

54652

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PRİMER MİKST GLİA HÜCRE KÜLTÜRÜNDE
ASİT ORTAMIN YARATTIĞI TOKSİSİTE**

Fizyoloji Programı

DOKTORA TEZİ

Tıp Doktoru Özlem Yılmaz

Y.Ö. YÜKSEK ÖĞRETİM ENSTİTÜSÜ
DOKÜMANTASYON BİRİMİ

İZMİR - 1997

TEŞEKKÜR

Ege Üniversitesi Tıp Fakóltesi Fizyoloji Anabilim Dalında doktora eğitimim süresince her türlü desteği sağlayan tez danışmanım ve Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Nuran İ. Hariri'ye, verdikleri destekten ötürü Sayın Prof. Dr. Şakire Pöęün, Doç. Dr. Serdar Demiręören, Yard. Doç. Dr. Lütfiye Kanıt, Yard. Doç. Dr. Oęuz Algan, Dr. Dilek Taşkıran ve Dr. Burcu Balkan'a, yetişmemde emeği geçen Anabilim Dalımızın tüm öğretim üyelerine ve her aşamada bana destek olan eşim Bedri Yılmaz'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİ	1
I. Glia Hücrelerinin Özellikleri.....	3
II. Glia Hücrelerinin Kültür Ortamında Üretilmesi.....	8
III. Glia Hücrelerinin Kültürünün Dezavantajları.....	12
IV. İskemi-Ph İlişkisi.....	12
V. Hücre Ölümü-Canlılığının Belirlemede Kullanılan Başlıca Teknikler.....	13
GEREÇ VE YÖNTEM	15
I. Kültür Öncesinde Yapılan Hazırlıklar.....	15
II. Primer Hücre Kültürünün Hazırlanması.....	17
III. Immunohistokimya.....	20
IV. Mikroskop Görüntüleme Yöntemi.....	23
V. Sitotoksosite Deneyleri.....	23
a) Tripan Blue Boyaması ile Toksikite Tayini.....	24
b) LDH Ölçümüyle Toksikite Tayini.....	26
BULGULAR	28
I. Primer Glia Hücre Kültürünün Elde Edilmesi.....	28
II. Tripan Blue Reddi Deneyi ile Toksikitenin Gösterilmesi.....	32
III. LDH Aktivitesi ile Toksikitenin Gösterilmesi.....	36
TARTIŞMA	40
SONUÇ	47
ÖZET	49
SUMMARY	50
KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ	59

GİRİŞ VE AMAÇ

Santral sinir sistemi, fonksiyonlarının yanı sıra hücre içeriği açısından da oldukça heterojen bir yapıya sahiptir. Burada en geniş yer tutan hücre popülasyonu gliadır.

Glia, çok uzun yıllar beyinde sinir hücrelerini (nöronları) bir arada tutmaya yarayan tutkal olarak düşünülmüş bir hücre grubudur. Oysa son yıllarda, glia hücrelerinin santral sinir sistemindeki bir çok yeni fonksiyonlarının varlığı kabul edilmektedir.

Primer hücre kültürleri aktif metabolik yapıya sahip hücrelerin araştırılması amacıyla oluşturulan bir modeldir. Kültür ortamlarında yapılan çalışmalar canlı sinir hücrelerinin dinamik aktivitelerinin gösterilmesinde kullanılabilmiştir. Glia hücresinin gelişimi ve fonksiyonları hakkındaki bilgilerimiz, büyük bir oranda santral sinir sisteminden elde edilen glia hücre kültürleri ile yapılan çalışmalar sonucu elde edilmiştir. Bu yöntemler aracılığıyla glia hücrelerinin fizyolojik özelliklerinin yanı sıra çeşitli patolojik süreçlerdeki fonksiyonları da bugün için çalışılan konular arasındadır.

Bugün için santral sinir sistemi bozukluklarının başında iskemi ve bunun yol açtığı asidite yer almaktadır. İskemi sonrasında asiditeye maruz kalan ortamlarda farklı hücrelerin verdikleri yanıtlar araştırılmaktadır. Nöron ve glia hücrelerinin asidozis

sonrasındaki viabilite oranlarının anlaşılması, çözümler ya da patolojilerden korunma yollarının anlaşılabilmesinde önemli bir adımdır. Bu çalışmalarda in-vivo ortamların yanısıra hücre davranışlarının daha kolay denetlenebileceği in-vitro ortamlar da yoğun olarak kullanılmaktadır. Nöronlarla yapılmış çok sayıda çalışma olmasına rağmen glia hücrelerinin sadece nöronlara destek görevi olduğu düşünüldüğünden bu konuda üzerinde yapılmış az sayıda çalışma vardır.

Sinir sisteminin bozukluklarının altında yatan nedenler anlaşıldıkça korunma yolları ve çözümler ortaya çıkmaktadır. Biz de oluşturduğumuz doku kültürü laboratuvarında, elde edilecek sonuçların bu konudaki klinik yaklaşımlarda yararlanılabilecek bilgiler oluşturacağı düşüncesiyle, glia hücre canlılığının ekstrasellüler ortamın pH sınırından ne oranda etkilendiğini göstermeyi amaçladık.

GENEL BİLGİ

I. GLİA HÜCRELERİNİN ÖZELLİKLERİ

Glia hücresi miyelinizasyon özelliği dışındaki morfolojik özellikleri ile ilk defa 1824 yılında Dutrochet tarafından tanımlanmıştır . Virchow 1860 yılında santral sinir sisteminde nöronların çevresinde bulunması nedeniyle “nerve glia” veya nörogliya kavramını ortaya atmıştır (4).

Bazı karşı görüşlerin bulunmasına rağmen nöron ve glia hücrelerinin farklı “stemsell” (kök hücre) hücrelerinden köken aldığı düşünülmektedir (4). Penfield (47), glia gelişimini şematize etmiştir (bkz Şekil 1). Serebral kortekste glial hücre farklılaşmasının birçok basamağı yapısal fonksiyonel ve moleküler düzeyde tanımlanmıştır (5). 1909 yılında Ramon J Kajal ve 1919’da del Rio Hortega tarafından metalik impregnasyon tekniğiyle 3 farklı hücre grubunun olduğu öne sürülmüştür (4). Bunlar astrositler, oligodendrositler ve mikroglia hücreleridir. 1960 lı yıllarda elektron mikroskopunun yardımıyla hücre tipleriyle ilgili daha ayrıntılı tanımlamalar yapılabilmıştır. Son yıllarda

immunolojik tekniklerin geliştirilmesiyle spesifik hücre tipleri daha kolay ayırt edilmeye başlamıştır.

Günümüzde yaygın olarak kabul edilen sınıflamada vertebralı sinir sisteminde glia hücreleri iki 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.

Oligodendrositler ve Schwann hücreleri daha az sayıda ve daha küçük uzantıları olan hücrelerdir. Bu hücreler, elektriksel sinyallerin iletimini artıran myelin kılıfı oluşturarak aksonu çevresinden izole ederler. Oligodendrositler santral sinir sisteminde, Schwann hücreleri periferik sinir sisteminde bulunan aksonların çevresinde miyelinizasyon oluşturur. Oligodendrositlerin sitoplazmaları, astrositlere göre daha yoğundur, çekirdekleri daha koyu boyanır ve uzantıları astrositler gibi parlak efektlidir, astrositlerde bulunan 90 °A filamentleri bulunmaz, 240 °A filamentler mevcuttur.

Astrositler glia hücre grubunun en fazla sayıda bulunan, daha fazla fonksiyona sahip olan grubudur. Penfield tarafından 1932 yılında, yuvarlak çekirdekleri, geniş düzensiz sitoplazmaları olan parlak görüntülü hücreler olarak tanımlanmışlardır (44). Günümüzde kabul edilen ayırt 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 sinaptik aralıktan uzaklaştırırlar. Kan beyin bariyeriyle uç ayaklarla temasta bulunarak nöronların beslenmesini sağlarlar. Hasarlı dokuda oluşan atıkları mikrogliya hücreleri ile birlikte uzaklaştırarak doku iyileşmesine yardımcı olurlar. Yüksek nöron aktivitesi sırasında nöronlar tarafından salgılanan K^+ fazlalığını tamponlarlar (25). Hasar sonrasında morfolojik değişikliğe uğrayarak reaktif astrositleri oluştururlar (9).

