

157073

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PRİMER MİKST GLİA HÜCRE KÜLTÜRÜNDE
GLUTAMAT TOKSİSİTESİ ÜZERİNE
MELATONİN, 7-NİTROİNDAZOL VE
RİLUZOLUN ETKİLERİ**

Fizyoloji Programı

DOKTORA TEZİ

Tip Doktoru Taner Dağcı

Tez Danışmanı Prof. Dr. Gönül Peker

İZMİR- 2004

TEŐEKKÜR

Ege Üniversitesi Tıp Fakóltesi Fizyoloji Anabilim Dalında Doktora eğitimim süresince her türlü desteği sağlayan tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Gönül Peker`e, Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Şakire Pöđün`e, tez izleme komitemdeki Sayın Prof. Dr. Fatma Kutay`a, tezimin her aşamasında yardımcı olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Özlem Yılmaz`a ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Dilek Taşkırın`a, ayrıca yetişmemde emeği geçen Anabilim Dalımız tüm öğretim üyelerine ve her aşamada bana destek olan biricik kızım ve sevgili eşime sonsuz teşekkürler ederim.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	1
BÖLÜM I.....	4
GİRİŞ ve AMAÇ	4
GENEL BİLGİLER.....	6
Glia Hücreleri	6
Glia Hücre Kültürü.....	9
Glia Hücre Kültürünün Dezavantajları	12
Melatonin (M)	13
Melatoninin Nöronların Korunmasındaki Rolü.....	14
7-Nitroindazol (7-NI).....	16
Riluzol (Ril)	17
Glutamat	18
Eksitotoksisite	21
BÖLÜM II.....	24
GEREÇ VE YÖNTEM	24
HÜCRE KÜLTÜRÜ	24
• Kullanılan kimyasal malzeme	24
• Gereçler	25
• Çalışma Şekli	26
Üretim Besiyerinin Hazırlanması.....	26
Primer Hücre Kültürünün Hazırlanması.....	26

Hücrelerin Elde Edilmesi.....	26
Hücrelerin Ekilmesi.....	27
Hücrelerin Yaşatılması	28
İMMUNOSİTOKİMYA	28
• Kullanılan kimyasal malzeme	28
• Gereçler	29
• Çalışma Şekli	29
İmmunolojik Boyama	29
MİKROSKOP GÖRÜNTÜLEME YÖNTEMİ.....	30
• Gereçler	30
• Çalışma Şekli	30
Toksisitenin Oluşturulması:	31
GRUPLAR:	33
LAKTİK DEHİDROGENAZ (LDH) ÖLÇÜMÜYLE TOKSİSİTE TAYİNİ..	33
• Kullanılan kimyasal malzeme	33
• Gereçler	34
• Çalışma Şekli	34
TOTAL NİTRİT TAYİNİ.....	35
• Kullanılan kimyasal malzeme	35
• Gereçler	35
• Çalışma Şekli	36
Çözeltilerin hazırlanması	36

Örneklerin hazırlanması	36
İstatistiksel Analiz	36
BÖLÜM III	38
BULGULAR	38
Glia Hücrelerinin Belirlenmesi:	38
LDH Aktivitesi:	40
Nitrit Düzeyleri:	42
BÖLÜM IV	46
TARTIŞMA	46
SONUÇ	54
ÖZET	55
SUMMARY	57
ÖZGEÇMİŞ	59
KAYNAKLAR	60
KISALTMALAR	84
ŞEKİL ve RESİM LİSTESİ	86

BÖLÜM I

GİRİŞ ve AMAÇ

Glia, çok uzun yıllar beyinde sinir hücrelerini bir arada tutmaya yarayan tutkal olarak düşünülmüş bir hücre grubudur. Son yıllarda, glia hücrelerinin santral sinir sistemindeki birçok yeni fonksiyonlarının varlığı kabul edilmektedir. 1970 ve 80'li yıllarda yöntem konusundaki iki önemli gelişme astrosit hücre kültürü çalışmalarına çok önemli yeni bir boyut getirmiştir. Bunlardan birincisi, immatür beyin dokularından çok miktarda glia elde edilmesi, diğeri ise bu kültürlerdeki hücrelerin tanımlanmasında çok önemli bir kriter olan immunolojik "marker"ların bulunmasıdır. Bu iki yeni yaklaşım sayesinde bugün artık glia kültürü elde etmek 20 yıl öncesine göre daha olanaklı hale gelmiştir. Oluşturulan glia hücre kültürlerinde glia davranışlarının *in-vitro* gibi denetleyebildiğimiz koşullarda incelenmesi özel bir önem kazanmaktadır.

Biz, bu tez çalışmasını gerçekleştirmek üzere Anabilim Dalımızda yapılan hücre kültürü çalışmalarının ışığı altında ve daha önce projeler

kapsamında *in-vivo* olarak yürüttüğümüz deneysel spinal lezyon ve fokal iskemi çalışmalarının bir devamı olarak düşündüğümüz glutamat toksisitesi oluşturulmuş astrosit kültüründe melatonin, 7-nitroindazol ve riluzolün etkilerini araştırmayı amaçladık.

Sinir sistemi hastalıkları ve düzensizliklerinin önemli bir bölümüne henüz semptomatik yaklaşımlar sürdürülmekte ancak, patolojilerin altında yatan nedenler anlaşıldıkça çözümler ya da patolojilerden korunma yolları ortaya çıkmaktadır. Hastalıkların etiopatogenezlerinin araştırıldığı yerler genellikle ileri teknolojiye sahip laboratuvarların bulunduğu araştırma merkezleridir ve çalışmalar çoğunlukla *in-vitro* koşullarda gerçekleştirilmektedir. Bugün için, santral sinir sistemi patolojilerine yol açan süreçlerin başında iskemi ve bunu izleyen glutamat artışı ve asidite yer almaktadır. Glutamat artışından astrositlerin nasıl etkilendiği ise tam olarak bilinmemektedir. Bu çalışmadan elde edilebilecek sonuçların bu konudaki klinik yaklaşımlarda da yararlanılabilecek bilgiler oluşturması açısından önemli olduğuna inanıyoruz.

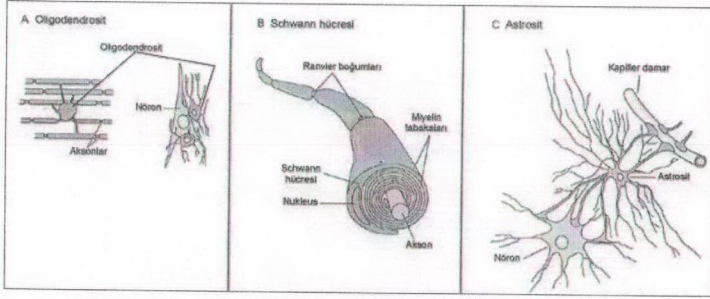
GENEL BİLGİLER

Glia Hücreleri

Glia hücrelerinin miyelinizasyon özelliği dışındaki morfolojik özellikleri ilk defa 1824 yılında Dutrochet tarafından tanımlanmıştır . Virchow 1860 yılında santral sinir sisteminde nöronların çevresinde bulunması nedeniyle "nerve glia" veya nöroglia kavramını ortaya atmıştır. Bazı karşı görüşlerin bulunmasına karşın nöron ve glia hücrelerinin farklı kök hücrelerden köken aldığı düşünülmektedir (Bottenstein & Sato, 1985). Günümüzde yaygın olarak kabul edilen sınıflamada omurgalı sinir sisteminde glia hücreleri iki büyük ana grupta toplanırlar: Mikroglia ve makroglia hücreleri. Mikroglia hücreleri enfeksiyon, travma gibi hastalıklar sırasında mobilize olan fagositik hücrelerdir. Makrofajlardan köken alırlar, fizyolojik ve embriyolojik olarak sinir sisteminin diğer hücreleriyle ilişkili değildirler. Makroglia hücreleri 3 farklı tipten oluşur; Oligodendrositler, Schwann hücreleri ve Astrositler (Resim I). Oligodendrositler ve Schwann hücreleri daha az sayıda ve daha küçük uzantıları olan hücrelerdir. Bu hücreler, elektriksel sinyallerin iletimini artıran miyelin kılıfı oluşturarak aksonu çevresinden izole ederler. Oligodendrositler santral sinir sisteminde, Schwann hücreleri periferik sinir sisteminde bulunan aksonların çevresinde

miyelin kılıf oluşturur. Oligodendrositlerin sitoplazmaları, astrositlere göre daha yoğundur, çekirdekleri daha koyu boyanır ve dendritik uzantıları parlaktır. Bunlarda, astrositlerde bulunan 90 °A'luk filamentler yerine 240 °A'luk filamentler mevcuttur (Bottenstein *et al.*, 1985; Federoff & Richardson, 1992).

Astrositler glia hücre grubunun en fazla sayıda bulunan, daha fazla fonksiyona sahip hücre grubudur. Penfield tarafından 1932 yılında, yuvarlak çekirdekleri, geniş düzensiz sitoplazmaları olan parlak görüntülü hücreler olarak tanımlanmışlardır. Günümüzde kabul edilen ayırd edici özellikleri sitoplazmalarında glikojen granüllerinin bulunması ve çekirdekleri çevresinde ve uzantılarında 90 °A boyutunda filamentlerden oluşan demetlerin bulunmasıdır. Hücre gövdeleri çeşitli şekillerde bulunabilir, çoğunlukla uzun uzantıları vardır. Nöron hücreleri üzerinde uç-ayaklar (end-feet) oluştururlar. Sinaptik bölgede bulunan astrositler bazı nörotransmitterlere yüksek afinite göstererek onları sinaptik aralıktan uzaklaştırırlar. Kan beyin bariyeriyle uç ayaklarla temasta bulunarak nöronların beslenmesini sağlar. Hasarlı dokuda oluşan debridleri mikroglia hücreleri ile birlikte uzaklaştırarak doku iyileşmesine yardımcı olurlar. Yüksek nöron aktivitesi sırasında nöronlar tarafında salgılanan K^+ fazlalığını tamponlarlar. Hasar sonrasında morfolojik değişikliğe uğrayarak reaktif astrositleri oluştururlar (Dusart, Marty, & Peschanski, 1991).



Resim I: Glia hücreleri

Astroisitler morfolojik özelliklerine göre iki grupta toplanırlar:

Fibröz astroisitler (Tip I) ve Protoplazmik astroisitler (Tip II).

Fibröz astroisitler beyaz cevherde yaygın olarak bulunurlar. Morfolojik yapıları düzensizdir, genelde bir veya birkaç uzantısı diğerlerinden daha kalındır. Birçok nörotransmitter ve iyon kanalı eksprese ederler. Nöronlardakine benzer olarak kalsiyum, araşidonik asit, cAMP, cGMP gibi birçok ikinci haberci sistemini aktive ederek enzim indüksiyonu, nöromodülatör sekresyonu gerçekleştirir (Bottenstein *et al.*, 1985).

Protoplazmik astroisitler gri cevherde daha yaygındır. Nöronal aktiviteyle ilgili süreçlerde yer alırlar. Eksitatör aminoasit, GABA gibi transmitterler için geri alım (uptake) mekanizmaları mevcuttur. Pürinerjik, kolinerjik reseptörlerle intrasellüler kalsiyum düzeyini

regüle ederler. Kapillerle daha yakın ilişkilidirler. Bergman Giası gibi özelleşmiş tipleri mevcuttur (Bottenstein *et al.*, 1985).

Glia hücrelerinin özellikleri aşağıdaki gibi özetlenebilir:

Beyin dokusunu oluşturacak şekilde destek elemanı fonksiyonları vardır, nöron gruplarını birbirinden ayırır ve izole ederler.

Miyelin kılıf oluşturarak geniş aksonların çoğunu izole ederler, elektriksel sinyalin hızlı şekilde iletilmesini sağlarlar.

Hasarlanma ve nöron ölümü sonrasında doku artıklarını uzaklaştırır

Ekstrasellüler alanda K^+ iyon fazlalığını tamponlar, sinaptik ileti sırasında nöronlar tarafından salgılanan kimyasal transmitterleri uzaklaştırır.

Gelişim evresi sırasında nöron göçüne ve akson büyümesine rehberlik ederler.

Beyin kapiller ve endotel hücreleriyle sıkı bağlantılar yaparak kan beyin bariyeri oluşumuna katkıda bulunurlar,

Nöronları besleyici özelliklerini destekleyen kanıtlar mevcuttur (Bottenstein *et al.*, 1985; Federoff *et al.*, 1992).

Glia Hücre Kültürü

Doku kültürü, oldukça yoğun bir emek ve malzeme tüketimi gerektiren ancak kazandırdığı bilgiler açısından bugün biyolojik temel bilimlerde yapılan araştırmalarda çok faydalanılan bir tekniktir. Bugün için doku

kültürü yapılan hücreler arasında en zor grubu santral sinir sistemi hücreleri oluşturmaktadır. Bu grupta yer alan glia hücreleri de hücre kültürü ortamında üzerinde en yoğun çalışılan hücre topluluklarından biridir. Primer hücre kültürleri aktif metabolik yapıya sahip hücrelerin araştırılması amacıyla oluşturulan bir modeldir. 1900 lerin başında Harrison ve Carrel tarafından çalışılmaya başlanmıştır. Harrison'un kültür ortamında nöronal gelişimi göstermesiyle bu alanda bir çığır açılmış, daha sonra sinaptogenez ve miyelinizasyon gibi özellikleri Peterson ve Murray tarafından kültürde gösterilmiştir. Kültüre sinir hücrelerinin yoğun olarak çalışmalarda kullanılmaya başlaması 1970`li yılların başında olmuştur.

Glia hücreleri santral sinir sistemi (SSS) hücre içeriğinde önemli bir orana sahiptir. Sinir sisteminin heterojenitesi nedeniyle glia hücreleri *in-vivo* koşullarda nöronlara göre çok daha güç çalışılan bir hücre grubudur. Nöronlar için kullanılabilen elektrofizyolojik tekniklerin, lezyon çalışmalarının glia hücrelerine uygulanamaması araştırmacıları *in-vitro* çalışmalara yönlendirmiş ve gliadan zengin hücre kültürü ortamları geliştirme yoluna itmiştir. Gliayı izole etme konusundaki ilk girişimler başka hücrelerin (fibroblast gibi) kontaminasyonu nedeniyle başarısız olmuştur. Ancak 1970 ve 80`li yıllardaki çalışmalarla glia hücre kültürlerinin saflaştırılması başarılabilmıştır.

