exp Med Biol* 2012; 942:287-308

Scheiermann P, Beiras-Fernandez A, Mutlak H, Weis F. The protective effects of levosimendan on ischemia/reperfusion injury and apoptosis. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov* 2011; 6(1): 20-26.

Seta KA, Yuan Y, Spicer Z, Lu G, Bedard J, Ferguson TK, Pathrose P, Cole-Strauss A, Kaufhold A, Millhorn DE. The role of calcium in hypoxia-induced signal transduction and gene expression. *Cell Calcium* 2001; 36: 331–340

Setou M, Hayasaka T, Yao I. Axonal transport versus dendritic transport. *J. Neurobiol* 2003; 58(2): 201-216.

Shea TB. Selective stabilization of microtubules within the proximal region of developing axonal neurites. *Brain Res Bull* 1999; 48(3):255-261.

Shimizu K, Lacza Z, Rajapakse N, Horiguchi T, Snipes J, Busija DW. MitoK<sub>ATP</sub> opener, diazoxide, reduces neuronal damage after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283: H1005–H1011.

Sjogren G, Sletten G, Dahl JE. Cytotoxicity of dental alloys, metals and ceramics assessed by Millipore filter, agar overlay and MTT tests. *J Prosthet Dent* 2000; 84: 229-236.

Sukumaran V, Tsuchimochi H, Fujii Y, Hosoda H, Kangawa K, Akiyama T, Shirai M, Tatsumi E, Pearson JT. Ghrelin Pre-treatment Attenuates Local Oxidative Stress and End Organ Damage During Cardiopulmonary Bypass in Anesthetized Rats. *Front Physiol* 2018; 9: 196-199.

Sreedhar AS, Csermely P. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy A comprehensive review. *Pharmacology Therapeutics* 2004;101: 227–257.

Stone JD, Peterson AP, Eyer J, Oblak TG, Sickles DW. Neurofilaments are nonessential to the pathogenesis of toxicant-induced axonal degeneration. *J Neurosci* 2001; 21(7): 2278-2287.

Szydłowska K, Tymianski M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium* 2010; 47:122–129.

Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: Enemies Within. *Science* 1998; 281 (5381): 1312–1316.

Toller W, Heringlake M, Guarracino F, Algotsson L, Alvarez J, Argyriadou H, Ben-Gal T, Černý V, Cholley B., Eremenko A, Guerrero-Orriach JL, Järvelä K, Karanovic N, Kivikko M, Lahtinen P, Lomivorotov V, Mehta RH, Mušič S, Pollesello S, Rex S, Riha H, Rudiger A, Salmenperä M, Szudi L, Tritapepe L, Wyncoll D, Öwall A. Preoperative and perioperative use of levosimendan in cardiac surgery: European expert opinion. *International Journal of Cardiology* 2015; 184; 323-336.

Vural K, Tuglu MI. Neurotoxic Effect Of Statins On Mouse Neuroblastoma NB2a Cell Line. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci* 2011; 15: 985-991.

Wang J, Chen Han, Zhou Y, Su Q, Liu T, Li L. Levosimendan Pretreatment Inhibits Myocardial Apoptosis in Swine after Coronary Microembolization. *Cell Physiol Biochem* 2017; 41: 67-78.

**EKLER**

## ÖZGEÇMİŞ

<b>Adı Soyadı</b>	Tülün	<b>Soyadı</b>	Öztürk
<b>Doğum Yeri</b>	Acıpayam DENİZLİ	<b>Doğum Tarihi</b>	30.04.1962
<b>Uyruğu</b>	TC	<b>Tel</b>	05323751437
<b>E-mail</b>	ozturktulun@yahoo.com		