Morfolojik özelliklerine göre iki grupta toplanırlar: Fibröz astrositler (Tip I) ve Protoplazmik astrositler (Tip II).

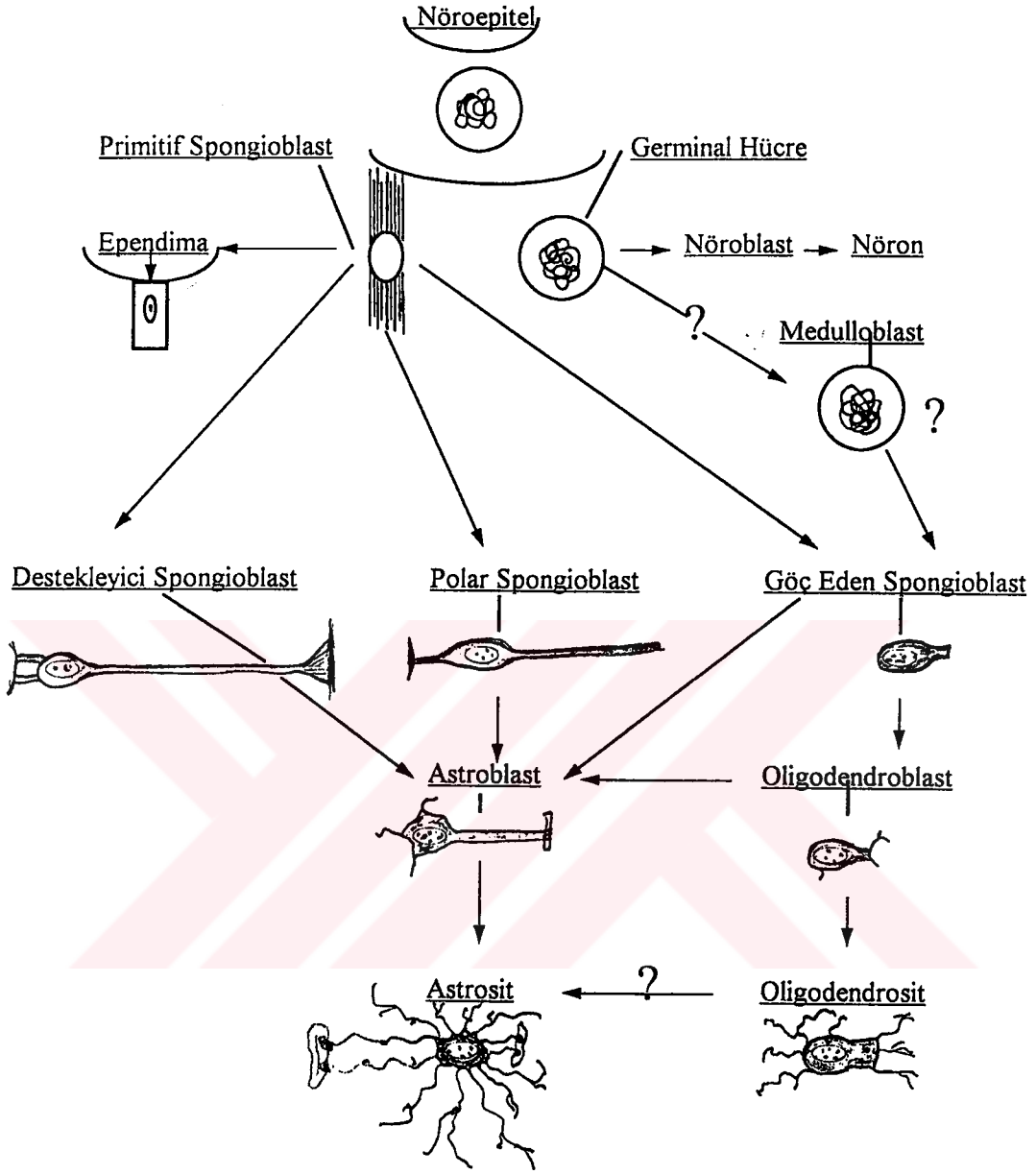
Fibröz astrositler beyaz cevherde yaygın olarak bulunurlar. Morfolojik yapıları düzensizdir, genelde bir veya bir kaç uzantısı diğerlerinden daha kalındır. Bir çok nörotransmitter ve iyon kanalı eksprese eder. Nöronlardakine benzer olarak kalsiyum, araşidonik asit, cAMP, cGMP gibi birçok haberci sistemini aktive ederek enzim indüksiyonu, nöromodülatör sekresyonu gerçekleştirirler (3).

Protoplazmik astrositler gri cevherde daha yaygındır. Nöronal aktiviteyle ilgili süreçlerde yer alırlar. Eksitatör amino asit, GABA gibi transmitterler için geri alım (up take) mekanizmaları mevcuttur. Purinerjik, kolinerejik reseptörlerle intrasellüler kalsiyum düzeyini regüle ederler. Kapillerle daha yakın ilişkilidirler. Bergman Gliası gibi özelleşmiş tipleri mevcuttur (3).

Glia hücrelerinin özellikleri aşağıdaki gibi özetlenebilir (25):

- Beyin dokusunu oluşturacak şekilde destek elemanı fonksiyonları vardır, nöron gruplarını birbirinden ayırır ve izole ederler.
- Miyelin kılıf oluşturarak geniş aksonların çoğunu izole eder ve elektriksel sinyalin hızlı şekilde iletilmesini sağlarlar.
- Hasarlanma ve nöron ölümü sonrasında doku artıklarını uzaklaştırırlar.
- Ekstrasellüler alanda K^+ iyon fazlalığını tamponlar, sinaptik ileti sırasında nöronlar tarafından salgılanan kimyasal transmitterleri uzaklaştırırlar.
- 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.

A- NÖROGLİANIN GELİŞİMİ



B-MİKROGLİANIN GELİŞİMİ

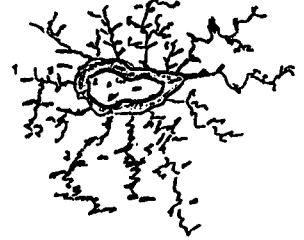
Pia ve Adventisiyadan
gelen fibroblastlar



Göç Eden Mikroglia



Mikroglia



Şekil 1: Glia Hücresinin Gelişimi (Penfield'den modifiye edilmiştir)

II.GLİA HÜCRELERİNİN KÜLTÜR ORTAMINDA ÜRETİLMESİ

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 (45). Kültür sinir hücrelerinin yoğun olarak çalışmalarında kullanılmaya başlaması 1970 li yılların başındadır (3).

Glia hücreleri santral sinir sistemi 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 (3).

Primer miks glia kültürü, astrosit, oligodendrosit ve mikroglıadan oluşmuş bir grupta yeni doğan bir sıçan beyninden serum destekli bir ortamda elde edilmiştir (34). 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 (37).

Bu konuda önemli iki çalışmadan ilkinde immatür beyinlerin hücre kaynağı olarak kullanılması mümkün olmuştur (34). İmmatür beyin dokusundan alınan hücrelerin daha hızlı bölünerek bir iki haftada tek tabakalı yoğun bir hücre tabakası oluşturabildiği gösterilmiştir. Bu hücrelerin glia hücre serisi (line) haline dönüştürülmesi de mümkün olmuştur. Primer kültür ortamlarında diğer hücelere oranla daha hızlı gelişebildiği ve büyük oranlar oluşturabildiği için primer astrosit kültürleri daha çok tercih edilen bir model haline gelmiştir (11).

İkinci çalışmada ise bu hücreleri tanımlayabilen immunolojik işaretleyiciler gösterilmiştir (2). Hücreye özgü proteinlere karşı oluşturulan antikolar ile hücreler birbirinden kesin olarak ayrılabilmiş ve özel immunolojik tekniklerle saf kültürler elde edilebilmiştir (65). Bu yöntemler aracılığıyla, elde edilen glia hücreleri tanımlanabilmiş ve pek çok özelliği gösterilebilmiştir.