Primer miks glia kültürü, astrosit, oligodendrosit ve mikroglidan oluşmuş bir grupta yeni doğan bir sıçan beyninden serum destekli bir ortamda elde edilmiştir (McCarthy & de Vellis, 1980). Hücre yoğunluğunun düşük olduğu bu grupta çok az oranda oligodentrosit, büyük miktarda astrosit hücreleri geliştirilmiştir. Serum destekli ortamlarda glial filamentlerden zengin astrositler tek tabaka oluşturarak gelişebilmiş bu gözlemlerden yola çıkılarak daha sonra geliştirilen yöntemler ile astrosit veya oligodendrositlerden oluşan saf hücre kültürleri elde etmek mümkün hale gelmiştir (Pixley & de Vellis, 1984).

İmmatür beyin dokusundan alınan hücreler daha hızlı bölünerek bir iki haftada tek tabakalı yoğun bir hücre tabakası oluşturabilirler. Bu hücrelerin glia hücre dizileri haline dönüştürülmesi de mümkün olmuştur. Primer kültür ortamlarında diğer hücrelere oranla daha hızlı gelişebildiği ve büyük oranlar oluşturabildiği için primer astrosit kültürleri daha çok tercih edilen bir model haline gelmiştir. Ayrıca zel immunolojik teknikler kullanılarak saf kültürler elde edilebilmiştir. Elde edilen glia hücrelerinin pekçok özelliği aşağıda gösterilmiştir (Woodhams, Basco, Hajos, Csillag, & Balazs, 1981) .

Bu zellikler:

Reseptör ekspresyonu,

Nörotrofik faktör sekresyonu,

Membran iyon geçirgenliği,

Enzim indüksiyonu,

Protein sentezi,

Nörotransmitter alımı,

Metabolik süreçler,

Lipid metabolizmasıdır.

Primer hücre kültürlerinin *in-vivo* ortamlarla paralellik göstermesi, çalışmaların çoğunun bu ortamlarda yapılmasına yol açmıştır.

Glia Hücre Kültürünün Dezavantajları

Glia hücreleri *in-vitro* çalışmalarda kullanılmakla birlikte dezavantajlara da sahiptir. Öncelikle immatür beyin dokusundan elde edilerek hazırlanmaktadır, kültür ortamındaki matürasyonun derecesi *in-vivo* ortamdakine paralel olmayabilir. Morfolojik özellikleri kullanılan besiyeri ortamına bağlı olarak değişebilmektedir, bu da matürasyon kriterlerinin yansıtılmasında bir engel oluşturabilir. Bu nedenle, *in-vivo* ortamı tam olarak yansıtmadığı akılda tutulmalıdır. Nöronların alt tipleri biyokimyasal ve morfolojik kriterlerle kültür ortamlarında daha kolay ayırd edilebilirken glia hücresinde bu ayırım daha zordur. Bazı özellikleri nöronlarla ilişkili olmalarından kaynaklanmaktadır. Örneğin, aksonlarla birlikte bulunan ve bulunmayan Schwann hücrelerinin özellikleri farklıdır (Bottenstein *et al.*, 1985; Federoff *et al.*, 1992).

Melatonin (M)

Melatonin bir nörohormondur. Epifizde melatonin sentezi karanlıkta uyarılan süperior servikal gangliondan gelen beta adrenerjik postganglionik sempatik sinir sistemi lifleriyle uyarılır (Stokkan *et al.*, 1991). Işık melatonin sentezinde inhibitör etkilidir (Kostoglou-Athanassiou, Treacher, Wheeler, & Forsling, 1998; Reiter, 1987). Melatoninin ön maddesi triptofandır. Triptofan pinealositlerde triptofan hidroksilazla 5-hidroksitriptofana hidroksillenir. 5-hidroksitriptofan aromatik L-aminoasit dekarboksilaz ile 5-hidroksitriptamine (serotonin) dekarboksillenir. N asetil transferaz, serotoninini N asetilserotonine dönüştürür. Bu da hidroksiindol-O-metiltransferazın etkisi ile melotonine dönüştürülür (Ebadi, Samejima, & Pfeiffer, 1993; Reiter, 1991b). Melatoninin yarılanma ömrü bir kaç dakikalık kısa bir süreyi izleyen ikinci ve uzun bir faza sahiptir. Ortalama yarılanma ömrü 5-40 dakika arasındadır (Kilic, 1999; Kopin, Pare, Axeirod, & Weissbach, 1961; Mallo *et al.*, 1990; Reiter, 1991a).

Melatonin reseptörleri başlıca sinir sistemi yapıları olan hipotalamus, orta beyin, hipofiz bezi, epifiz, periferel sinirler ve sinir sistemi dışında gonadlarda bulunur. Hipotalamustaki suprakiazmatik çekirdek, beyinde melatoninin en fazla ilişkide olduğu alan ve hedef doku olarak tanımlanmaktadır (Kilic, 1999; Sirotkin & Schaefer, 1997; Stankov,

Franceschini, & Reiter, 1991). Melatonin etkisini başlıca cGMP ve prostoglandinler aracılığı ile göstermektedir (Godson & Reppert, 1997; Klein, Auerbach, & Weller, 1981; Young, Gauthier, & Kiely, 1984).

Melatoninin Nöronların Korunmasındaki Rolü

Epifizden salgılanan melatoninin nöronlar üzerinde *in-vivo* ve *in-vitro* koruyucu bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Bettahi, Pozo, Reiter, Acuna-Castroviejo, & Guerrero, 1996; Guisti *et al.*, 1996; Kelly & Loo, 1997; Uz, Guisti, Franceschini, Kharlamov, & Manev, 1996). Yapılan araştırmalar melatoninin nöroproteksiyonda ve eksikliğinin de nörodejeneratif hastalıkların mekanizmasında rol oynadığını göstermektedir (Guisti, Lipartiti, Gusella, Floreani, & Manev, 1997; Kilic, 1999; Lezoualch, Skutella, Widmann, & Behl, 1996; Manev, Uz, Kharlamov, & Joo, 1996; Reiter, Guerrero, Escames, Pappolla, & Acuna-Castroviejo, 1997a). Melatonin hem suda hem de yağda çözünebilmektedir. Melatonin yüksek lipofilik özelliğe sahiptir (Mendez-Pelaez & Reiter, 1993; Pieri, Marra, & Moroni, 1994; Reiter, 1998). Bu özelliği melatoninin kan beyin bariyerini kolayca geçmesini sağlamaktadır. İntravenöz uygulamayı takiben birkaç dakika içinde beyin dokusuna geçebilmektedir (Pablos *et al.*, 1997; Pieri *et al.*, 1994; Reiter *et al.*, 1995). Yapılan araştırmalar melatoninin lipit peroksidasyona karşı koruyucu olduğunu göstermektedir, melatonin

organizmaların antioksidan savunmasında rol alabilir (Bubenik & Brown, 1997).

Melatoninin serbest radikalleri yakalayıcı etkisi: Primer olarak oldukça toksik olduğu bilinen hidroksil radikali, peroksinitrit anyonu ve peroksil radikallerini yakalamaktadır. Sekonder olarak ise, superoksit anyon radikalini yakaladığı ve singlet oksijeni baskıladığı belirlenmiştir. (Manev *et al.*, 1996; Pablos *et al.*, 1997).

Melatoninin antioksidan etkisi: Spesifik melatonin reseptörleri aracılığı ile antioksidan enzimlerin yapılmasını sağlayarak doku koruyucu özelliği göstermektedir. Antioksidan enzimler üzerine etkisini superoksit dismutazın mRNA düzeyini ve glutatyon peroksidaz, glutatyon reduktaz ve glukoz 6 fosfat dehidrogenazın aktivitesini arttırarak göstermektedir.

Melatonin bu etkilerine ek olarak prooksidatif bir enzim olan nitrik oksit sentazı (NOS) da inhibe etmektedir (Kilic, 1999; Mendez-Pelaez *et al.*, 1993; Reiter, 1991b). Tan ve arkadaşları melatoninin hidroksil radikalini giderme özelliğini araştırmışlar, glutatyon ve mannitolün hidroksil radikalini giderme özellikleri ile karşılaştırıldığında, melatoninin diğer ikisinden çok daha etkili olduğunu belirlemişlerdir (Tan, Chen, Poeggeler, Manchester, & Reiter, 1993). Melatoninin singlet oksijenin nörotoksik etkisini tersine çevirdiği gösterilmiştir. Melatonin, direkt olarak singlet oksijeni nötralize etmektedir (Reiter,

1998; Reiter *et al.*, 1997a; Reiter, Tang, Garcia, & Munos-Hoyos, 1997b).

Fizyolojik dozdaki melatoninin serebellar ve hipotalamik NOS aktivitesini önlediği gösterilmiştir (Bettahi *et al.*, 1996; Reiter *et al.*, 1997a) . Bu etkisini L-arginin ile aktive olan cGMP oluşumunu azaltarak yapmaktadır (Guerrero *et al.*, 1997). Ayrıca, melatonin, nöron membranındaki reseptörleri aracılığı ile hücre içine Ca^{2+} girişı ve uyarılabilirliğin artışıını önlemektedir (Reiter, 1991a).

7-Nitroindazol (7-NI)

Nitrik oksitin (NO) ilk keşfedildiği, 1980'lerin başından bu yana geçen kısa sürede çok önemli gelişmeler olmuş ve bu maddenin memelilerde oldukça önemli biyolojik etkilerinin bulunduğu gösterilmiştir. Yaklaşık onbeş yıldır sürdürülen çalışmaların sonuçlarına göre nitrik oksit vücutta endojen olarak üretilmekte ve hem fizyolojik hem de patolojik bir çok süreçte etkin olarak rol almaktadır. NO'in en önemli biyolojik rolü belki de onun bir nöromodülatör olarak gördüğü işlevdir. Dokularda nitrik oksit sentetaz (NOS) enziminin L-arginin'i okside etmesiyle NO ve sitrülin oluşur. Birçok NOS izoformu tanımlanmışsa da, bugün için iyi bilinen üç tane izoformu vardır. Bunlardan bir tanesi kalsiyumdan bağımsız, sitokinler ve endotoksinlerle indüklenen ve makrofajlarda bulunan indüklenebilir NOS'dur (iNOS veya NOS II). Bu

izoformu NO üretimi için tetrahidrobiopterine gereksinim gösterir. Diğer iki izoform ise yapısal olarak adlandırılan ve birisi endotelde (eNOS veya NOS III) diğeri ise nöronlarda (nNOS veya NOS I) karakteristik olarak lokalize edilen kalsiyum/kalmoduline bağımlı alt tiplerdir (Xu & Liu, 1998). Nöronal (nNOS) ve indüklenbilir (iNOS) NO sentaz nörotoksik etkili iken endotelial (eNOS) NO sentaz nöroprotektif etkilidir (Samdani, Dawson, & Dawson, 1997). Nitrik oksit, serbest radikal etkisi göstererek ve eksitotoksisiteyi artırarak nörodejeneratif etki göstermektedir (Dun, Dun, Forstermann, & Tseng, 1992; Faraci & Brain, 1995; Ikeda, Iwasaki, & Kinoshita, 1998).

7-Nitroindazol, oldukça spesifik bir nöronal NOS inhibitörüdür. İnvitro çalışmalar 7-Nitroindazol'un nNOS'u belirgin olarak inhibe ettiğini göstermiştir (Yoshida, Limmroth, Irikura, & Moskowitz, 1994). Bu özellikleri nedeniyle 7-Nitroindazol nöroprotektif olarak önerilmektedir.

Riluzol (Ril)

Riluzol (2-amino 6-trifluoromethoxy-benzothiazole) Na⁺ kanallarının α alt ünitlerine bağlanır, inaktif Na⁺ kanallarının stabilizasyonunu devam ettirir (Hebert, Drapeau, Pradier, & Dunn, 1994) ve voltaj kapılı Ca²⁺ kanallarını bloke eder. Ayrıca, güçlü glutamat salınımını engelleyici etkisi ve enerji metabolizmasını artırıcı etkisi ile nöron koruyucu özellikler taşır (Huang, Song, Nagata, Yeh, & Narahashi, 1997).

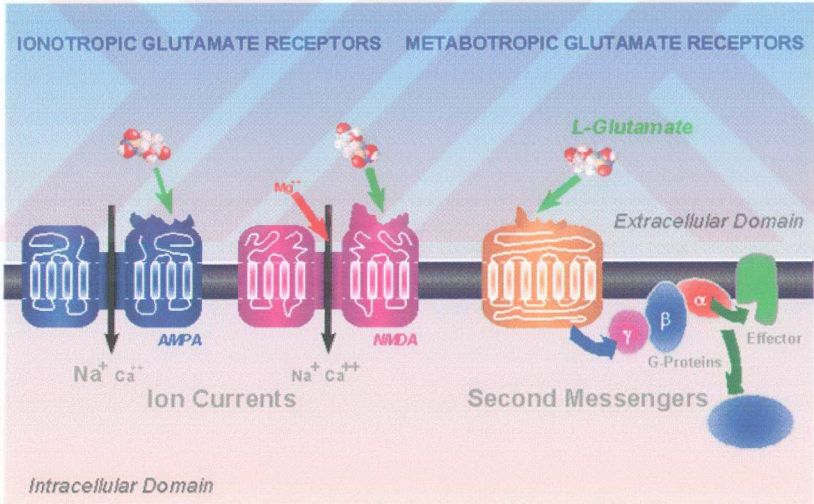
Riluzol hipoksi, serebral iskemi, omurilik yaralanmaları, beyin travmaları gibi akut ve Parkinson ve Huntington Hastalığı gibi kronik nörodejeneratif modellerde nöroprotektif etkilidir. Riluzol, amiyotrofik lateral sklerozis (ALS)'li hastalarda başarı ile kullanılmaktadır (Bensimon, Lacomblez, & Meininger, 1994; Rosas *et al.*, 1999; Wahl, Renou, Mary, & Stutzmann, 1997). Ayrıca anaplastik astrositoma ve glioblastoma multiforme (GBM) gibi beyin tümörlerinin tedavisinde de yeri vardır (Aronica *et al.*, 2001; Takano *et al.*, 2001).