### Eğitim Düzeyi

	<b>Mezun Olduğu Kurumun Adı</b>	<b>Mezuniyet Yılı</b>
<b>Prof.</b>	Manisa Celal Bayar Üniversitesi	2016
<b>Doç.</b>	Manisa Celal Bayar Üniversitesi	2010
<b>Yüksek Lisans</b>	İzmir Atatürk Eğitim Araştırma Hastanesi.	1997
<b>Lisans</b>	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi	1985

### YÖNETİM KURULU KARARI

arih ve Sayısı: 06/05/2016-35704



**CELAL BAYAR**  
ÜNİVERSİTESİ

T.C.  
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

Sayı : 28233352-730.03.02  
Konu : Yönetim Kurulu

**SBE-FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA**

Anabilim Dalı Başkanlığı'nızın, Yüksek Lisans Öğrencisi Tülün ÖZTÜRK'ün "Levosimendanın Neuroblastoma NB2a Hücre Kültürü Üzerine Etkileri" başlıklı tez konusunun Etik Kurul onayı alınmış olması nedeniyle kabulüne, 29.04.2016 tarihli Enstitü Yönetim Kurulu'nda **OY BİRLİĞİYLE** karar verildi.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

**e-İmzalıdır**  
Prof. Dr. Ayşe AKTAŞ  
Enstitü Müdürü





## ETİK KURUL ONAYI

T.C.  
Manisa Celal Bayar Üniversitesi  
Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Etik Kurulu  
Karar Formu

KARAR TARİH / NO	23 / 11 / 2016 / 20.478.486 - 370						
ARAŞTIRMANIN ADI	Levosimendan'ın neuroblastoma NB2a hücre kültürü üzerine etkileri						
SORUMLU ARAŞTIRMACI	Doç. Dr. Kamil VURAL -CBÜ Farmakoloji AD						
ARAŞTIRMA EKİBİ	Doç. Dr. Tülün Öztürk,- Uz. Dr.İşıl AYDEMİR						
ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	UZMANLIK TEZİ <input type="checkbox"/>		YÜKSEK LİSANS--DOKTORA TEZİ <input type="checkbox"/>		AKADEMİK AMAÇLI <input type="checkbox"/>		
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	21 / 11 / 2016 / Tarih ve 341 sayılı; Arş. Gör. Bedirhan Ay'ın araştırma ekibinden çıkarılması konulu dilekçe						
KARAR BİLGİLERİ	Dilekçe incelenmiş, bilimsel ve etik açıdan UYGUN olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir						
Unvanı/Adı/Soyadı		Araştırma ile ilişkisi Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye	Unvanı/Adı/Soyadı		Araştırma ile ilişkisi Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye
Prof. Dr. Zeki ARI Tıbbi Biyokimya AD	-102 =	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Doç. Dr. Ayşen TÜREDİ YILDIRIM Çocuk Hematolojisi		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Doç. Dr. Erol OZAN Psikiyatri AD		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Yrd. Doç. Dr. Selim ALTAN Tıbbi Etik AD		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Doç. Dr. Beyhan Cengiz ÖZYURT Halk Sağlığı AD		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Yrd. Doç. Dr. Dilek ÇEÇEN Cerrahi Hemşireliği AD		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Doç. Dr. Tuğba ÇAVUŞOĞLU Farmakoloji AD		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Mukadder YILMAZER Avukat		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Doç. Dr. Serdar TÖK BESYO		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	İhsan AVCI Sivil Üye		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
<p>Etik Kurulumuzun kararı yukarıda belirtilmiştir. <u>Araştırmanız Her Hangi Bir Aşamada Etik Kurulumuzun "İzleme – Denetleme" Görevi Gereği Lüzumu Halinde Haberli / Habersiz Olarak Denetlenebilir</u>, Araştırma Başvuru Formunun Taahhütname – Bölüm E kısmında belirtilmiş olan hususların dikkate alınarak istenilen bilgilerin Etik Kurulumuza zamanında iletilmesi konusunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.</p>							
<p>-102 = Prof. Dr. Zeki ARI Başkan</p>							