Bu özellikleri arasında:

- Reseptör ekspresyonu,
- Nörotrofik faktör sekresyonu,
- Membran iyon geçirgenliği
- Enzim indüksiyonu,
- Protein sentezi,
- Nörotransmitter alımı
- Metabolik süreçler
- Lipid metabolizması sayılabilir.

Primer hücre kültürlerinin in vivo ortamlarla paralellik göstermesi, çalışmaların çoğunun bu ortamlarda yapılmasına yol açmıştır. Glia hücrelerinin enzim aktivasyonu gelişimsel ve bölgesel olarak in vivo hücreler ile uyumludur (27). Olson, kültürdeki glia hücrelerinin enerji metabolizmasının in vivo hücrelerle uyumlu olduğunu göstermiştir (19), çeşitli nükleer proteinlerin gelişimi de in vivo eş değerleriyle aynı özellikleri gösterir (52). Glutamat ve serotonin geri alımı in vivo ortama benzer şekilde bölgesel farklılık gösterir (1, 29). Travma sonrasında astrosit davranışının modülasyonu in vivo ile uyumludur (10).

Bu özelliklerin yanı sıra astrositlerin çeşitli patolojik süreçlerdeki fonksiyonları da bugün için çalışılan konular arasındadır (15, 41). Astrositlerin nöronları toksisiteye karşı koruyucu rol oynadığı, astrosit sayısında azalma ile birlikte kortikal nöronlarda hasara uğrama oranının yükseldiği ve glutamat geri alımıyla nöronları eksitatör amino asit toksisitesinden koruduğu (48, 49, 50) öne sürülmüştür. Bazı nörotoksik ajanların glutamat geri alımını engelleyerek etki gösterdiği vurgulanmıştır (7). Kimyasal ajanlarla

yaratılan hipoksinin (59) ve glikokortikoidlerin (6) astrositlerde glutamat geri alımını düşürdüğü gösterilmiştir. Ekstrasellüler K^+ un arttığı durumlarda da glutamat geri alımının bozulduğu, glutamatın toksik düzeylere ulaştığı gösterilmiştir (51). Astroglia hücreleri K^+ fazlalığını uzaklaştırarak nöronları korurlar (26, 28). Bu hücrelerin hücre dışı ortamın sıvı/iyon yoğunluklarının kontrolünde önemli rolü olduğu belirtilmiştir (28). Geri alım çalışmalarında çalışılan besiyeri ortamlarının serum içeriğinin glutamat geri alımını etkilemediğini gösterilmiştir (29).

Primer kültürlerde toksik ajanlarla yapılan çalışmalarda; ethanolün nöronal göçü sağlayan önemli glial filamentleri bozduğu (46), astrosit DNA ve protein içeriğinde değişiklikler yarattığı (17), mitokondri ve düz endoplazmik retikulumda yapısal değişikliklere yol açarak enzim aktivitesinde azalmaya yol açtığı (33), sitokrom P450E1'i indükleyerek serbest radikal oluşumuyla toksisite oluşturduğu (36), çinkonun ısı-şok proteinlerini indükleyerek (60), kurşunun aerobik enerji metabolizmasını bozarak (20) hücre hasarına yola açtığı gösterilmiştir. Glikokortikoidlerin de glutamat geri alımını engelleyerek hasar oluşturduğu belirtilmiştir (21).

Nöron ve astrosit hücre canlılığının devam etmesinde ortam pH ı en önemli etkenlerden biridir. İskemi sonrasında yaygın astroglial değişiklikler olur (23). Özellikle iskemiye bağlı olarak düşen pH değerleri hücre ölümüne yol açmaktadır (39). İskemi sırasında hücre dışı ve hücre içi pH'ın düşmesi nedeniyle (32), glia hücreleri canlılığını kaybetmeye başlar (13, 16, 39), hücre ölüm hızı pH nın düşme derecesiyle paraleldir (39), asit ortama maruz kalınan sürenin artması da hücre kaybını artırmaktadır (16).

III. GLIA HÜCRELERİ KÜLTÜRÜNÜN YETERSİZ KALDIĞI DURUMLAR

Glia hücrelerinin in vitro çalışmalarda kullanılmasının yanısıra yetersiz kaldığı durumlar da bulunmaktadır. Öncelikle immatür beyin dokusundan elde edilerek hazırlanmaktadırlar, 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 ayırt edilebilirken glia hücresinde bu ayırım daha zordur. Bazı özellikleri nöronlarla ilişkili olmalarından kaynaklanmaktadır. Örneğin aksonlarla birlikte bulunan ve bulunmayan Schwann hücrelerinin özelliklerinin farklı olduğu gösterilmiştir (11).

IV. İSKEMİ-PH İLİŞKİSİ

İskemi, doku kanlanmasının yetersizliği olarak tanımlanmaktadır. Çok kısa süreli olduğunda çok az patolojik bulgu verebilir veya hiç vermeyebilir. İskemik bölgenin sadece oksijenlenmesi bozulmakla kalmaz, ortamda gerekli enerji glikozun anaerobik yolla laktata yıkılımı ile elde edilir; laktik asit gibi metabolitlerin uzaklaştırılması da

sekteye uğrar ve asidozis (laktik asit birikimi) meydana gelir (24, 39, 40). İskemi sırasında hücre dışı ve hücre içi pH düşer (32, 53). Preiskemik hiperglisemi asidozu daha da artırır (24).

Global veya fokal olarak oluşan iskemi asidozis ile birliktedir. Asidozis sitotoksik beyin ödemi oluşumuna ve nöron ve glia hücrelerinin geri dönüşümsüz hasarına yol açabilir (16). Bu hasar asit ortama maruz kalınan süreye ve ortamın pH derecesine bağlı olarak değişir (16, 39). İskemik hasarın oluşumunda asidoz, eksitator amino asit ve oksijen radikalleri ile birlikte rol oynar (64).

V. HÜCRE ÖLÜMÜ/CANLILIĞININ BELİRLENMESİNDE KULLANILAN BAŞLICA TEKNİKLER

Bu yöntemlerin çoğu hücre ölümü/canliliğının direkt olarak ölçülmesinde ziyade ölümü/canliliğı belirleyen indirekt yöntemlerdir. Aşağıda belirtilen şekilde gruplanabilirler (12):

Membran bütünlüğünün saptanmasına dayanan testler (En sık kullanılan yöntemlerdir)

- Cr salgılanması; ⁵¹Cr ile işaretlenen sitoplazma proteinleri hücre ölümü ile açığa çıkar.
- Enzim salgılama testleri; LDH gibi sitoplazma enzimleri hücre ölümü ile açığa çıkar.

- Boya reddetme (exclusion) testleri; membran bütünlüğü bozulan hücreler ortamdaki tripan mavisi, eozin Y, nigrasin vb boyaları içine alır.

Respirasyon (oksijen kullanımı) ve glikolizi (oksijen üretimi) belirleyen testler, oluşan metabolitlerin değişme hızının saptanmasına dayanır.

Radyoizotop işaretli metabolitlerle yapılan testler; radyoaktifle işaretlenen metabolitler ölçülür. Nükleotidler, fosfat, glikoz, amino asit ve kalsiyum radyoizotoplarla işaretlenebilir.

Protein saptanması; hücre protein içeriğinden hücre sayısı saptanabilir.

Kalorimetrik testler, protein içeriği (metilen mavisi, sülförödamın B), DNA içeriği, lizozom veya golgi aktivitesi, enzim aktivitesi (hegzosomidaz, mitokondri süksinat dehidrogenaz) ölçümüne dayanır.

GEREÇ VE YÖNTEM

I. KÜLTÜR ÖNCESİNDE YAPILAN HAZIRLIKLAR

Kullanılan Araç ve Gereçler

- Cam malzemeler: Şişe (100 ml), beher (125 ml), erlanmeyer (125 ml) ve pipetler (10 ml, 5 ml, pastör pipeti), hemositometre (Neubauer)
- 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), santrfüj 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 $K_2Cr_2O_7$ ve H_2SO_4 içeren solusyonun 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 etanolde 12 saat bekletilerek sterilize edilmiştir. Plastik malzemeler steril olarak temin edilmiştir.