Glutamat

Bir amino asit olan L-glutamat, memeli santral sinir sisteminin en önemli eksitatör nörotransmitteridir. Glutamat, özgül enzimi glutamik asid dekarboksilaz (GAD) ile metabolize edilmesine karşın, nöronal sinaptik transmisyonunun sonlandırılması ve glutamat konsantrasyonunun nörotoksik düzeylerin altında tutulmasında yüksek afiniteli glutamat taşıyıcıları da çok önemli rol oynamaktadır (Dingledine & McBain, 1999; Tanaka, 2000). Günümüzde farklı 5 tane glutamat taşıyıcısı bilinmektedir. Glutamat-aspartat taşıyıcısı (GLAST), glutamat taşıyıcısı-1 (GLT-1) ve eksitatör amino asid taşıyıcısı (EAAC₁₋₃) olarak isimlendirilmiş olup moleküler yapıları klonlama ile ortaya çıkarılmıştır. Santral sinir sisteminde, GLT-1 ve GLAST özellikle glia hücrelerinde eksprese edilir. GLT-1 özellikle talamus ve

serebellumda yüksek konsantrasyonlarda bulunurken hipokampus, korteks ve striatumda düşük konsantrasyondadır. GLAST immünoreaktivitesi ise en yoğun olarak serebellumda saptanmıştır (Dingledine *et al.*, 1999).

Eksitator amino asit (EAA) reseptörleri agonistlerine bağı olarak 5 kategoride sınıflandırılır. Bunlardan, yüksek ve düşük afiniteli kainat (KA), amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoazol propionik asit (AMPA), N-metil-D-aspartat (NMDA) ve kuiskilat (QUIS) iyon kanalları aracılığı ile işleyen iyonotropik reseptörlerdir. (Kilic, 1999). Glutamat reseptörleri resim 2 de özetlenmiştir.



Resim 2: Glutamat reseptörleri (Leighton *et al* 2001)

Glutamatın metabotropik reseptörleri, tipik 7 transmembranik alanı ile G protein bağlantılı olup, ya hücre içi inositol trifosfat (IP3) ve diaçil gliserol (DAG) seviyelerini yükseltir ya da hücre içi cAMP düzeylerini düşüren serpantin reseptörleridir (Aronica *et al.*, 2001).

Glutamatın, glutamat taşıyıcısı ile taşınması termodinamik olarak en azından 2 Na⁺, 1 protonun birlikte transportu ve 1 K⁺ iyonunun karşı transportu ile eşleşmiş durumdadır. Bunun sonucu, her glutamat molekülü başına hücre içine en az 1 net pozitif yük girmektedir. Hücre içine giren ekstra yükün nedeni, glutamat transportu sırasında oluşan Cl⁻ akımıdır (Dingledine *et al.*, 1999).

Nöronal glutamat geri alımının klasik olarak presinaptik terminallerde gerçekleştiği bilinmektedir. Fakat bu görüş son yıllarda yavaş yavaş değişime uğramıştır. Çünkü beyinde tanımlanan glutamat taşıyıcılarından EAAC₁ ve EAAT₄ presinaptik terminallerde değil, nöronların soma ve dentritlerinde eksprese edilmektedir (Dingledine *et al.*, 1999; Tanaka, 2000).

Glutamat taşıyıcısı eksprese etmeyen farelerde yapılan çalışmalar her bir alt taşıyıcısının sinaptik iletideki rolünü ortaya koymuştur (Dingledine *et al.*, 1999).

Eksitotoksisite

İlk olarak 1969 yılında Olney ve Sharp eksitator amino asit glutamatın nöronlar üzerine toksik etki oluşturabileceğini öne sürerek eksitotoksisite kavramını tanımlamışlardır (Olney & Sharpe, 1969).

İn-vivo ve *in-vitro* yapılan deneyler sonucu, fazla miktarlarda eksitator amino asit ve analoglarının nörodejenerasyona neden olduğu ortaya konmuştur (Dugan & Choi, 1994; Hansson *et al.*, 2000; Pulsinelli, 1992; Schulz, Matthews, & Jenkins, 1995).

Glutamat, presinaptik sinir uçlarından salındığında AMPA ve NMDA reseptörlerinin her ikisini de uyarır.

Na^+ un girmesi depolarizasyona neden olur. NMDA reseptörü monovalan katyon ve kalsiyumun her ikisine de geçirendir. Kanal normalde Mg^{2+} ile kapatılmıştır, fakat membranın depolarizasyonu bu blokajdan kurtulur (Choi, 1990a; Mayer, Westbrook, & Guthrie, 1984; Nowak, Bregestowski, & Ascher, 1984).

AMPA reseptör bağımlı kanallar yoluyla Na^+ girişi depolarizasyona neden olur, böylece NMDA kanalları yoluyla Ca^{2+} girişini sağlar. Kısacası, glutamat reseptörlerinin aktivasyonu Ca^{2+} geçişi üzerinden

etkisini gösterir. EAA'lerin salınımı ve iyonotropik glutamat reseptörlerinin aktifleşmesi bir çok iyonla karşı membran geçirgenliğinin artmasına neden olur (Hossmann, 1994; Morley, Hogan, & Hakim, 1994; Siesjö & Bengtsson, 1989).

Reseptörlerin glutamat ile aktivasyonunu içeren eksitatör olaylar Ca^{2+} girişini izler. Eksitatör olayların sonlandırılması, EAA'lerin geri alınması ve inhibitör mekanizmalarla sağlanır (Choi, 1990b). Eksitatör amino asitler ve bunların analogları, NMDA ve NMDA dışı reseptörleri aktive ederek hücre içine sodyum, klorür iyonları ve su girmesi ile hızlı şişmeye ve onkotik (veya ozmotik) hücre ölümüne neden olmaktadır (Dutka, Kochanec, & Hallenbeck, 1989; Siesjö, 1992). Gecikmiş hücre ölümü ise NMDA reseptörlerinin aşırı uyarılması ve buna bağlı ortaya çıkan Ca^{2+} fazlalığı ile olmaktadır (Roda, Carceller, Diez-Teiedor, & Avendano, 1995). Glutamata kısa fakat yoğun maruz kalınması NMDA reseptörlerine bağlı mekanizmalar ile gecikmiş hücre ölümüne neden olur (Harley, Kurth, Bjerkness, Weiss, & Choi, 1993). Fosfolipaz A_2 ve kalpain gibi Ca^{2+} a bağımlı enzimlerin aktivasyonu ve serbest radikal üretimi de bu süreçte rol oynar (Clemens, Saunders, Ho, Phebus, & Panetta, 1993; Siesjö, 1992; Traystman, Kyrtsch, & Koehler, 1991; Tymianski, Charlton, Carlen, & Tator, 1993). İntrasellüler Ca^{2+} un genel artışı her zaman hücre ölümüne neden olmadığı için NMDA

reseptörleri çerçevesinde lokalize artışların nitrik oksit sentazın aşırı uyarılmasına neden olduğu ve böylece ölümcül olayların tetiklendiği düşünülmektedir (Pulsinelli, 1992; Tymianski *et al.*, 1993; Weiss, Turetsky, Wilke, & Choi, 1994). Eksitotoksiste resim 3 de özetlenmiştir.

EKSİTOTOKSİSİTE

Glutamat



Artmış hücre içi Kalsiyum



- DNA hasarı
- Azalmış mitokondriyal fonksiyon
- Artmış serbest radikaller
- Ozmotik ölüm
- Apoptotik sinyalleme ve gen tanımlanması
- Protein yıkımı
- Hücre ve organel membran hasarı

- Protein Kinaz C
- Kalsiyum Kalmodulin-bağımlı protein kinaz II
- Fosfolipaz
- Proteazlar
- Fosfatazlar
- Nitrik Oksit Sentaz
- Endonükleazlar

Resim 3: Eksitotoksiste

BÖLÜM II

GEREÇ VE YÖNTEM

HÜCRE KÜLTÜRÜ

- **Kullanılan kimyasal malzeme**

Etanol (%80)

Besiyeri: Hazır besiyeri olarak DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Sigma 5546),

Fetal Dana Serumu (FBS): Steril FCS (Biochrom KG, S 0113),

Tripsin çözeltisi: (1:250) Steril tripsin çözeltisi (Biochrome KG, L 2123),

Penisilin-streptomisin çözeltisi (10 000 U/mL penisilin, 10 mg/mL streptomisin (Biochrome KG, A 2213),

L-Glutamin (200mM) (Biochrome KG, K 0283),

NADH (Applichem, 606-68-8, R 13934),

Sodyum piruvat (100mM) (Biochrome KG, L 0473),

PBS-Dulbecco (Biochrome KG, L 1825),
Riluzole (25mg) (Sigma-RBI, R-116),
Melatonin (1gr) (Sigma, M-5250),
7-Nitroindazol (1gr) (Sigma, N-7778) kullanılmıştır.

• Gereçler

Cam malzeme: şişe (100 mL), beher (125 mL), erlanmeyer (125 mL)
ve pipetler (10 mL, 5 mL, pastör pipeti), hemositometre (Neubaer)

Metal malzemeler: Süzgeç (Por çapı: 80 µm), makas, pens ve bistüri

Plastik kaplar: Petri kapları (60 ve 35 mm), filtrasyon kapları (250 ve
125 mL), santrifüj tüpleri (50 ve 15 mL)

Filtrasyon kağıdı (por çapı: 0.2 µm)

Enjektör (10 ve 1 mL)

Gereçlerin Temizlenmesi; Hücre kültüründe kullanılan malzemelerin
tümü steril olmalıdır. Cam malzemeler KCHO (potasyum formaldehid)
ve H₂SO₄ içeren çözeltinin içinde 12-14 saat bekletildikten sonra çeşme
suyu ve distile suyla 3 er defa yıkanmıştır. Yıkanan malzemeler 100 °C
de otoklav ile kurutulduktan sonra aliminyum folyo ile kaplanmıştır.
Otoklavda 100 kPa basınçta 150 °C de 1 saat süre ile sterilize edilmiştir
(Sterilizasyon indikatör ile belirlenmiştir). Metal malzemeler %80 lik
etanolda 12 saat bekletilerek sterilize edilmiştir. Plastik malzemeler
steril olarak temin edilmiştir.

• Çalışma Şekli

Üretim Besiyerinin Hazırlanması

Üretimde kullanılan besiyeri DMEM + %10 inaktive edilmiş Fötal dana serumu içermektedir. Bu çözeltiye %1 oranında antibiyotik çözeltisi ve 2 mM L-glutamin eklenmiştir. Çözelti kullanımdan hemen önce 0.2 µm lik filtre kağıdından geçirilmiştir.

Primer Hücre Kültürünün Hazırlanması

Kültür çalışmaları steril koşullar gerektirmektedir. Bu nedenle tüm deneyler steril kabinde gerçekleştirilmiştir. Kabin sterilizasyonu ultra viole ışık ile sağlanmaktadır.

Hücrelerin Elde Edilmesi

Çalışmada yenidoğan 1-2 günlük Sprague Dawley sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Deneysel Cerrahi ve Araştırma , Hayvan Üretim ve Bakım Merkezinden temin edilmiştir. Yeni doğan sıçanlar % 80 lik alkolle temizlenerek baş kısımları makasla gövdeden ayrılmıştır. Kafa derisi pens yardımıyla sıyrılarak kafatası açılmıştır. Beyinler total olarak çıkarılıp DMEM içeren bir petri kabına aktarılmıştır.

Beyinlerin frontal korteks bölgeleri bistüri ile ayrılarak içinde DMEM bulunan başka bir petri kabına aktarılmıştır. Beyin zarları ve kan damarları uzaklaştırılmıştır.

Toplanan dokular makas ve pastör pipeti yardımıyla daha küçük parçalara ayrılarak bir santrifüj tüpünde toplanmıştır.

Santrifüj tüpüne % 0.25 lik tripsin çözeltisinden %5 oranında eklenmiştir. Çözeltideki hücreler 37 °C de 15 dakika bekletilerek enzimatik ayrıştırmaya uğratılmıştır.

Çözelti oda sıcaklığında 2000 rpm hızda 5 dakika süreyle santrifüje edilmiştir. Santrifüj sonrasında üst kısımda kalan sıvı uzaklaştırılmıştır. Sedimente DMEM eklenerek pipetle karıştırılmıştır.

Çözelti süzgeçten geçirilmiştir (por çapı: 80 µm). Süzülen çözelti başka bir santrifüj tüpünde toplanmıştır.

Hücre çözeltisindeki hücre sayısının belirlenmesi amacıyla hücreler hemositometrede sayılmıştır. Sayım için hemositometre ışık mikroskobuna yerleştirilmiş, 1 mm² lik alandaki hücreler sayılmıştır. Bu sayı 10⁴ ile çarpılarak çözeltinin mililitresindeki hücre sayısı hesaplanmıştır.

Hücrelerin Ekilmesi

Hücre sayımı yapıldıktan sonra hücre çözeltisi 2x10⁵ hücre/mL olacak şekilde üreme besiyeri ile sulandırılmıştır. Hazırlanan süspansiyondan

35 mm.lik petri kaplarına 2 mL konulmuştur. Her ekim deneyinde petri kaplarından birinde glia hücrelerinin mikroskopta belirlenmesi amacıyla steril lamel bulunmaktadır. Petri kapları %97 nemli hava, %5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C de inkübe edilmiştir.

Hücrelerin Yaşatılması

İnkübatörde bulunan petri kapları her gün invert mikroskop ile kontrol edilerek, hücrelerin büyümeleri izlenmiştir. Besiyerleri 2-3 gün arayla değiştirilmiştir. Kontamine olan petri kapları inkübatörden uzaklaştırılmıştır.

Büyümelerini ve çoğalmalarını tamamlayarak tek tabakalı hücre topluluğu oluşturan kültür hücreleri 14. günde sitotoksiste deneylerinde kullanılmıştır.

İMMUNOSİTOKİMYA

Üretilen hücrelerin glia olduğunun belirlenebilmesi amacıyla lamel üzerinde yetiştirilen hücreler ekimden itibaren 11-12. günlerde Glial Fibriler Asidik Protein (GFAP) ile boyanmıştır. Boyanan hücreler fotoğraflanmıştır.

• Kullanılan kimyasal malzeme

GFAP kiti (Sigma-39H4877): Glia hücrelerinde bulunan Glial Fibriler Asidik Proteine spesifik bir antikoru içerir. İnsan beyninden elde edilen

safılaştırılmış GFAP immunojen olarak kullanılarak tavşanda antiserum geliştirilmiştir. Antiserumda bulunan IgG fraksiyonu kromotograf ile safılaştırılmıştır.