Kullanılan Kimyasal Malzemeler

- Etanol (%80)
- Besiyeri: Hazır besiyeri olarak DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Sigma 5546) kullanılmıştır.
- Fetal Dana Serumu (FCS): Steril FCS (Biological Instrument-285013) kullanılmıştır.
- Tripsin solusyonu (%0.25): Steril tripsin solusyonu (Biological Instrument-635515) kullanılmıştır.
- Penisilin-streptomisin solusyonu (10 000 U/ml penisilin, 10 mg/ml streptomisin Biological Instrument-705705)
- L-Glutamine (Seromed K0281)

Üretim Besiyerinin Hazırlanması

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

II. PRİMER HÜCRE KÜLTÜRÜNÜN HAZIRLANMASI

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

Hücrelerin Elde Edilmesi

Çalışmada yenidoğan (d1-d2) 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 santrfüj tüpünde toplanmıştır.

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

Çözelti oda ısısında 2000 rpm hızda 5 dakika süreyle santrfüje edilmiştir. Santrfüj sonrasında üst kısımda kalan sıvı uzaklaştırılmıştır. Sedimente DMEM eklenerek pipetle karıştırılmıştır.

Solusyon 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.

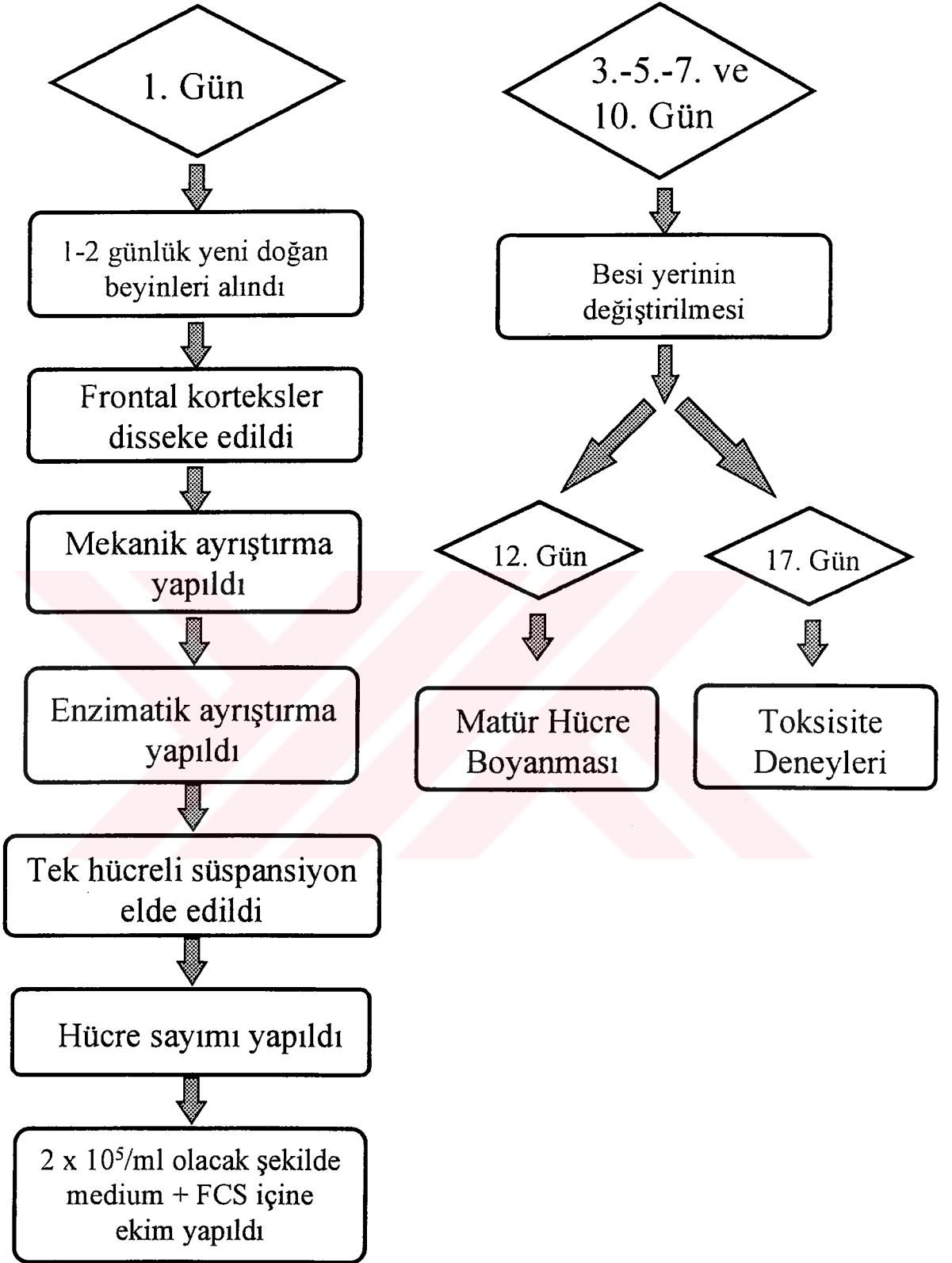
Hücrelerin Ekilmesi

Hücre sayımı yapıldıktan sonra hücre çözeltisi 2x 10⁵ hücre/ml olacak şekilde üreme besiyeri ile sulandırılmıştır. Hazırlanan suspansiyondan 35 mm.lik petri kaplarına 2 ml konulmuştur. Her ekim deneyinde petri kaplarından birinde glia hücrelerinin 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.

Hücrelerin glia olduğu 11-12. günlerde bu hücelere özgü Glial Fibriler Asidik Protein (GFAP) ile boyanarak belirlenmiştir. Büyümelerini ve çoğalmalarını tamamlayarak tek tabakalı hücre topluluğu oluşturan kültür hücreleri 16-18. günlerde sitotoksisite deneylerinde kullanılmıştır.



Şekil 2. Doku Kültürünün Hazırlanması

III. İMMUNOHİSTOKİMYA

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

Kullanılan malzemeler

- GFAP antikoru (Sigma-G9269) antikoru: Glia hücrelerinde bulunan Glial Fibriler Asidik Proteine spesifik bir antikordur. İnsan beyninden elde edilen saflaştırılmış GFAP immunojen olarak kullanılarak tavşanda antiserum geliştirilmiştir. Antiserumda bulunan IgG fraksiyonu kromotograf ile saflaştırılmıştır.
- Paraformaldehit (%3)
- PBS (Fosfat tamponu + % 0.09 NaCl solusyonu)
- Sekonder antikor (Peroxidaz ile konjuge edilmiş antikor)
- DAB (Diaminobenzidin yıkama tamponu, pH: 7.4)
- H₂O₂
- Tris tamponu (Tris HCL, pH: 7.4)

Immunolojik Boyama

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

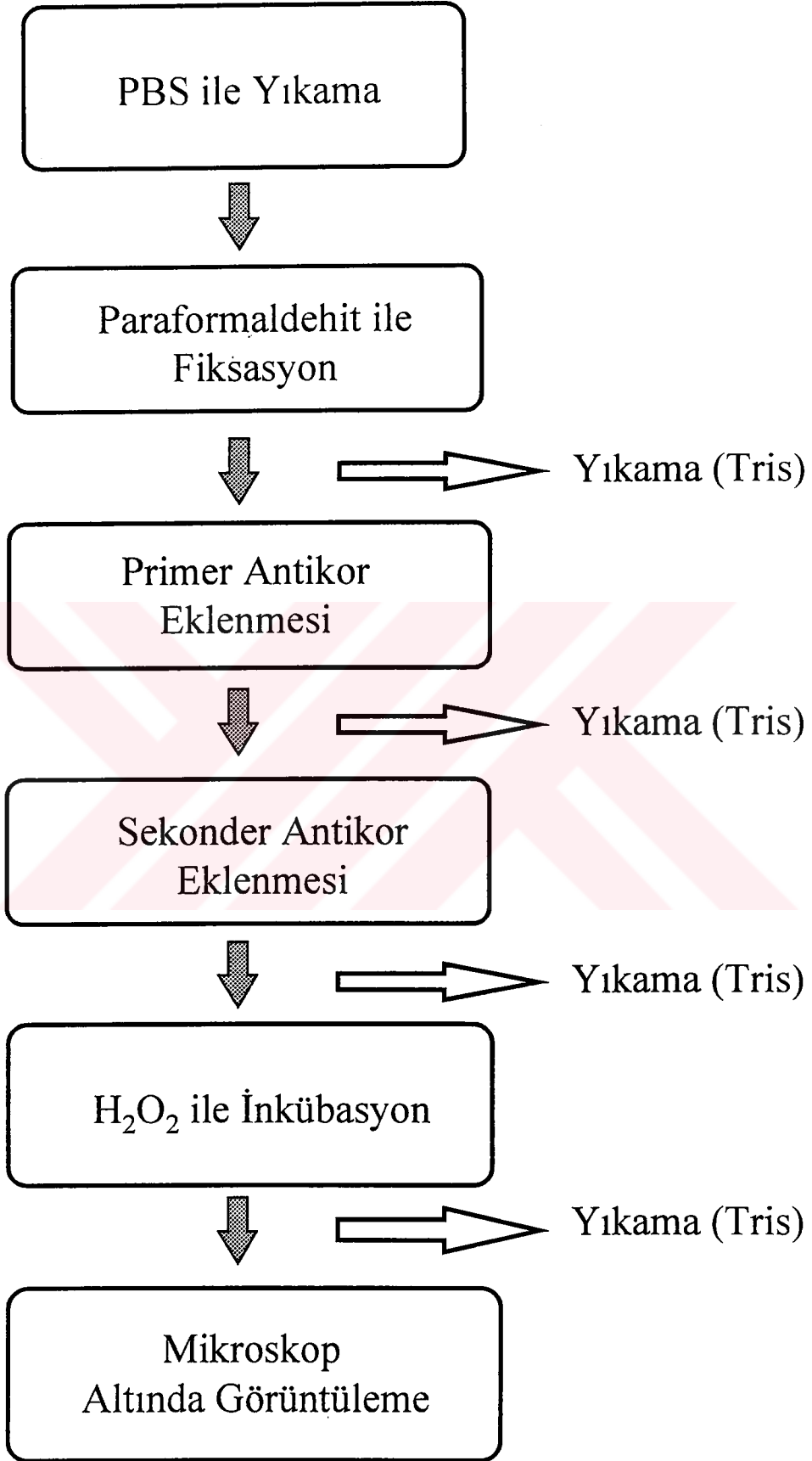
Sabitlenen hücreler tris ile yıkanmış ve hücre üzerini kaplayacak şekilde primer antikor eklenmiştir. Oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir.

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

Hücreler tris ile yıkanarak %1 lik H_2O_2 içeren DAB solusyonu 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.



Şekil 3. İmmunohistokimyasal Görüntüleme

IV. MİKROSKOP GÖRÜNTÜLEME YÖNTEMİ

Petri kabında bulunan hücreler Olympus BX-50 ışık mikroskopunda (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.

V. SİTOTOKSİSİTE DENEYLERİ

Toksisitenin Oluşturulması

16-18 günlük kültür hücrelerinin besiyeri ortamları (normal koşullarda pH: 7.4 ± 0.1) aynı organik ve inorganik maddeleri içeren daha düşük pH'lı besiyerleriyle (pH: 6.5 ± 0.1 , pH: 6.0 ± 0.1 , pH: 5.5 ± 0.1 , pH: 5.0 ± 0.1 , ve pH: 4.5 ± 0.1) değiştirilmiştir. Besiyeri pH ları 1N HCL ile düşürülmüş, ölçüm Jenway 3020 pHmetre ile yapılmıştır. Bu pH değerlerinde hücreler 10, 30, 60 ve 120 dakika süreyle %5 CO₂, %97 nem içeren inkübatörde 37 °Cde inkübe edilmiştir. Asit ortama maruz bırakılan hücre kültürlerinde

sitotoksosite birbirine paralel iki deneyle saptanmıştır. Oluşturulan gruplar tabloda gösterilmiştir.

pH: 7.4± 0.1	pH: 6.5± 0.1	pH: 6.0± 0.1	pH: 5.5± 0.1	pH: 5.0± 0.1	pH: 4.5± 0.1
10 dakika	10 dakika	10 dakika	10 dakika	10 dakika	10 dakika
30 dakika	30 dakika	30 dakika	30 dakika	30 dakika	30 dakika
60 dakika	60 dakika	60 dakika	60 dakika	60 dakika	60 dakika
120 dakika	120 dakika	120 dakika	120 dakika	120 dakika	120 dakika

Tablo I: Deney Grupları

V a. TRIPAN BLUE BOYAMASI İLE TOKSİSİTE TAYİNİ

Kullanılan Malzemeler

- Tripan Blue solusyonu (%0.4; Sigma T6146)
- Tripsin solusyonu (%0.25)
- PBS
- Santrifüj tüpü (15 ml)
- Hemositometre (Neubauer)

Membran bütünlüğünü kaybeden ölü hücreler ortamdaki boyayı aldıklarından mikroskopta koyu renkte görünmektedirler. Canlılığını sürdüren hücreler parlak renkte görünürler. Ölü hücrelerin tüm hücre sayısına oranı ölü hücre yüzdesini verir (30).

Farklı sürelerle farklı pH ortamlarına maruz bırakılan hücreler (bkz tablo) inkübatörde 1 saat süreyle normal inkübasyon besiyerlerinde inkübe edilmişlerdir. Ortama tripsin eklenerek yüzeye yapışan hücreler ayrılmışlardır. Hücre çözeltisi santrfüj tübüne aktarılarak 1000 rpm hızda 5 dakika süreyle santrfüj edilmiştir.

Üst kısımda kalan sıvı atılmış ve sediment 1 ml PBS ile sulandırılarak iyice karıştırılmıştır. Bu hücre çözeltisi %10 oranında Tripan blue çözeltisi ile karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 4 dakika inkübe edilmiştir.

Hemositometrede canlı (boyanmamış) ve ölü (boyanmış) hücreler sayılmıştır. Canlı hücre oranı aşağıdaki formülle hesaplanmıştır:

$$\text{Canlı Hücre Oranı (\%)} = \frac{\text{Canlı hücre sayısı}}{\text{Canlı hücre sayısı} + \text{Ölü hücre sayısı}} \times 100$$

V b. LAKTİK DEHİDROGENAZ (LDH) ÖLÇÜMÜ İLE TOKSİSİTE TAYİNİ

Kullanılan Malzemeler

- LDH kiti (NADP ve KHPO₄ tamponu Sigma-LD-P kiti),
- Sodyum piruvat solusyonu
- Spektrofotometre (Philips PU 8600)

LDH, hücre membranı bütünlüğünün bozulmasıyla ortaya çıkan sitoplazmik bir enzimdir. Kültür besiyerine salgılanan LDH miktarı hücre ölüm oranını verir (31). LDH, NADH (İndirgenmiş Nikotinamid dinukleotid) varlığında piruvatı laktata dönüştürmektedir. Bu yöntemde enzim aktivitesi, ortamda bulunan NADH ın NAD (Nikotinamid dinukeotid)' e oksidasyonunun spektrofotometrik olarak 340 nm de ölçülmesiyle bulunur (66).

Farklı pH değerlerindeki ortamlara farklı sürelerde maruz bırakılan hücreler (bkz tablo) 24 saat süreyle normal pH lı besiyerinde %5 CO₂, %97 nemli hava içeren inkübatörde 37°C de 24 saat inkübe edilmişlerdir. 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 aktarılmıştır. Absorbans değişikliği 30 saniye aralıkla 3 dakika boyunca okunmuştur. Absorbans değişikliğinin lineer olduğu aralık ΔA olarak belirlenmiştir.