Paraformaldehit (%3)

PBS (Fosfat tamponu + % 0.9 NaCl çözeltisi)

Sekonder antikor (Peroksidaz ile konjuge edilmiş antikor)

DAB (Diaminobenzidin yıkama tamponu, pH: 7.4)

H₂O₂

Tris tamponu (Tris HCl, pH: 7.4)

- **Gereçler**

Lam

Lamel

Pens

Petri kabı

- **Çalışma şekli**

İmmunolojik Boyama

İçinde lamelin bulunduğu petri kabındaki besiyeri aspire edilmiştir. Hücreler PBS tamponu ile yıkanarak paraformaldehitte oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilerek sabitlenmiştir.

Sabitlenen hücreler tris ile yıkanmış ve hücre üzerini kaplayacak şekilde primer antikor eklenmiştir. Oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir.

Hücreler tris ile yıkanarak hücre üzerini kaplayacak şekilde sekonder antikor eklenmiştir. Oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir.

Hücreler tris ile yıkanarak %1 lik H₂O₂ içeren DAB çözeltisi eklenmiştir.

Oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir.

Tris ile yıkama yapılmıştır.

Petri kabında pens ile kaldırılan lamel %1 lik gliserol ile lama yapıştırılmış, mikroskopta görüntülemeye hazır hale getirilmiştir.

MİKROSKOP GÖRÜNTÜLEME YÖNTEMİ

• Gereçler

Olympus BX-50 ışık mikroskobu

CCD renkli kamera (JVC Corp.)

Video Blaster SE100 (Creative Labs) video sayısallaştırma kartı

Bilgisayar

Tektronix Phaser 480X (Tektronix Corp.) dye sublimation printer

• Çalışma Şekli

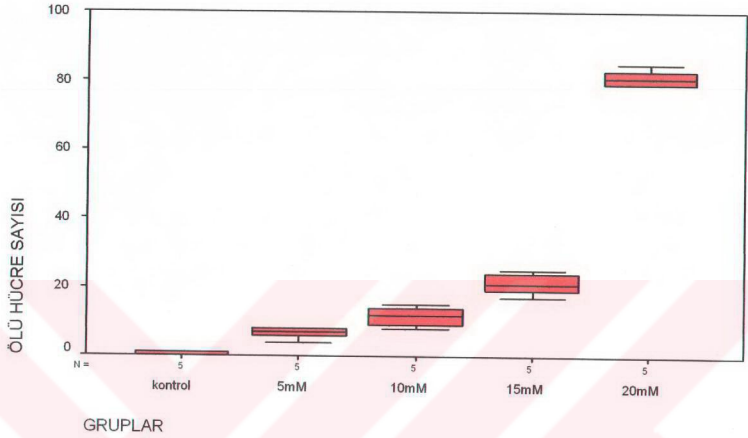
Petri kabında bulunan hücreler Olympus BX-50 ışık mikroskobunda (10X, 20X, 40X, 100X güçlü objektifler ile) CCD renkli kamera (JVC Corp.) ile görüntülenmiştir. Kamerada oluşan görüntüler Video Blaster SE100 (Creative Labs) video sayısallaştırma kartı ile bilgisayara

aktarılmıştır. Bilgisayara kaydedilen görüntülerin sayfa düzenlemesi Photoshop (Adobe Corp.) görüntü düzenleme programı ile yapılmıştır. Photoshop programında görüntüler üzerinde parlaklık ve kontrast ayarları yapıldıktan sonra Tektronix Phaser 480X (Tektronix Corp.) dye sublimation printerda basılmış, renkli fotokopi ile çoğaltılmıştır.

Toksisitenin Oluşturulması:

Primer mikst glia kültürü yeni doğmuş 1-2 günlük sıçan beyinlerinden oluşturulduktan sonra 14. günde çalışılmaya başlandı. Kontrol, toksisite, melatonin, 7-nitroindazol ve riluzol olmak üzere, her biri için N=6 olan 5 grup oluşturuldu. Toksisite, ortama 20 mM konsantrasyonda glutamat eklenerek yapıldı. Glutamat dozlarının doz-yanıt grafiği şekil 1'de verilmiştir. Yanıtlar kontrol grubuna göre en az % 40-50 ölüm oluşturacak glutamat dozuna bakılarak belirlenmiştir (Choi, 1990a). Toksisiteden 24 saat sonra toplam 2×10^5 hücre içindeki ölü hücreler tripan mavisi kullanılarak Thoma lamında sayılmıştır.

Glutamat toksisitesinin değerlendirilmesinde tek yönlü ANOVA ve post-hoc Bonferroni testi kullanıldı. Değişik glutamat dozları arasında anlamlı fark gözlemlendi ($F_{(4,24)}=887.293$; $p= 0.000$).



Şekil 1: Glutamat toksisitesi doz-yanıt grafiği

Değişik glutamat dozları (5-20mM) ile oluşturulan hücre ölümü (box plot). Tüm gruplarda toplam 2×10^5 hücre içindeki ölü hücre sayısı belirtilmiştir. Post-hoc Bonferroni test sonuçlarına göre tüm dozlar kontrol grubundan anlamlı düzeyde farklı bulunmuştur (5 mM için $p < 0.020$, diğerleri için $p < 0.001$).

Toksosite oluşturulduktan sonra bir grup toksisite kontrolü olarak ayrılıp, diğer gruplar için $100\mu\text{M}$ melatonin, $100\mu\text{M}$ riluzol veya $500\mu\text{M}$

7-nitroindazol kültür ortamına eklendi. Tüm maddeler 100 μ L DMSO içinde çözüldü ve tüm gruplara eşit miktarda DMSO eklendi. 1, 6, 24 ve 48. saatlerde tüm grupların petri kaplarındaki kültür üst sıvıları alındı. Bu sıvılardaki LDH aktiviteleri spektrofotometrik olarak saptandı.

GRUPLAR:

Kontrol (n=6), toksisite (glutamat ile) (n=6), glutamat+melatonin (n=6), glutamat+7-nitroindazol (n=6) ve glutamat+riluzol (n=6) olmak üzere 5 grup oluşturuldu. Her grup bir kültür kabında 2×10^5 hücre/mL olacak şekilde düzenlendi ve 1,6,24,48. saatlerde LDH aktivitesi ve nitrit düzeylerine bakılmak üzere üst sıvıları alındı.

LAKTİK DEHİDROGENAZ (LDH) ÖLÇÜMÜYLE TOKSİSİTE TAYİNİ

• Kullanılan kimyasal malzeme

LDH kiti (NADP ve K_2HPO_4 tamponu Sigma-LD-P kiti),

Sodyum pirüvat çözeltisi

- **Gereçler**

Spektrofotometre (Philipps PU 8600)

- **Çalışma Şekli**

LDH, hücre membranı bütünlüğünün bozulmasıyla ortaya çıkan sitoplazmik bir enzimdir. Kültür besiyerine salgılanan LDH miktarı hücre ölüm oranını verir (Wroblewski & Ladue, 1955). LDH, NADH (İndirgenmiş Nikotinamid adenin dinükleotid) varlığında piruvatı laktata dönüştürmektedir. Bu yöntemde enzim aktivitesi ortamda bulunan NADH'ın NAD^{+} 'e (Nikotinamid adenin dinükleotid) oksidasyonunun spektrofotometrik olarak 340 nm de ölçülmesiyle bulunur (Koh & Choi, 1987; Wroblewski *et al.*, 1955).

Toksisite oluşturulduktan sonra hücreler %5 CO_2 , %97 nemli hava içeren inkübatörde 37°C de 1, 6, 24 ve 48 saat inkübe edildiler. Hücrelerin bulunduğu besiyerlerinden 0.5 mL, 0.2 mg NADH, 1 mL fosfat tamponu ve 0.1 mL sodyum piruvat ile vortekste karıştırılarak kuartz spektrofotometrik küvetine aktarıldı. Absorbans değişikliği 30 saniye aralıkla 3 dakika boyunca okundu. Absorbans değişikliğinin lineer olduğu aralık ΔA olarak belirlendi. LDH aktivitesi ünite/mL cinsinden aşağıdaki formülle hesaplandı (Wroblewski *et al.*, 1955).

$$\text{Serum LDH (ünite/mL)} = \frac{\Delta \text{ Absorbans} \times \text{Sıcaklık faktörü}}{0.001 \times 0.05 \times \text{Işık aralığı (cm)}}$$

TOTAL NİTRİT TAYİNİ

- **Kullanılan kimyasal malzeme**

Sülfanilamid (Sigma)

Naftilendiamin hidroklorid (Merck)

Orto fosforik asid (Sigma)

Sodyum nitrit (Sigma)

- **Gereçler**

Spektrofotometre (Philiphs PU 8600)

Cam malzemeler

Otomatik pipetler

• Çalışma Şekli

Çözeltilerin hazırlanması

Griess I: 300 mg naftilendiamin dihidroklorid 150 mL distile su içinde çözüldü.

Griess II: 3 g sülfanilamid ve 17.7 mL % 85 orto-fosforik asid 150 mL distile suda çözüldü. Bu çözeltiler +4°C de 2-3 ay stabildir. Çalışma öncesinde bu 2 reaktif eşit miktarlarda karıştırıldı (Green *et al.*, 1982; Taskiran, Kutay F.Z., Sozmen E., & S., 1997).

Standart çözeltiler: NaNO₃ çözeltisi: 10 mmol/L olacak şekilde hazırlandı (8,5 mg/10 mL distile suda)

Örneklerin hazırlanması

500µL hücre kültürü üst sıvısına eşit miktarda (250µL Griess I ve 250µL Griess II) Griess reaktifleri eklenerek Griess reaksiyonu ile spektrofotometrik olarak 10 dakika içinde ölçüldü. Sonuçlar µmol/ g yaş doku olarak ifade edildi (Guevara *et al.*, 1998).

Standart ölçümler: Sodyum nitrit çözeltisi kullanarak yapıldı.

İstatistiksel Analiz

Veriler SPSS programında tek yönlü veya multifaktöryel varyans analizi (ANOVA) ve post-hoc Bonferroni testleri ile değerlendirildi. İkili karşılaştırmalarda Student t test kullanıldı.

Multifaktöryel ANOVA değerlendirmelerinde bağımlı değişken LDH aktivitesi veya Nitrit düzeyleri, faktörler zaman ("within subject" :1,6,24,48 saat) ve gruplar ("between subjects":kontrol, toksisite, melatonin, 7-NI, riluzol) olarak alındı. Tek yönlü ANOVA'da bağımsız değişken olarak ölü hücre sayısı, LDH aktivitesi ve nitrit düzeyi alındı, ve gruplar arası fark çıkan durumlarda post-hoc Bonferroni testleri ile gruplar arası karşılaştırmalar yapıldı.

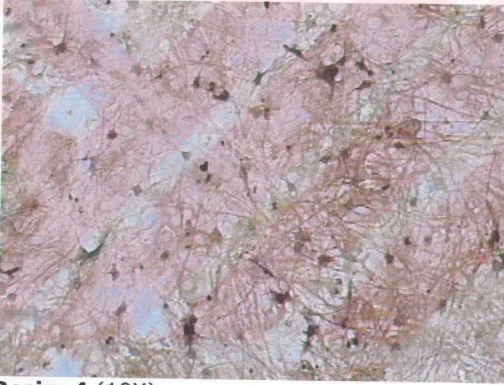
LDH aktivitesi ile nitrit düzeyleri arasındaki korelasyon Pearson korelasyon analizi ile araştırıldı. Bu analiz için önce tüm gruplar birlikte, daha sonra her grup için korelasyon farklı olarak değerlendirildi.

BÖLÜM III

BULGULAR

Glia Hücrelerinin Belirlenmesi:

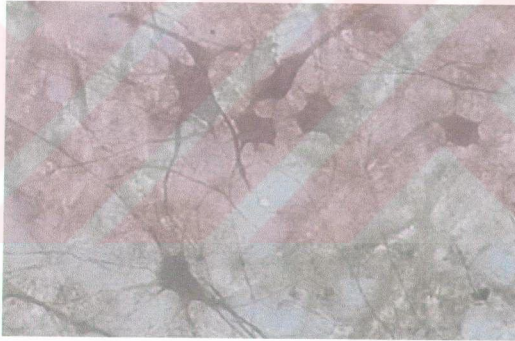
Üretilen hücrelerin tipi, astroglia için spesifik olan glial fibriler asidik protein (GFAP) ile boyanarak belirlendi (Resim 4-5-6-7)



Resim 4 (10X)



Resim 5 (20X)



Resim 6 (40X)

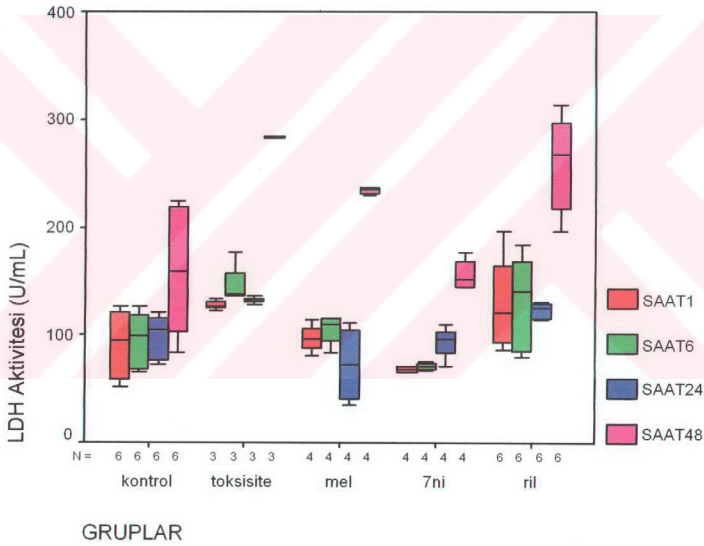


Resim 7 (100X)

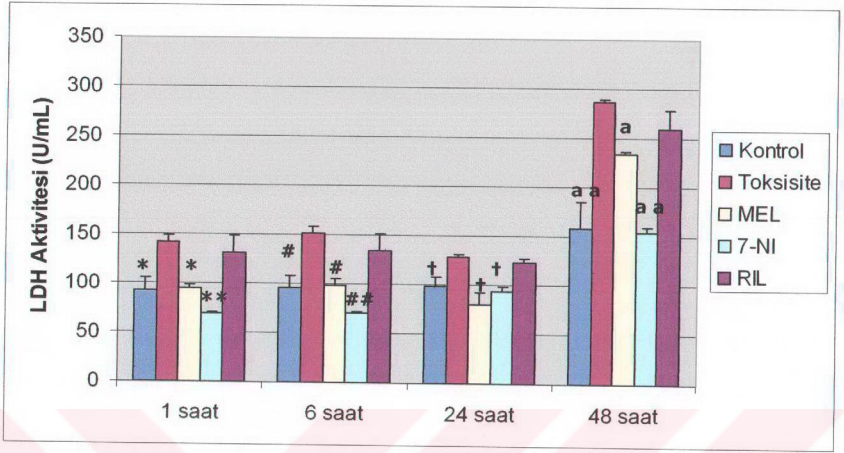
LDH Aktivitesi:

Toksisiteyi dolayısı ile hücre ölümünü değerlendirmek için hücre içi bir enzim olan LDH aktivitesi kullanıldı. Şekil 2'de gruptaki LDH aktivitesinin değişimi izlenmektedir. Multifaktöryel ANOVA sonuçlarına göre zaman [$F(3,54)= 116.57, p=0.001$] ve gruplar [$F(3,18)=7.993, p=.001$] anlamlı faktörler olarak belirlenmiş ve ayrıca zaman ile gruplar arası anlamlı etkileşim saptanmıştır [$F(12,54)=3.664, p=0.001$]. Verilerin değerlendirilmesinde her saat için ayrı ayrı tek yönlü ANOVA kullanıldığında, bekleneceği üzere yine gruplar arası anlamlı fark bulunmuştur [1,6,24 ve 48 saatler için, sırasıyla: $F(4,28)=7.129, p=0.001$; $F(4,28)= 8.493, p=0.001$; $F(4,28)= 6.816,$

$p=0.001$; $F(4,25)= 11.822$, $p=0.001$]. Post hoc test (Bonferroni) ile gruplar arası farklar Şekil 3'te gösterilmektedir. 1., 6. ve 48. saatlerde 7-nitroindazol melatoninden daha etkili olmuştur [t test, sırasıyla: $p=0.028$, $p=0.020$, $p=0.001$]. 24. saatte melatonin ve 7-nitroindazol arasında toksisiteyi azaltma yönünden anlamlılık bulunamamıştır. Tüm zamanlarda riluzol, oluşturulan toksisiteyi önleyememiştir. Şekil 3 incelendiğinde 48. saate, kontrol grubu dahil tüm gruplarda LDH düzeylerinin genel olarak daha yüksek olduğu dikkat çekicidir.



Şekil 2: Toksisite, toksisite+Melatonin, toksisite+7-nitroindazol ve toksisite+riluzolun 1, 6, 24, 48. saatlerde LDH aktivitesi üzerine etkisi (box plot)



Şekil 3: Toksisite, toksisite+Melatonin, toksisite+7-nitroindazol ve toksisite+riluzolun 1, 6, 24, 48. saatlerde LDH aktivitesi üzerine etkisi (post hoc Bonferroni)

1. saat: Toksisite'den farklı * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$

6.saat: Toksisite'den farklı # $p < 0.05$, ## $p < 0.005$

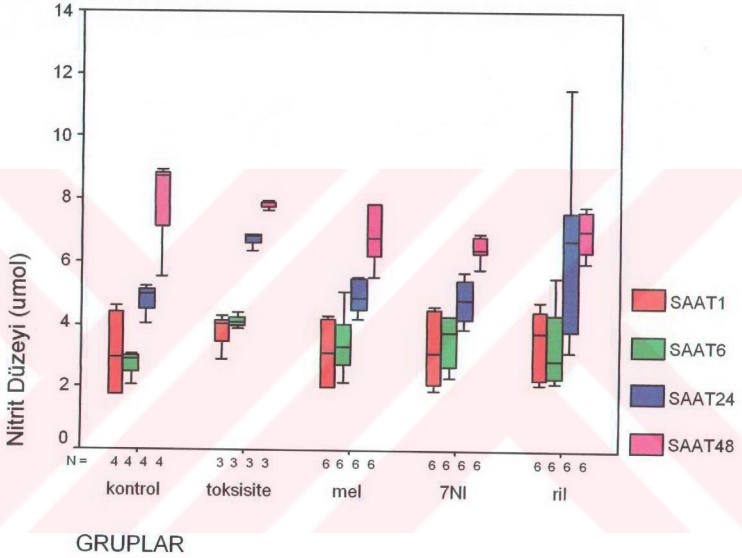
24.saat: Toksisite'den farklı † $p < 0.05$

48.saat: Toksisite'den farklı a $p < 0.05$, aa $p < 0.005$

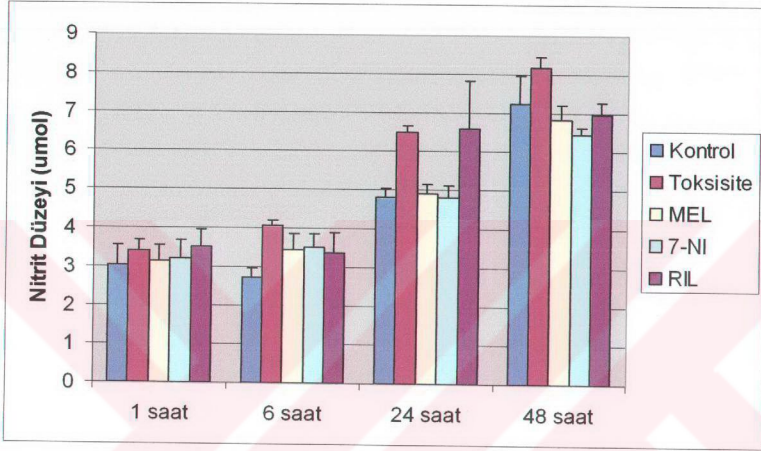
Nitrit Düzeyleri:

Nitrik oksit (NO) düzeylerini irdelemek üzere nitrit düzeyleri tayin edildi. Şekil 4'de gruplardaki nitrit düzeylerinin değişimi izlenmektedir.

Multifaktöryel ANOVA sonuçlarına göre zaman [$F(3,60)= 53.48$, $p=0.001$] ve gruplar [$F(4,20)=3.367$, $p=.029$] faktörü anlamlı olarak belirlenmiş zaman ve gruplar arası etkileşim anlamlı bulunmamıştır. Verilerin değerlendirilmesinde her saat için ayrı ayrı tek yönlü ANOVA kullanıldığında, gruplar arası anlamlı fark bulunmamıştır (Şekil 5).



Şekil 4: Toksisite, toksisite+Melatonin, toksisite+7-nitroindazol ve toksisite+riluzolun 1, 6, 24, 48. saatlerde nitrit düzeyi üzerine etkisi (box plot)

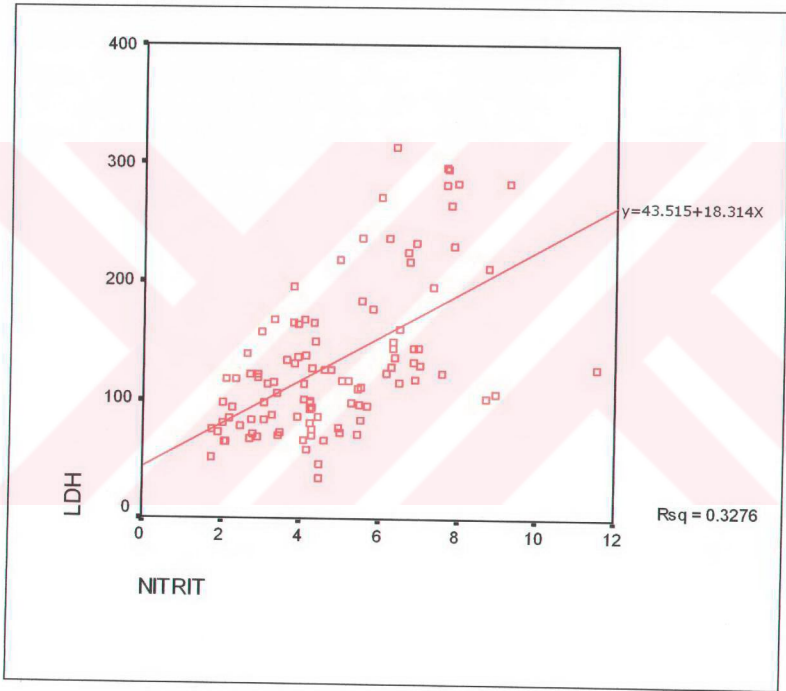


Şekil 5: Toksikite, toksikite+Melatonin, toksikite+7-nitroindazol ve toksikite+riluzolun 1, 6, 24, 48. saatlerde nitrit düzeyi üzerine etkisi

LDH aktivitesi ile Nitrit düzeyleri arasında korelasyon:

Tüm gruplar ve zamalar birlikte değerlendirildiğinde LDH aktivitesi ile nitrit düzeyleri arasında anlamlı ve pozitif korelasyon ($r=0.572$,

$p < 0.001$) olduğu saptandı (Şekil 6). Ayrıca tüm gruplar için ayrı ayrı korelasyon analizleri yapıldığında da her grupta en az $p < 0.050$ düzeyinde anlamlı korelasyon belirlendi.



Şekil 6: LDH aktivitesi ile Nitrit düzeyleri arasında korelasyon grafiği

BÖLÜM IV

TARTIŞMA

Glia hücreleri ve özellikle astrositler santral sinir sistemi hücre içeriğinde önemli bir orana sahiptirler. Primer glia hücre kültürlerinin negatif membran potansiyeli ve katyon transportu özelliği (Kimelberg, Bowman, Biddlecome R., & Bourke, 1979), enerji metabolizması (Holtzman & Olson, 1980), karbonik anhidraz, Na^+ - K^+ ATPaz, HCO_3^- ATPaz enziminin uyardığı ATP'az aktivitesinin gelişimsel ve bölgesel uyumluluğu (Kimelberg, Narumi, & Bourke, 1978), nükleer proteinlerin gelişimi (Schilling, Duvernoy, Keck, & Pilgrim, 1989), glutamat ve serotonin geri alınımı (Kimelberg *et al.*, 1992) *in-vivo* ortamlarla büyük benzerlik gösterir. Astrositlerin nöronları toksisiteye karşı koruyucu rol oynadığı, astrosit sayısında azalma ile birlikte kortikal nöronlarda hasara uğrama oranının yükseldiği ve glutamat geri alımıyla nöronları eksitator amino asit toksisitesinden koruduğu öne sürülmüştür (Sarantis & Attwell, 1990).

Oksidan stres, reaktif oksijen türevleri ve serbest radikal oluşumu organel ve hücre hasarını (akson, glia, endotel dahil) tetikler. Kinaz ve lipaz aktivasyonu, hücrede hem yapısal yıkıma, hem de işlevsel aksaklıklara neden olur (Pulsinelli, 1992; Traystman *et al.*, 1991). Deneysel hücre hasarı oluşturmak için kullanılan modeller arasında hipoksi, hiperasidite ve glutamat aspartat gibi eksitotoksinlerin nöron veya glia kültür ortamına uygulandığı çalışmalar görülmektedir. Ancak gerçek yaşamda ve *in-vivo* koşullarda hipoksi, hipoglisemi, endotoksisite ve de mekanik hasar sonrasında görülen ortak yol içinde glutamat salınımı, geri alım ve metabolizma dinamiklerinin bozulması kaçınılmaz hücre hasarı ve ölümüne yol açmaktadır (Bottenstein *et al.*, 1985; Choi, 1990b; Daikhin & Yudkoff, 2000; Dingledine *et al.*, 1999; Dugan *et al.*, 1994; Federoff *et al.*, 1992; Guisti *et al.*, 1997; Hansson *et al.*, 2000; Harley *et al.*, 1993; Hertz, Dringen, Schousboe, & Robinson, 1999; Hertz, Yu, Kala, & Schousboe, 2000; Karadere, 2002; Karbownik & Reiter, 2000a; Karbownik, Reiter, Garcia, & Tan, 2000b; Kato, Higashida, Higuchi, Hatakenaka, & Negishi, 1984; Morley *et al.*, 1994; Nowak *et al.*, 1984; Pulsinelli, 1992; Reiter, Calvo, Karbownik, Qi, & Tan, 2000a; Schilling *et al.*, 1989; Siesjö, 1992; Yılmaz, 1997). Bu nedenle biz de daha önce *in-vivo* modelde mekanik ve vasküler hasar sonuçlarını incelediğimiz çalışmamıza yakın bir *in-vitro* modelleme için "primer mikst glia hücre kültüründe glutamat

toksitesisi üzerine melatonin, 7-nitroindazol ve riluzolun etkileri" ni incelemeye karar verdik.

Bu proje kapsamında uyguladığımız nonparametrik preliminere doz yanıt deneyleri (şekil 1) ve kurumumuz laboratuvarlarında daha önce yürütülmüş olan (Karadere, 2002; Yılmaz, 1997) çalışmalar doğrultusunda toksik glutamat dozu belirleyerek bu çalışmayı kurguladık.

Sonuçlarımızda 1,6 ve 24. saatlere göre 48. saatte kontrol ortamında hücre ölümünün anlamlı derecede ($p=0,000$); (%50-60 oranında) arttığı gözlemlendi (Şekil 1). Kültürdeki zamana bağlı bazal hücre hasarı, diğer araştırmacıların da (Choi, 1990a; Daikhin *et al.*, 2000; Hansson *et al.*, 2000; Harley *et al.*, 1993; Hertz *et al.*, 1999; Hertz *et al.*, 2000; Hossmann, 1994; Tanaka, 2000) saptadığı gibi glutamatın toksisite etkisini de 1. saat ($p=0.003$), 6 ve 24. saatlere göre 48. saatte (%70-80) anlamlı derecede güçlendirdi (Şekil 1). Bunun olası nedeni; kültür ortamında K^+ , Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} gibi iyonların dengelerinin değişmiş olabileceğidir (Hansson *et al.*, 2000). Ayrıca pH'nin düşmesi glial AMPA-R duyarlılığını arttırarak hücre ölümü başlatabilir (Aronica *et al.*, 2001; Tanaka, 2000; Weiss *et al.*, 1994). NO^- ve diğer serbest radikallerin

artması ile hasar şiddetlenebilir (Schulz *et al.*, 1995; Weiss *et al.*, 1994; Yoshida *et al.*, 1994).

. Melatonin, 1,6, 24. saatlerde LDH aktivitesini glutamat toksisitesine göre (yaklaşık %50 oranında) anlamlı derecede düşürmüştür ve kontrol değerine çekebilmiştir [tüm saatlerde ($p=0,001$) (Şekil 3)]. Diğer pek çok *in-vivo* çalışmada da bizim sonuçlarımıza benzer bulgular bulunmuştur (Antolin *et al.*, 1996; Cabrera *et al.*, 2000; Dagci, Cagli, Zileli, Guney, & Peker, 2000; Guisti *et al.*, 1996; Guisti *et al.*, 1997; Karbownik *et al.*, 2000a; Karbownik *et al.*, 2000b; Kelly *et al.*, 1997; Kim, Reiter, Qi, Tan Dx, & Cabrera, 2000; Lezoualch *et al.*, 1996; Manev *et al.*, 1996; Pablos *et al.*, 1997; Peker *et al.*, 2000; Pieri *et al.*, 1994; Reiter, 1998; Reiter *et al.*, 2000a; Reiter *et al.*, 1997a; Reiter *et al.*, 1995; Reiter *et al.*, 2000b; Reiter *et al.*, 1997b; Tan *et al.*, 1993; Tan *et al.*, 2000a; Tan *et al.*, 2000b; Tan *et al.*, 1998; Tan *et al.*, 2000c; Uz *et al.*, 1996).

Koruyucu dozlardaki melatoninin kendisi bazı koşullarda ve sürelerde prooksidan etki gösterebilmektedir. Bizim sonucumuza benzer etkiler başka araştırmacılar tarafından da gösterilmiştir (Godson *et al.*, 1997; Pieri *et al.*, 1994; Reiter, 1987; Reiter *et al.*, 1999; Reiter, Hurlbut,

Tannenbaum, & Troiani, 1987). Zaman, melatonin yararı aleyhine işleyen bir faktör olarak dikkat çekmektedir.

7-nitroindazol 1,6, 24 ve 48. saatlerde hücre hasarını (%40-60 oranında) anlamlı olarak azaltmıştır [sırası ile $p=0,021$, $p=0,000$, $p=0,000$, $p=0,000$ (Şekil 3)]. Bu sonuç, 7-nitroindazol'un nöroprotektif etkisini gösteren çalışmalarla paralellik göstermektedir (Di Monte, Royland, Anderson, Castagnoli, & Langston, 1997; Ikeda *et al.*, 1998; Itzhak & Ali, 1996; Moore, Babbedge, Wallace, Gaffen, & Hart, 1993). 7-nitroindazol'un koruyuculuğunun özellikle 1. ve 6. saatlerde (%25-30 oranında) kontrol ortamlarında bile anlamlı düzeyde etkili oluşu dikkate değer bulunmuştur [sırası ile $p=0,038$, $p=0,013$, (Şekil 3)]. Kültür ortamlarında yaşam koşullarının bozulmaya başladığını düşündüğümüz 24. ($p=0,004$) ve 48. ($p=0,002$) saatte bile 7-nitroindazol, LDH aktivitesi bağlamında hasarı kontrol değerlerinde tutabilmiştir (Şekil 3) (Kelly, Ritchie MI., & McBean, 2000; Moore *et al.*, 1993; Yoshida *et al.*, 1994). 7-nitroindazol, özellikle 48. saatteki en belirgin etkisi ($p=0,002$) ile post-iskemik veya post-travmatik glia hasarında en güçlü koruyucu/önleyici ajan olabileceği izlenimini vermektedir (Şekil 3). Nitekim, 7-nitroindazol'un bir çok *in-vivo* çalışmada belirgin iskemi veya hasarı önleyici etkisi bildirilmiştir (Babbedge, Bland-Ward, Hart, & Moore, 1993; Dagci *et al.*, 2000;

Faraci *et al.*, 1995; Hirabayashi, Takizawa, Fukuyama, Nakazawa, & Shinohara, 1999; Ikeda *et al.*, 1998; Jiang, Kaku, Hada, & Hayashi, 1999; Kelly *et al.*, 2000; Macrae, Dawson, Norrie, & McCulloch, 1993; Peker *et al.*, 2000; Samdani *et al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 1994).

Riluzol, 1,6, 24. ve 48. saatlerde LDH aktivitesinde toksisiteyi önleme/koruyuculuk anlamında etkili olmamıştır (Şekil 3). Burada Choi ve arkadaşlarının belirttiği gibi glutamat ve aynı zamanda kalsiyum eksikliğinin de hücre ölümüne yol açıyor olması bizim bulgularımızla örtüşebilir (Choi, 1990a, 1990b). Hatta kortikal nöron kültürlerinde riluzol'un 100 μ M'unun nöronal hücre ölümüne bile neden olduğu gösterilmiştir (Koh, Kim, Hwang, Kim, & Seo, 1999).

Riluzol ile ilgili nöroprotektif etkisini ortaya koyan çalışmalar da bulunmaktadır. Örnek olarak; erkek sıçanlarda travmatik beyin hasarından 15 dakika, 6 ve 24 saat sonra uygulanan 4-8mg/kg'lık riluzol dozlarının nöroprotektif etkisi gösterilmiştir (Wahl *et al.*, 1997). Riluzolün 100 μ M'lık dozunun, piramidal hücre nekrozisli kemirgenlerde NMDA (N-methyl-D-aspartat) ve veratridin ile uyarılmış LDH'ın salınımını engellediği (Doble, 1996), 30-100 μ M'lık dozunun ise, kortikal hücre kültürlerinde protein kinaz C'yi doğrudan inhibe ettiği bildirilmiştir (Noh, Hwang, Shin, & Koh, 2000). Diğer araştırmalarda da

benzeri nöroprotektif sonuçlar dikkati çekmektedir (Dagci *et al.*, 2000; Debono, Le Guern, Canton, Doble, & Pradier, 1993; Huang *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 1999; Koh *et al.*, 1999; Mary, Wahl, & Stutzmann, 1995; McIntosh, Smith, Voddi, Perri, & Stutzmann, 1996; Moore *et al.*, 1993; Peker *et al.*, 2000; Stutzmann, Pratt, Boraud, & Gross, 1996).

Bulgularımızda nitrit düzeyleri ortam koşullarından bağımsız ancak zamanla önemli derecede ($p < 0.050$) artmıştır. Ayrıca LDH aktivitesindeki zamana paralel artış ile nitrit düzeyleri arasında anlamlı derecede pozitif korelasyon bulunmuştur ($r = .572$, $p < 0.001$).

Aseptik deney koşullarımızdaki astrositler ve mikroglia iNOS'un tetiklenmemiş olacağını, dolayısı ile ölçtüğümüz nitritin eNOS ve nNOS uyarılması ile ortaya çıktığını düşünebiliriz. Ancak, glutamatın yol açtığı özellikle erken onkotik hücre ölümünün yangı yanıtına yol açabileceğini ve ortaya çıkan debrisin de mikroglia'da iNOS etkinliğini tetiklemiş olması ihtimalini gözardı edemeyiz. Nitrit hücre hasarı ve ölümü bağlamında LDH aktivitesi kadar özgül ve kesin bir gösterge sayılmamaktadır (Ikeda *et al.*, 1998). Dolayısı ile, özellikle, geç evrede 7-nitroindazol ile sağlanıp LDH aktivitesi ile doğrulanmış olan koruyucu

etki, kanımızca oldukça global ve gros bir sonucu yansıtan nitrit düzeylerinde özgül bir sinyal olarak kendini göstermemektedir.



SONUÇ

Sonuç olarak bu çalışmamızda, daha önce deneysel serebral iskemi ve omurilik zedelenmesi modellerimizde gözlemiş olduğumuz melatonin, 7-nitroindazol ve riluzolun sağladığı davranışsal koruyucu/iyileştirici etkilere (Dagci *et al.*, 2000; Peker *et al.*, 2000) oldukça benzer sonuçlar elde ettik. Adı geçen ajanların, nöronlar için çok değerli mekanik, metabolik ve biyolojik destek oluşturan glianın *in-vitro* kültüründe de hücre hasar ve ölümünü engelleyici etkiler ortaya koyduğunu gözlemledik. LDH yönünden kültür yaşındaki 14 ile 15. gün arasında kritik bir aralık olduğunu saptadık. Nitrit düzeyi yönü ile sonuçlarımızın 6-24. ve 24-48. saatler arası iki ayrı kritik evreyi işaret ettiğini belirledik. Nitrit düzeyi bulgularımızın hasarlayıcı / istenmeyen nitrik oksiti temsil ettiği kanısındayız. Ayrıca, glia membranından katyon girişi ve glutamat salınımının engellenmesi ile genel serbest radikal giderici ve antioksidan etkileri ve özellikle hücre içi Ca^{2+} düzeyi artışına doğrudan veya dolaylı etkisinden çok, özgül biçimde nöronal NOS'u ketleyici etkinin zamandan bağımsız biçimde nöroprotektif olduğu düşüncesine vardık. Kültür ortamındaki glutamat dozu toksik olduğu halde, glia hücrelerinin membran dinamiği ve metabolizmasına müdahil etkenlerin (riluzol ve melatonin) fizyolojik süreçleri de olumsuz etkilediğini gösterdiğimizi düşünmekteyiz.

ÖZET

Glia hücreleri ve özellikle astrositler santral sinir sistemi hücre içeriğinde önemli bir orana sahiptirler. Glutamat toksisitesine karşı nöronlardan daha dirençli olduğu bilinen glia hücreleri nöron koruyucu mekanizmalara da sahiptir. Oksidan stres, reaktif oksijen türevleri ve serbest radikal oluşumu ve bunlara bağlı organel ve hücre hasarını (akson, glia, endotel dahil) geliştirir. 1-2 günlük sıçan beyinlerinden elde edilen primer mikst glia kültürleri 14. kültür gününde kontrol (n=6), toksisite (glutamat) (n=6), toksisite+melatonin (n=6), toksisite+7-nitroindazol (n=6) veya toksisite+riluzol (n=6) olmak üzere 5 gruba ayrıldı. 20mM glutamat eklenerek toksisite oluşturulduktan sonra, 100µM melatonin, 500µM 7-nitroindazol veya 100µM riluzol kültür ortamına eklendi. 1, 6, 24 ve 48. saatlerde kültür üst sıvıları alındı. Bu örneklerde LDH ve nitrit düzeyleri saptandı. Veriler SPSS programında multivariate ANOVA ve post hoc Bonferroni ile değerlendirildi. Multifaktöryel ANOVA sonuçlarına göre zaman [$F(3,54)= 116.57, p=0.001$] ve gruplar [$F(3,18)=7.993, p=.001$] anlamlı faktörler olarak belirlenmiş ve ayrıca zaman ile gruplar arası anlamlı etkileşim saptanmıştır [$F(12,54)=3.664, p=0.001$]. Verilerin değerlendirilmesinde her saat için ayrı ayrı tek yönlü ANOVA kullanıldığında, bekleneceği üzere yine gruplar arası anlamlı fark bulunmuştur [1,6,24 ve 48 saatler için, sırasıyla: $F(4,28)=7.129,$

$p=0.001$; $F(4,28)= 8.493$, $p=0.001$; $F(4,28)= 6.816$, $p=0.001$; $F(4,25)= 11.822$, $p=0.001$]. Post hoc test (Bonferroni) ile gruplar arası farklar Şekil 3'te gösterilmektedir. 1., 6. ve 48. saatlerde 7-nitroindazol melatoninden daha etkili olmuştur [t test, sırasıyla: $p=0.028$, $p=0.020$, $p=0.001$]. 24. saatte melatonin ve 7-nitroindazol arasında toksisiteyi azaltma yönünden anlamlılık bulunamamıştır. Sonuç olarak bu çalışmamızda, daha önce deneysel serebral iskemi ve omurilik zedelenmesi modellerimizde gözlemiş olduğumuz melatonin ve 7-nitroindazolün sağladığı davranışsal koruyucu/iyileştirici etkilere (Dagci *et al.*, 2000; Peker *et al.*, 2000) benzer sonuçlar elde ettik. Adı geçen ajanların, özellikle 7-nitroindazol'un nöronlar için çok değerli mekanik, metabolik ve biyolojik destek oluşturan glianın *in-vitro* kültüründe de hücre hasar ve ölümünü engelleyici etkiler ortaya koyduğunu gözlemledik.

SUMMARY

Glial cells are the most abundant cell population in the central nervous system. The aim of this study was to examine the effects of melatonin, 7-nitroindazole and riluzole on glutamate toxicity in primary glial cell culture. Six cultured groups of neonatal (1-2 days) Sprague Dawley brain glia were tested after 14 days. First glutamate toxicity was induced by addition of 20 mM glutamate to the cultures, then 100 μ M melatonin, 500 μ M 7-nitroindazole or 100 μ M riluzole was administered in different groups. In each group, LDH activity and nitrite levels were determined at 1st, 6th, 24th and 48th hours.

Statistical analysis of the data was performed by multivariate ANOVA and post hoc Bonferroni tests; a p value of less than .05 was considered significant.

Melatonin and 7-nitroindazole treatment reduced the outcomes of glutamate toxicity significantly at 1st, 6th, 24th and 48th hours ($p < 0,01$). 7-nitroindazole was more effective than melatonin at 1th, 6th and 48th hours ($p < 0,01$). We conclude that melatonin and, especially 7-nitroindazole protected glia reminiscent of the results from our previous *in-vivo* studies.

Key words: primary glial cell culture; glutamate toxicity; melatonin; riluzole; 7-nitroindazole



ÖZGEÇMİŞ

1964 yılında Samsun'da doğdum. İlköğrenimimi Samsun İstiklal İlkokulu'nda, orta ve lise öğrenimimi Atatürk Ortaokulu ve 19 Mayıs Lisesi'nde tamamladım. 1982 yılında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne girip, 1988 yılında mezun oldum. 1988-1990 yılları arasında Diyarbakır SSK Hastanesi'nde mecburi hizmetimi tamamladım. Mayıs 1990'dan Eylül 1995 tarihine kadar Manisa SSK Hastanesi'nde görev yaptım. Eylül 1995-1998 yılları arasında Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesinde Halk Sağlığı Yüksek Lisans Programını tamamladım. 1998 yılından beri Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalında araştırma görevlisi olarak görevime devam etmekteyim. Evli ve bir kız çocuk babasıyım.