LDH aktivitesi Unite/ml cinsinden aşağıdaki formülle hesaplanmıştır:

$$\text{Serum LD (Ünite / ml)} = \frac{\Delta \text{ Absorbans} \times \text{Isı düzeltme faktörü}}{0.001 \times 0.05 \times \text{Işık aralığı(cm)}}$$

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Bu çalışmada bulguların değerlendirilmesinde *SPSS Inc V6.1* istatistik programı kullanılmıştır. Verilerin değerlendirilmesi için iki yönlü ve tek yönlü *ANOVA* ile *Duncan's multipl range* testi uygulanmıştır.

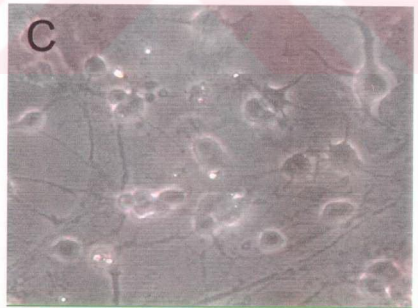
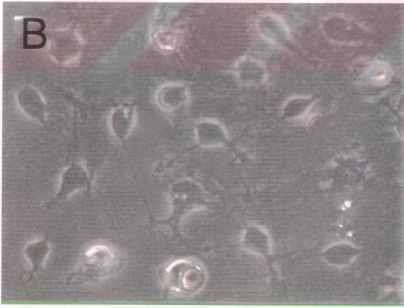
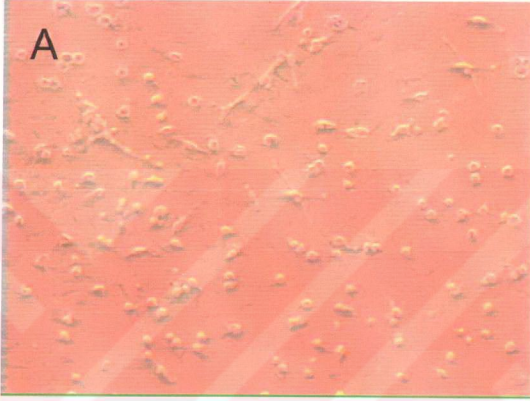
BULGULAR

Bulgular 3 grupta toplanmıştır:

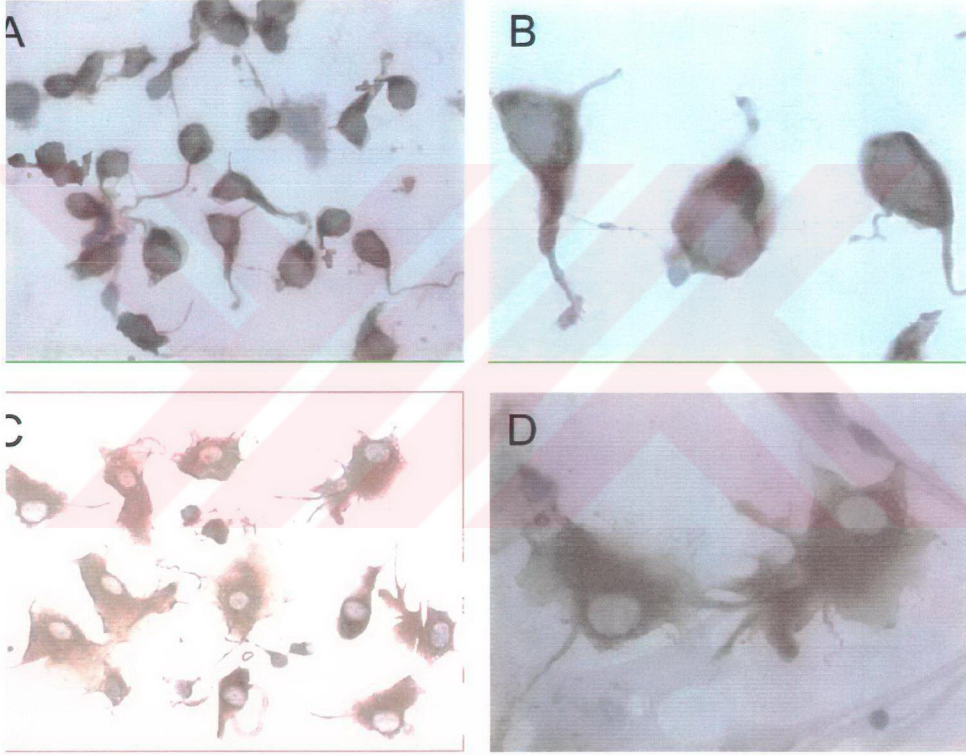
- I. Primer glia kültürünün (mikst) elde edilmesi
- II. Glia kültüründe asiditenin yol açtığı toksisitenin Tripan Blue reddi deneyi ile gösterilmesi
- III. Glia kültüründe asiditenin yol açtığı toksisitenin LDH enzim aktivitesi ile gösterilmesi

I. Primer glia kültürünün elde edilmesi:

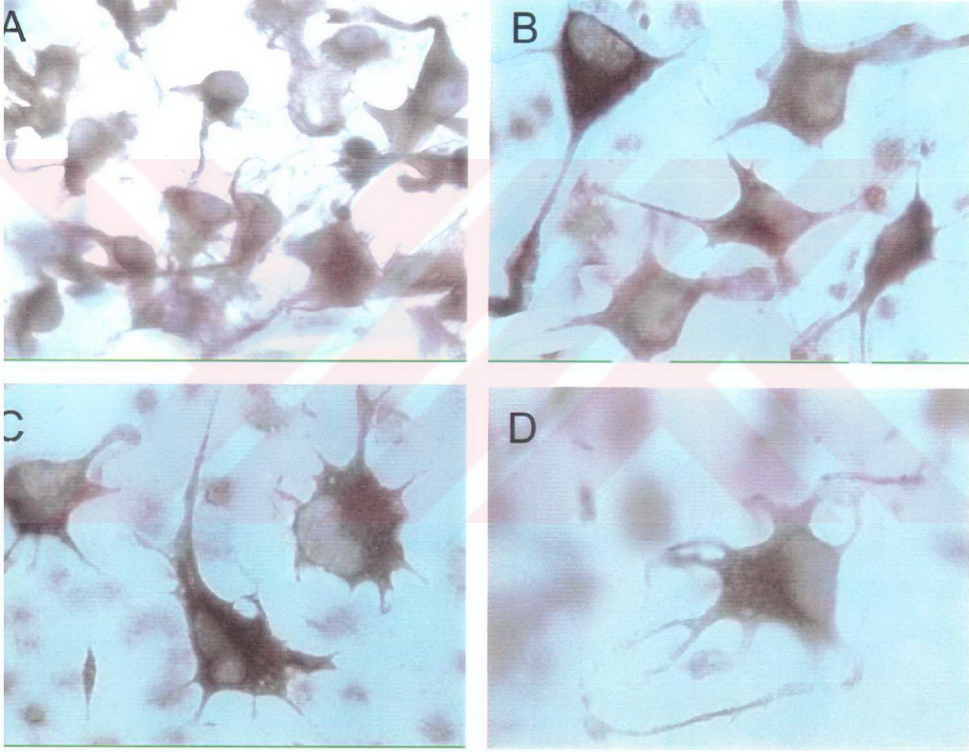
Sıçan beyin dokusundan elde edilen hücre suspansiyonu ml. de 2×10^5 bulunacak şekilde üretim besiyeri ile sulandırılmış ve 35 mm² lik petri kaplarına 2 ml konulmuştur. Her ekim sırasında kaplardan birinde glia hücrelerinin saptanması için lamel konulmuştur. İvert mikroskopla hücrelerin gelişimi her gün gözlenmiş, 2-3 gün arayla besiyeri değiştirilerek glia hücrelerinin tek tabaka oluşturacak şekilde büyümeleri izlenmiştir (Şekil 4). Hücrelerin glia olduğu, lamel üzerinde gelişen hücrelerin bu hücreler için spesifik Glial Fibriler Asidik Protein ile immunohistokimyasal yöntem kullanarak boyanması sonucu tesbit edilmiştir. Şekil 5 ve Şekil 6 da GFAP ile boyanmış farklı tipteki glia hücreleri görünmektedir (20X, 40X ve 100X büyütmeyle görüntüleme yapılmıştır).



Şekil 4: İvert Mikroskopta Glia Hücreleri



Şekil 5: GFAP + Glia Hücreleri



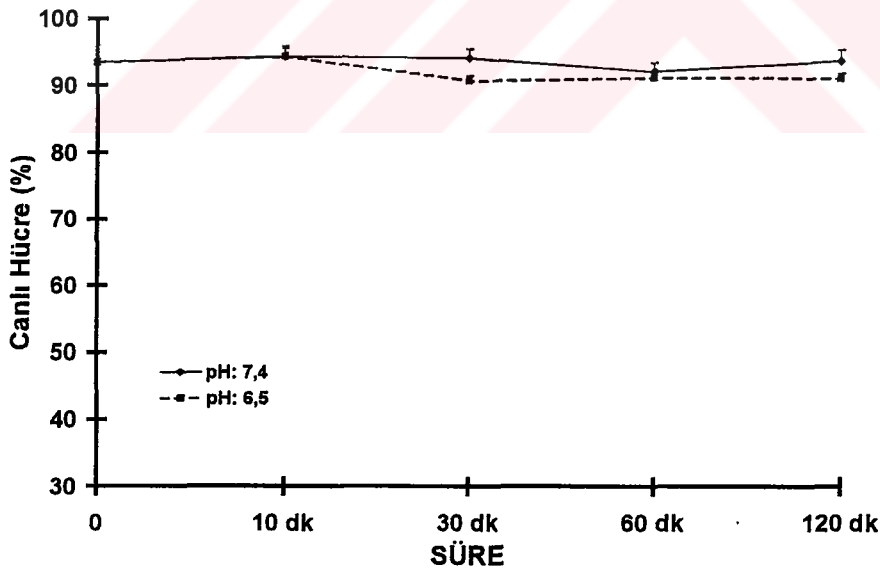
Şekil 6: GFAP + Glia Hücreleri

II. Tripın Blue reddi deneyi ile toksisitenin gösterilmesi:

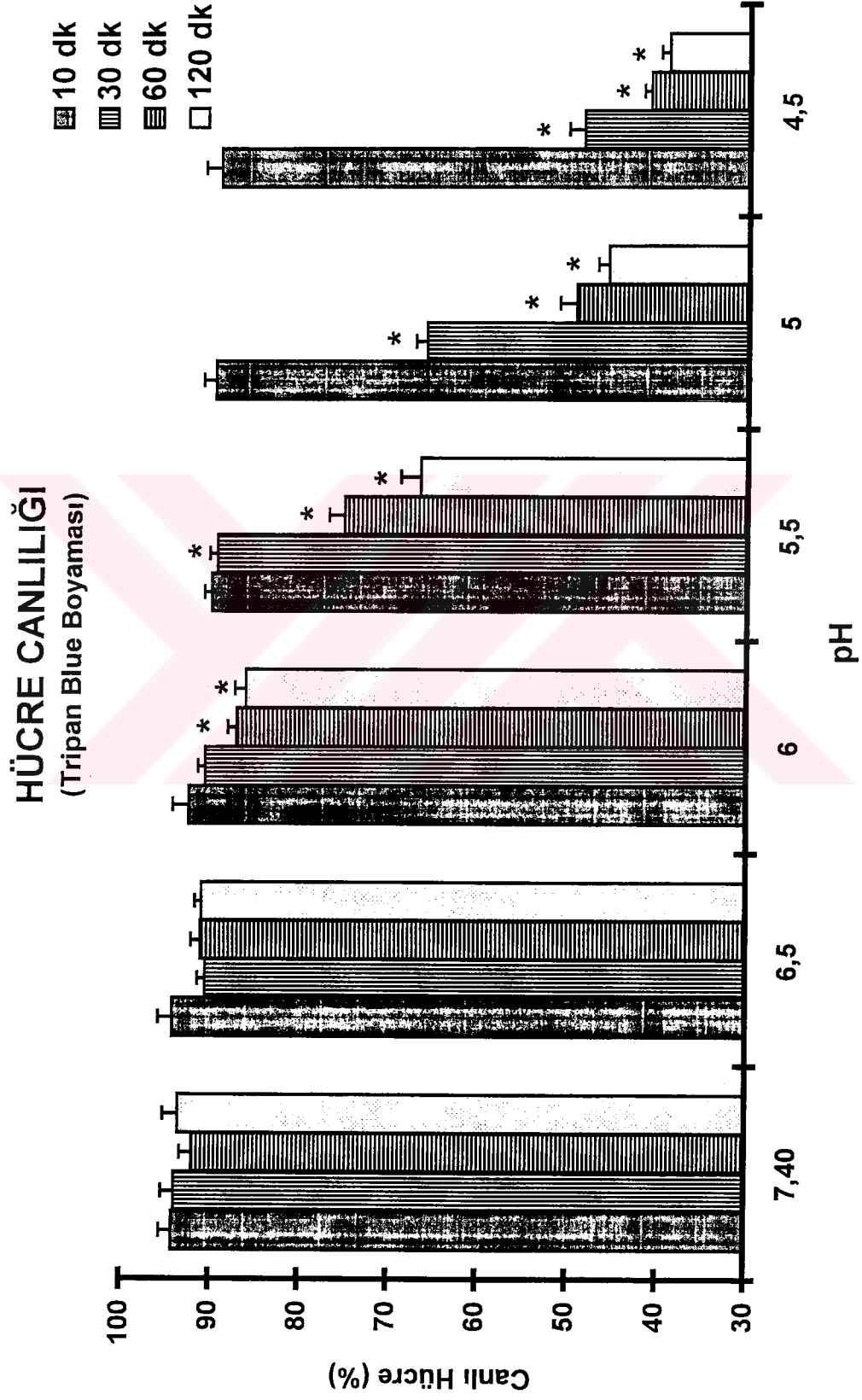
Büyümesini tamamlayan glia kültür hücreleri 17. günde farklı pH ortamlarına (pH: 7.4 ± 0.1 , pH: 6.5 ± 0.1 , pH: 6 ± 0.1 , pH: 5.5 ± 0.1 , pH: 5 ± 0.1 , pH: 4.5 ± 0.1), farklı sürelerle (10 dk., 30 dk., 60 dk., 120 dk.) maruz bırakılmışlardır (n=5). Asiditeye maruz kalan ortamdaki canlı hücre yüzdesi, tripan blue boyaması ile saptanmıştır.

Kontrol kültürlerinde Hücre Canlılığı % 93.5 ± 1 dir. Tüm gruplar ele alındığında pH değişikliği ($F_{135,5}=527,53$; $p<0.001$) ve bu ortamlara maruz kalınan süre ($F_{135,3}=270,13$; $p<0.001$) hücre canlılığında önemli ölçüde azalma yaratmaktadır (Şekil 7). pH değişikliği ile uygulama süresi arasında etkileşim vardır ($F_{135,15}=53.40$; $p<0.001$).

pH: 6.5 ± 0.1 değerli ortama maruz bırakılma hücre canlılığında 120 dakikaya kadar önemli bir azalma yaratmamıştır (Şekil 8).