KAYNAKLAR

- Antolin, I., Rodriguez, C., Sainz, R. M., Mayo, J. C., Uria, H., Kotler, M. L., Rodriguez-Colunga, M. J., Tolvia, D., & Mendez-Pelaez, A. 1996. Neurohormone melatonin prevents cell damage: Effect of gene expression for antioxidant enzymes. FASEB J., 10: 882-890.
- Aronica, E., Yankaya, B., Jansen, G. H., Leenstra, S., van Veelen, C. W., Gorter, J. A., & Troost, D. 2001. Iontropic and metabotropic glutamate receptor protein expression in glioneuronal tumours from patients with intractable epilepsy. Neuropathol Appl Neurobiol, 27(3): 223-237.
- Babbedge, R., Bland-Ward, P., Hart, S., & Moore, P. 1993. Inhibition of rat cerebellar nitric oxide synthase by 7-nitroindazole and related substituted indazoles. Br. J. Pharmacol., 110: 225-228.
- Bensimon, G., Lacomblez, L., & Meininger, V. 1994. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. N Engl J Med, 330(9): 585-591.

- Bettahi, I., Pozo, D., Reiter, R. J., Acuna-Castroviejo, D., & Guerrero, J. M. 1996. Melatonin reduces nitric oxide synthase activity in rat hypothalamus. J Pineal Res., 20(4): 205-210.
- Bottenstein, J. E. & Sato, G. 1985. Cell culture in the neurosciences. New York: Plenum.
- Bubenic, G. A. & Brown, G. M. 1997. Pinealectomy reduces melatonin level in the serum but not in the gastrointestinal tract of rats. Biol Signals, 6(9): 40-44.
- Cabrera, J., Reiter, R. J., Tan, D. X., Qi, W., Sainz, R. M., Mayo, J. C., Garcia, J. J., Kim, S. J., & El-Sokkary, G. 2000. Melatonin reduces oxidative neurotoxicity due to quinolinic acid: in vitro and in vivo findings. Neuropharmacology, 39(3): 507-514.
- Choi, D. W. 1990a. Methods for antagonizing glutamate neurotoxicity. Cerebrovasc Brain Metab Rew, 2: 105-147.
- Choi, D. W. 1990b. Possible mechanisms limited N-methyl-D-aspartate receptor overactivation and the therapeutic efficacy of N-methyl-D-aspartate antagonists. Stroke, 21: 20-22.

Clemens, J. A., Saunders, R. D., Ho, P. P., Phebus, L. A., & Panetta, J. A. 1993. The antioxidant LY231617 reduces global ischemic neuronal injury in rats. Stroke, 24: 716-723.

Dagci, T., Cagli, S., Zileli, M., Guney, S., & Peker, G. O. 2000. Melatonin, riluzole and 7-nitroindazole improve motor performance following experimental spinal injury. J Neurotrauma, Suppl. S. 17: 968.

Daikhin, Y. & Yudkoff, M. 2000. Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. J Nutr, 130(4S Suppl): 1026S-1031S.

Debono, M. W., Le Guern, J., Canton, T., Doble, A., & Pradier, L. 1993. Inhibition by riluzole of electrophysiological responses mediated by rat kainate and NMDA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. Eur J Pharmacol, 235(2-3): 283-289.

Di Monte, D., Royland, J., Anderson, A., Castagnoli, J. N., & Langston, J. 1997. Inhibition of monoamine oxidase contributes to the protective effect of 7-nitroindazole against MPTP neurotoxicity. J Neurochem, 69: 1771-1773.

- Dingledine, R. & McBain, C. J. (Eds.). 1999. Glutamate and aspartate. Basic neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects: Lippincott-Raven.
- Doble, A. 1996. The pharmacology and mechanism of action of riluzole. Neurology, 47(6 Suppl 4): S233-241.
- Dugan, L. L. & Choi, D. W. 1994. Excitotoxicity, free radicals and cell membrane changes. Ann Neurol, 35: 17-21.
- Dun, N., Dun, S., Forstermann, U., & Tseng, L. 1992. Nitric oxide synthase immunoreactivity in rat spinal cord. Neurosci Lett., 147: 217-220.
- Dusart, I., Marty, S., & Peschanski, M. 1991. Glial changes following an excitotoxic lesion in the CNS--II. Astrocytes. Neuroscience, 45(3): 541-549.
- Dutka, A. J., Kochanec, P. M., & Hallenbeck, J. M. 1989. Influence of granulocytopenia in canine cerebral ischemia induced by air embolism. Stroke, 20: 390-395.

- Ebadi, m., Samejima, M., & Pfeiffer, R. F. 1993. Pineal gland in synchronizing and refining physiological events. NIPS, 8: 30-33.
- Faraci, F. & Brain, J. 1995. 7-nitroindazole inhibits brain nitric oxide synthase and cerebral vasodilatation in response to N-Methyl-D-aspartate. Stroke, 26: 2172-2176.
- Federoff, S. & Richardson, A. 1992. Protocols for Neural Cell Culture. New Jersey: Humana Press.
- Godson, C. & Reppert, S. M. 1997. The melatonin receptors is coupled to parallel signal transduction pathways. Endocrinology, 138(1): 397-403.
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., & Tannenbaum. 1982. S.R. Analysis of nitrate, nitrite and 15N nitrate in biological fluids. Anal. Biochem., 126: 131-138.
- Guerrero, J. M., Reiter, R. J., Ortic, G. G., Pablos, M. I., Seweynek, E., & Chuang, J. 1997. Melatonin prevents increases in neuronal nitric oxide and cyclic GMP production after transient brain ischemia and reperfusion in the mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). J Pineal Res., 23(1): 4-31.

Guevara, I., Iwanejko, J., Dembinska-Kiec, A., Pankiewicz, J., Wanat, A., Anna, P., Golabek, I., Bartus, S., Malczewska-Malec, M., & Szczudlik, A. 1998. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. Clin Chim Acta, 274(2): 177-188.

Guisti, P., Lipartiti, M., Franceschini, D., Schiavo, N., Floreani, M., & Manev, H. 1996. Neuroprotection by melatonin from kainate-induced excitotoxicity in rats. FASEB J., 10(8): 891-896.

Guisti, P., Lipartiti, M., Gusella, M., Floreani, M., & Manev, H. 1997. In vitro and in vivo protective effect of melatonin against glutamate oxidative stress and neurotoxicity. Ann N Y Acad Sci., 15:825: 79-84.

Hansson, E., Muyderman, H., Leonova, J., Allansson, L., Sinclair, J., Blomstrand, F., Thorlin, T., Nilsson, M., & Ronnback, L. 2000. Astroglia and glutamate in physiology and pathology: aspects on glutamate transport, glutamate-induced cell swelling and gap-junction communication. Neurochem Int, 37(2-3): 317-329.

Harley, D. M., Kurth, M., Bjerkness, L., Weiss, J. H., & Choi, D. W. 1993. Glutamate receptor induced $^{45}\text{Ca}^{2+}$ accumulation in cortical cell culture correlates with subsequent neuronal degeneration. J Neurosci., 13: 1993-2000.

Hebert, T., Drapeau, P., Pradier, L., & Dunn, R. J. 1994. Block of the rat brain IIA sodium channel alpha subunit by the neuroprotective drug riluzole. Mol Pharmacol, 45(5): 1055-1060.

Hertz, L., Dringen, R., Schousboe, A., & Robinson, S. R. 1999. Astrocytes: glutamate producers for neurons. J Neurosci Res, 57(4): 417-428.

Hertz, L., Yu, A. C., Kala, G., & Schousboe, A. 2000. Neuronal-astrocytic and cytosolic-mitochondrial metabolite trafficking during brain activation, hyperammonemia and energy deprivation. Neurochem Int, 37(2-3): 83-102.

Hirabayashi, H., Takizawa, S., Fukuyama, N., Nakazawa, H., & Shinohara, Y. 1999. 7-nitroindazole attenuates nitrotyrosine formation in the early phase of cerebral ischemia-reperfusion in mice. Neurosci Lett., 268(2): 111-113.

Holtzman, D. & Olson, J., E.,. 1980. Respiration in rat cerebral astrocytes from primary culture. J Neuroscience Research, 5: 497-506.

Hossmann, K. A. 1994. Glutamate mediated injury in focal cerebral ischemia: The excitotoxin hypothesis revised. Brain Pathology, 4: 23-26.

Huang, C. S., Song, J. H., Nagata, K., Yeh, J. Z., & Narahashi, T. 1997. Effects of the neuroprotective agent riluzole on the high voltage-activated calcium channels of rat dorsal root ganglion neurons. J Pharmacol Exp Ther, 282(3): 1280-1290.

Ikeda, K., Iwasaki, Y., ., & Kinoshita, M. 1998. Neuronal nitric oxide synthase inhibitor, 7-nitroindazole, delays motor dysfunction and spinal motoneuron degeneration in the wobbler mouse. J. Neurological Sciences, 160: 9-15.

Itzhak, Y. & Ali, S. 1996. The neuronal nitric oxide synthase inhibitor, 7-nitroindazole, protects against methamphetamine-induced neurotoxicity in vivo. J Neurochem, 67: 1770-1773.

Jiang, N., Kaku, T., Hada, J., & Hayashi, Y. 1999. 7-nitroindazole reduce nitric oxide concentration in rat hippocampus after transient forebrain ischemia. Eur J Clin Pharmacol., 380(2-3): 117-121.

Karadere, S. 2002. Glutamat toksisitesi oluþturulmuþ glioma hücre dizilerinde MgSO4 ve lazardoid U-83836E nin hücre yapam oranýna etkisi. Osmangazi Üniversitesi, Eskisehir.

Karbownik, M. & Reiter, R. J. 2000a. Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation. Proc Soc Exp Biol Med, 225(1): 9-22.

Karbownik, M., Reiter, R. J., Garcia, J. J., & Tan, D. 2000b. Melatonin reduces phenylhydrazine-induced oxidative damage to cellular membranes: evidence for the involvement of iron. Int J Biochem Cell Biol, 32(10): 1045-1054.

Kato, S., Higashida, H., Higuchi, Y., Hatakenaka, S., & Negishi, K. 1984. Sensitive and insensitive states of cultured glioma cells to glutamate damage. Brain Res., 303(2): 365-373.

Kelly, M. R. & Loo, G. 1997. Melatonin inhibits oxidative modification of human low-density lipoprotein. J Pin Res., 22(4): 203-209.

Kelly, P., Ritchie MI., & McBean, E. 2000. 7-nitroindazole reduces cerebral blood flow following chronic nitric oxide synthase inhibition. Brain Res., 885: 295-297.

Kilic, E. 1999. Pinelektomi yapilmis sicanlarda melatoninin fokal serbral iskemi-reperfuzyon hasari uzerine etkisi. Firat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Ab Dalı, Doktora Tezi.

Kim, S. J., Reiter, R. J., Qi, W., Tan Dx, D., & Cabrera, J. 2000. Melatonin prevents oxidative damage to protein and lipid induced by ascorbate-Fe(3+)-EDTA: Comparison with glutathione and alpha-tocopherol. Neuroendocrinol Lett, 21(4): 269-276.

Kimelberg, H., K.,, Narumi, S., & Bourke, R., S.,. 1978. Enzymatic and morphological properties of primary rat brain astrocyte cultures and enzyme development in vivo. Brain Res., 153: 55-77.

Kimelberg, H., K., Bowman, C., Biddlecome R., S., & Bourke, R., S., 1979. Cation transport and membran potential properties of primary astroglial cultures from neonatal rat brains. Brain Res., 177: 533-550.

Kimelberg, H., K., Goderie, S., K., Colney, P., A., Higman, S., Goldschmidt, R., & Amudson, R., H., 1992. Uptake of serotonin and 3H glutamate by primary astrocyte cultures. I. Effects of different sera and time in culture. Glia, 6: 1-8.

Klein, D. C., Auerbach, D. A., & Weller, J. L. 1981. Seesaw signal processing in pineal cells: Homologous sensitization of adrenergic stimulation of cyclic GMP accompanies homologous desensitization of beta adrenergic stimulation of cyclic AMP. Proc Natl Acad Sci., 78: 4625-4629.

Koh, J. Y. & Choi, D. W. 1987. Quantative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. J Neuroscience Methods, 20: 83-90.

Koh, J. Y., Kim, D. K., Hwang, J. Y., Kim, Y. H., & Seo, J. H. 1999. Antioxidative and proapoptotic effects of riluzole on cultured cortical neurons. J Neurochem, 72(2): 716-723.

Kopin, I. J., Pare, C. M. B., Axeirod, J., & Weissbach, H. 1961. The fate of melatonin in animals. J Biol Chem., 236(11): 3072-3075.

Kostoglou-Athanassiou, I., Treacher, D. F., Wheeler, M. J., & Forsling, M. L. 1998. Bright light exposure and pituitary hormone secretion. Clin Endocrinol (Oxf), 48(1): 73-79.

Lezoualch, F., Skutella, T., Widmann, M., & Behl, C. 1996. Melatonin prevents oxidative stress induced cell death in hippocampal cells. Neuroreport, 7: 2071-2077.

Macrae, I., Dawson, D., Norrie, J., & McCulloch, J. 1993. Inhibition of nitric oxide synthesis; effects upon cerebral blood flow and glucose utilization in the rat. J. Cereb. Blood Flow Metab., 13: 985-992.

Mallo, C., Zaidan, R., Galy, G., Vermeulen, E., Brun, J., Chazot, G., & Calustrat, B. 1990. Pharmacokinetics of melatonin in man after intravenous infusion and bolus injection. Eur J Clin Pharmacol., 38: 297-301.

Manev, H., Uz, T., Kharlamov, A., & Joo, J. Y. 1996. Increased brain damage after stroke or excitotoxic seizures in melatonin deficient rats. FASEB J., 10(13): 1546-1551.

Mary, V., Wahl, F., & Stutzmann, J. M. 1995. Effect of riluzole on quinolinate-induced neuronal damage in rats: comparison with blockers of glutamatergic neurotransmission. Neurosci Lett, 201(1): 92-96.

Mayer, M. L., Westbrook, G. L., & Guthrie, P. B. 1984. Voltage dependent block by Mg of NMDA responses in spinal cord neurons. Nature, 309: 261-263.

McCarthy, K. D. & de Vellis, J. 1980. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. J Cell Biol, 85(3): 890-902.

McIntosh, T. K., Smith, D. H., Voddi, M., Perri, B. R., & Stutzmann, J. M. 1996. Riluzole, a novel neuroprotective agent, attenuates both neurologic motor and cognitive dysfunction following experimental brain injury in the rat. J Neurotrauma, 13(12): 767-780.

Mendez-Pelaez, A. & Reiter, R. J. 1993. Distribution of melatonin in mamalian tissues: The relative importance of nuclear versus cytosolic localization. J Pin Res., 15: 59-69.

Moore, P., Babbedge, R., Wallace, P., Gaffen, Z., & Hart, S. 1993. 7-nitroindazole, an inhibitor of nitric oxide synthase, exhibites anti-nociceptive activity in the mouse without increasing blood pressure. Br. J. Pharmacol., 108: 296-297.

Morley, P., Hogan, M. J., & Hakim, A. M. 1994. Calcium mediated mechanisms of ischemic injury and protection. Brain Pathology, 4: 37-47.

Noh, K. M., Hwang, J. Y., Shin, H. C., & Koh, J. Y. 2000. A novel neuroprotective mechanism of riluzole: direct inhibition of protein kinase C. Neurobiol Dis, 7(4): 375-383.

Nowak, L., Bregestowski, P., & Ascher, P. 1984. Magnesium gates glutamate activated channels in mouse central neurons. Nature, 307: 462-465.

Olney, J. W. & Sharpe, L. G. 1969. Brain lesions in infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. Science, 166: 386-388.

Pablos, M. I., Reiter, R. J., Chuang, J., Genaro, G., Ortic, G. G., Guerrero, J. M., Seweynek, E., & Agapito, M. T. 1997. Acutely administered melatonin reduces oxidative damage in lung and brain induced by hyperbaric oxygen. J Appl Physiol., 83(2): 354-358.

Peker, G. O., Dagci, T., Cagli, S., Yurtseven, T., Islekel, S., Guney, S., Batigun, O., Pehlivan, M., & Zileli M. 2000. Melatonin, 7-nitroindosole and riluzole improve motor performance following focal ischemia and spinal injury in the rat. European Journal of Neuroscience, Suppl. S 12: 117.

Pieri, C., Marra, M., & Moroni, F. 1994. Melatonin: A peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. Life Sci., 55(15): 271-276.

Pixley, S. K. & de Vellis, J. 1984. Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin. Brain Res, 317(2): 201-209.

Pulsinelli, W. 1992. Pathophysiology of acute ischemic stroke. The Lancet, 339: 533-537.

Reiter, R. J. 1987. The melatonin message: Duration versus coincidence hypotheses. Life Sci., 40: 2119-2131.

Reiter, R. J., Hurlbut, E. C., Tannenbaum, M. G., & Troiani, M. E. 1987. Melatonin synthesis in the pineal gland of the Richardson's ground squirrel (*Spermophilus richardsonii*): influence of age and insulin-induced hypoglycemia. J Neural Transm, 70(1-2): 125-136.

Reiter, R. J. 1991a. Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. Endocrine Res., 12(2): 151-180.

Reiter, R. J. 1991b. Melatonin synthesis: multiplicity of regulation. Adv Exp Med Biol, 294: 149-158.

Reiter, R. J., Melchiorri, D., Seweynek, E., Poeggeler, B., Barlow-Walden, L., Chuang, J., Ortic, G. G., & Acuna-Castroviejo, D. 1995. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. J Pin Res., 18: 1-11.

Reiter, R. J., Guerrero, J. M., Escames, G., Pappolla, M. A., & Acuna-Castroviejo, D. 1997a. Prophylactic action of melatonin in oxidative neurotoxicity. Ann N Y Acad Sci., 15; 825: 70-78.

Reiter, R. J., Tang, L., Garcia, J. J., & Munos-Hoyos, A. 1997b. Pharmacological action of melatonin in oxygen radical patophysiology. Life Sci., 60(25): 2255-2271.

Reiter, R. J. 1998. Oxidative damage in central nervous system: Protection by melatonin. Progress in Neurobiology, 56: 359-384.

Reiter, R. J., Cabrera, J., Sainz, R. M., Mayo, J. C., Manchester, L. C., & Tan, D. X. 1999. Melatonin as a pharmacological agent against neuronal loss in experimental models of Huntington's disease, Alzheimer's disease and parkinsonism. Ann N Y Acad Sci, 890: 471-485.

Reiter, R. J., Calvo, J. R., Karbownik, M., Qi, W., & Tan, D. X. 2000a. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. Ann N Y Acad Sci, 917: 376-386.

Reiter, R. J., Tan, D. X., Qi, W., Manchester, L. C., Karbownik, M., & Calvo, J. R. 2000b. Pharmacology and physiology of melatonin in the reduction of oxidative stress in vivo. Biol Signals Recept, 9(3-4): 160-171.

Roda, J. M., Carceller, P., Diez-Teiedor, E., & Avendano, C. 1995. Reduction of infarct size by intracarotid nimodipine administered at reperfusion in a rat model of partially reversible brain focal ischemia. Stroke, 26: 1888-1892.

Rosas, H. D., Koroshetz, W. J., Jenkins, B. G., Chen, Y. I., Hayden, D. L., Beal, M. F., & Cudkowicz, M. E. 1999. Riluzole therapy in Huntington's disease (HD). Mov Disord, 14(2): 326-330.

Samdani, A. F., Dawson, T. M., & Dawson, V. L. 1997. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. Stroke, 28(6): 1283-1288.

Sarantis, M. & Attwell, D. 1990. Glutamate uptake in mammalian retinal glia is voltage- and potassium-dependent. Brain Res, 516(2): 322-325.

Schilling, K., Duvernoy, C., Keck, S., & Pilgrim, C. 1989. Detection and partial characterization of a developmentally regulated nuclear antigen in neural cells in vitro and in vivo. J Histochemistry and Cytochemistry, 37: 241-247.

Schulz, J. B., Matthews, R. T., & Jenkins, B. G. 1995. Blockade of neuronal nitric oxide synthase protects against excitotoxicity in vivo. J Neurosci., 15: 8419-8429.

Siesjö, B. O. K. & Bengtsson, F. 1989. Calcium fluxes, calcium antagonists and calcium related pathology in brain ischemia hypoglycemia and spreading depression: A unifying hypothesis. J Cereb. Blood Flow Metab., 9: 127-140.

Siesjö, B. O. K. 1992. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. J Neurosurg., 77: 169-184.

Sirotkin, A. V. & Schaefer, H. J. 1997. Direct regulation of mammalian reproductive organs by serotonin and melatonin. J Endocrinology, 154: 1-5.

Stankov, B., Franceschini, D., & Reiter, R. J. 1991. Melatonin binding sites in the central nervous system. Brain Res Reviews, 16: 245-256.

Stokkan, K. A., Reiter, R. J., Nonaka, K. O., Lerchl, A., Yu, B. P., & Vaughan, M. K. 1991. Food restriction retards aging of pineal gland. Brain Res., 545: 66-72.

Stutzmann, J. M., Pratt, J., Boraud, T., & Gross, C. 1996. The effect of riluzole on post-traumatic spinal cord injury in the rat. Neuroreport, 7(2): 387-392.

Takano, T., Lin, J. H., Arcuino, G., Gao, Q., Yang, J., & Nedergaard, M. 2001. Glutamate release promotes growth of malignant gliomas. Nat Med, 7(9): 1010-1015.

Tan, D. X., Chen, L. D., Poeggeler, B., Manchester, L. C., & Reiter, R. J. 1993. Melatonin: A potent endogenous hydroxyl radical scavenger. J Endocrinology, 1: 57-60.

Tan, D. X., Manchester, L. C., Reiter, R. J., Qi, W., Kim, S. J., & El-Sokkary, G. H. 1998. Melatonin protects hippocampal neurons in vivo against kainic acid- induced damage in mice. J Neurosci Res, 54(3): 382-389.

Tan, D. X., Manchester, L. C., Reiter, R. J., Cabrera, J., Burkhardt, S., Phillip, T., Gitto, E., Karbownik, M., & Li, Q. D. 2000a. Melatonin suppresses autoxidation and hydrogen peroxide-induced lipid peroxidation in monkey brain homogenate. Neuroendocrinol Lett, 21(5): 361-365.

Tan, D. X., Manchester, L. C., Reiter, R. J., Plummer, B. F., Limson, J., Weintraub, S. T., & Qi, W. 2000b. Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. Free Radic Biol Med, 29(11): 1177-1185.

Tan, D. X., Manchester, L. C., Reiter, R. J., Qi, W. B., Karbownik, M., & Calvo, J. R. 2000c. Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products. Biol Signals Recept, 9(3-4): 137-159.

Tanaka, K. 2000. Functions of glutamate transporters in the brain. Neuroscience Research, 37: 15-19.

Taskiran, D., Kutay F.Z., Sozmen E., & S., P. 1997. Sex differences in nitrite/nitrate levels and antioxidant defence in rat brain. Neuroreport, 8: 881-884.

Traystman, R. J., Kýrsch, J. R., & Koehler, R. C. 1991. Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. J Appl Physiol., 71(4): 1185-1195.

Tymianski, M., Charlton, M. P., Carlen, P. L., & Tator, C. H. 1993. Secondary calcium overload indicates early neuronal injury which precedes staining with viability indicators. Brain Res., 607: 319-323.

Uz, T., Guisti, P., Franceschini, D., Kharlamov, A., & Manev, H. 1996. Protective effect of melatonin against hippocampal DNA damage induced by intraperitoneal administration of kainate to rats. Neuroscience, 73: 631-636.

Wahl, F., Renou, E., Mary, V., & Stutzmann, J. M. 1997. Riluzole reduces brain lesions and improves neurological function in rats after a traumatic brain injury. Brain Res, 756(1-2): 247-255.

Weiss, J. H., Turetsky, D., Wilke, G., & Choi, D. W. 1994. AMPA/Kainate receptor-mediated damage to NADPH-diaphorase containing neurons is calcium dependent. Neurosci Lett., 167: 93-96.

Woodhams, P. L., Basco, E., Hajos, F., Csillag, A., & Balazs, R. 1981. Radial glia in the developing mouse cerebral cortex and hippocampus. Anat Embryol (Berl), 163(3): 331-343.

Wroblewski, F. & Ladue, J. S. 1955. Lactic dehydrogenase activity in blood. Proc Soc Exp Biol Med, 90(1): 210-213.

Xu, W. M. & Liu, L. Z. 1998. Nitric oxide: from a mysterious labile factor to the molecule of the Nobel Prize. Recent progress in nitric oxide research. Cell Res, 8(4): 251-258.

Yilmaz, O. 1997. Primer mikst glia hucre kulturunde asit ortamin yarattigi toksisite. Ege Universitesi, Izmirö Doktora Tezi.

Yoshida, T., Limmroth, V., Irikura, K., & Moskowitz, M. A. 1994. The NOS inhibitor, 7-nitroindazole, decreases focal infarct volume but not the response to topical acetylcholine in pial vessels. J Cereb Blood Flow Metab, 14(6): 924-929.

Young, S. N., Gauthier, S., & Kiely, M. E. 1984. Effect of oral melatonin administration on melatonin, 5-hydroxyindoleacetic acid,

and cyclic nucleotides in human cerebrospinal fluid.

Neuroendocrinology, 39: 87-92.



KISALTMALAR

cAMP= Siklik adenzin mono fosfat

cGMP= Siklik glutaril mono fosfat

GABA= Gama amino butirik asit

K⁺= Potasyum

SSS= Santral sinir sistemi

Serotonin= 5-hidroksitriptamine

NOS= Nitrik oksit sentaz

Ca²⁺= Kalsiyum

NO= Nitrik oksit

nNOS= Nöronal nitrik oksit sentaz

iNOS= İndüklenebilir nitrik oksit sentaz

eNOS= Endotelial nitrik oksit sentaz

Ril= Riluzol

M= Melatonin

7-NI=7-nitroindazol

Na⁺= Sodyum

AML= Amiyotrofik lateral sklerozis

GBM= Glioblastoma multiforme

GAD= Glutamik asid dekarboksilaz

GLAST= Glutamat-aspartat taşıyıcısı

GLT-1= Glutamat taşıyıcısı-1

EAAC₁₋₃= Eksitatör amino asid taşıyıcısı

EAA= Eksitatör amino asit

KA= Kainat

AMPA= Amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoazol propionik asit

NMDA= N-metil-D-aspartat

QUIS= Kuiskilat

IP3= İnositol trifosfat

DAG= Diaçil gliserol

Cl⁻= Klor

H⁺= Hidrojen

Mg²⁺= Magnezyum

DMEM= Dulbecco's Modified Eagle's Medium

FBS= Fetal dana serumu

GFAP= Glial fibriler asidik protein

IgG= İmmunglobulin G

PBS= Fosfat tamponu + % 0.09 NaCl çözeltilisi

DAB= Diaminobenzidin

DMSO= Dimetilsulfoksit

LDH= Laktik dehidrogenaz

NADH= İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid

NAD⁺= Nikotinamid adenin dinükleotid

ŞEKİL ve RESİM LİSTESİ

Şekil 1: Glutamat toksisitesi doz-yanıt grafiği

Şekil 2: Toksikite, toksikite+Melatonin, toksikite+7-nitroindazol ve toksikite+riluzolun 1, 6, 24, 48. saatlerde LDH aktivitesi üzerine etkisi (box plot)

Şekil 3: Toksikite, toksikite+Melatonin, toksikite+7-nitroindazol ve toksikite+riluzolun 1, 6, 24, 48. saatlerde LDH aktivitesi üzerine etkisi (post hoc Bonferroni)

1. saat: Toksikite'den farklı * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$

6.saat: Toksikite'den farklı # $p < 0.05$, ## $p < 0.005$

24.saat: Toksikite'den farklı † $p < 0.05$

48.saat: Toksikite'den farklı a $p < 0.05$, aa $p < 0.005$

Şekil 4: Toksikite, toksikite+Melatonin, toksikite+7-nitroindazol ve toksikite+riluzolun 1, 6, 24, 48. saatlerde nitrit düzeyi üzerine etkisi (box plot)

Şekil 5: Toksikite, toksikite+Melatonin, toksikite+7-nitroindazol ve toksikite+riluzolun 1, 6, 24, 48. saatlerde nitrit düzeyi üzerine etkisi

Şekil 6: LDH aktivitesi ile Nitrit düzeyleri arasında korelasyon grafiği

Resim 1: Glia hücreleri

Resim 2: Glutamat reseptörleri (Leighton *et al* 2001)

Resim 3: Eksitotoksisite

Resim 4: GFAP ile boyanmış glia hücreleri (10X)

Resim 5: GFAP ile boyanmış glia hücreleri (20X)

Resim 6: GFAP ile boyanmış glia hücreleri (40X)

Resim 7: GFAP ile boyanmış glia hücreleri (100X)