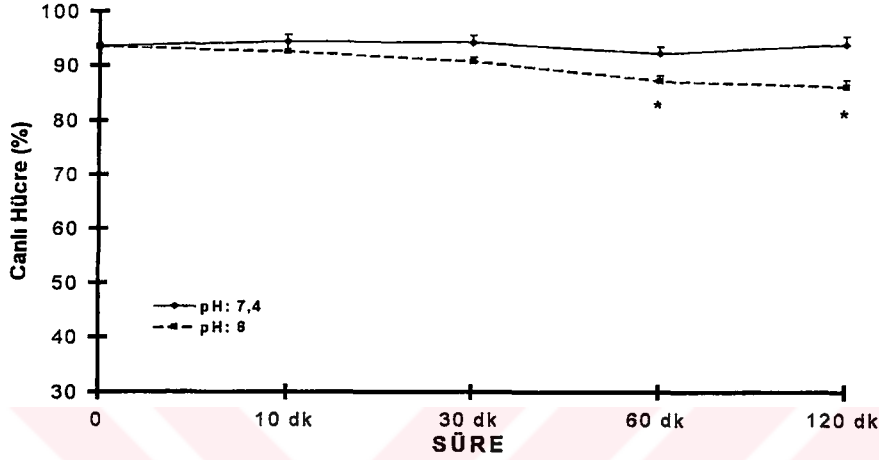


Şekil 8: pH: 6.5 ± 0.1 değerli ortamda hücre canlılığının süreye göre değişimi



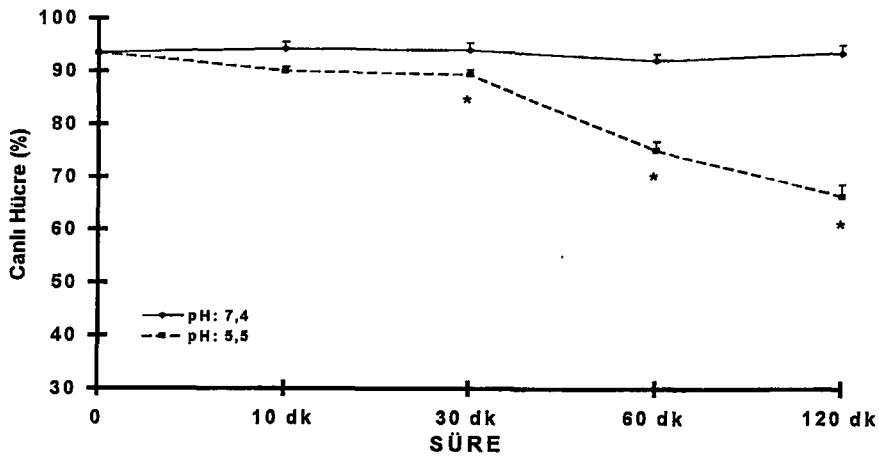
Şekil 7: Asit ortamın Yaratığı Toksikite

pH: 6 ± 0.1 değerli ortama maruz bırakılma hücre canlılığında 30 dakikaya kadar önemli bir azalma yaratmazken, 60 ve 120 dakika süreyle maruz kalma hücre canlılığında önemli bir azalma yaratmaktadır ($p < 0.05$) (Şekil 9).



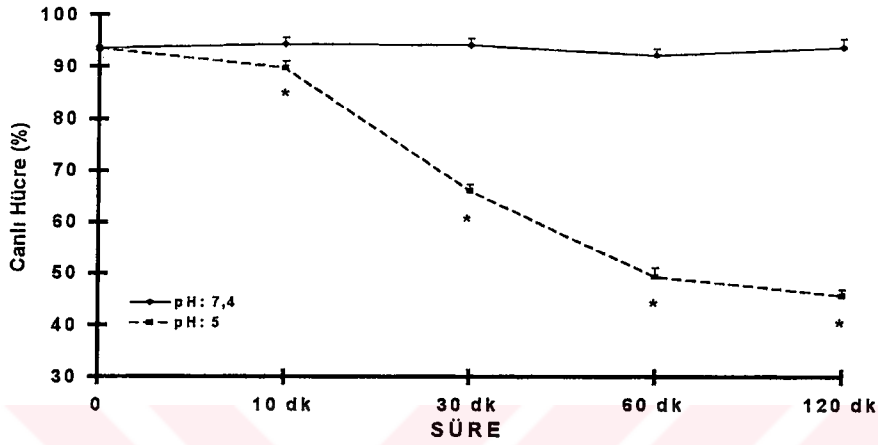
Şekil 9: pH: 6.0 ± 0.1 değerli ortamda hücre canlılığının süreye göre değişimi

pH: 5.5 ± 0.1 değerli ortama maruz bırakılma hücre canlılığında 10 dakikaya kadar önemli bir azalma yaratmazken 30, 60 ve 120 dakika süreyle maruz kalma hücre canlılığında önemli bir azalma yaratmaktadır ($p < 0.05$) (Şekil 10).



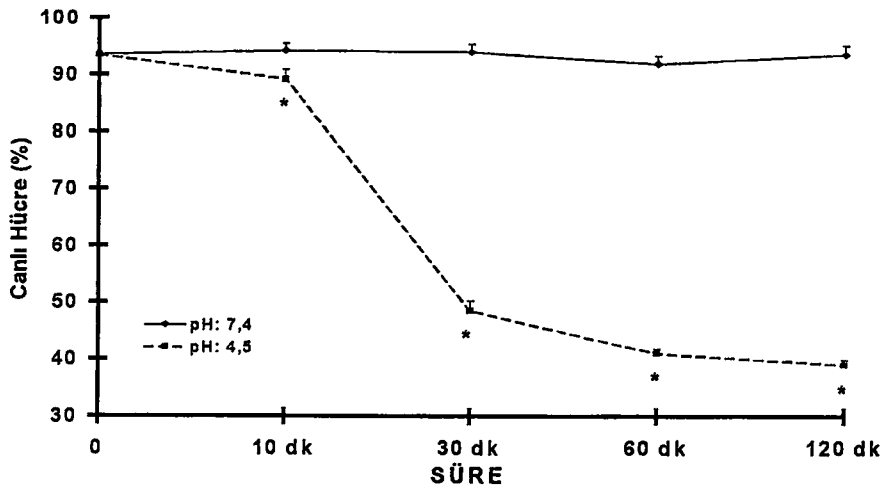
Şekil 10: pH: 5.5 ± 0.1 değerli ortamda hücre canlılığının süreye göre değişimi

pH: 5 ± 0.1 değerli ortama 10 dakika süreyle, 30 dakika süreyle, 60 dakika süreyle ve 120 dakika süreyle maruz kalma hücre canlılığında önemli bir azalma yaratmaktadır ($p < 0.05$) (Şekil 11).



Şekil 11: pH: 5.0 ± 0.1 değerli ortamda hücre canlılığının süreye göre değişimi

pH: 4.5 ± 0.1 değerli 10 dakika süreyle, 30 dakika süreyle, 60 dakika süreyle ve 120 dakika süreyle maruz kalma hücre canlılığında önemli bir azalma yaratmaktadır ($p < 0.05$) (Şekil 12).



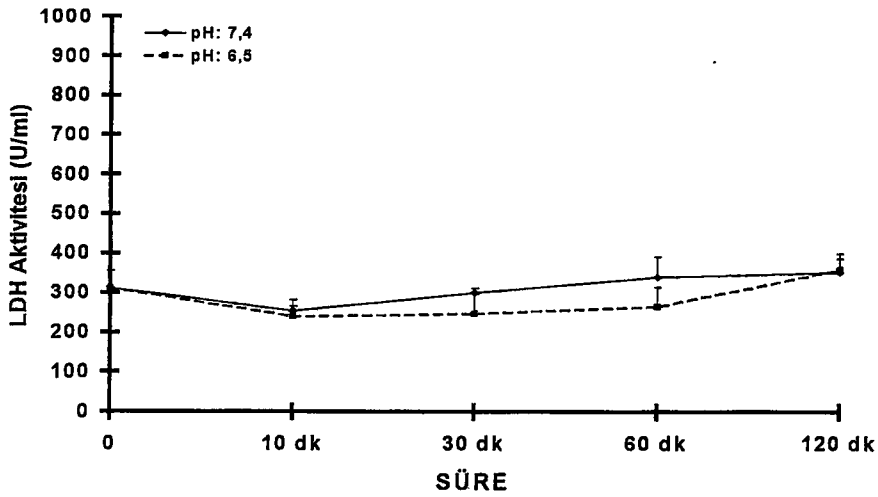
Şekil 12: pH: 4.5 ± 0.1 değerli ortamda hücre canlılığının süreye göre değişimi

III. LDH aktivitesi ile toksisitenin gösterilmesi:

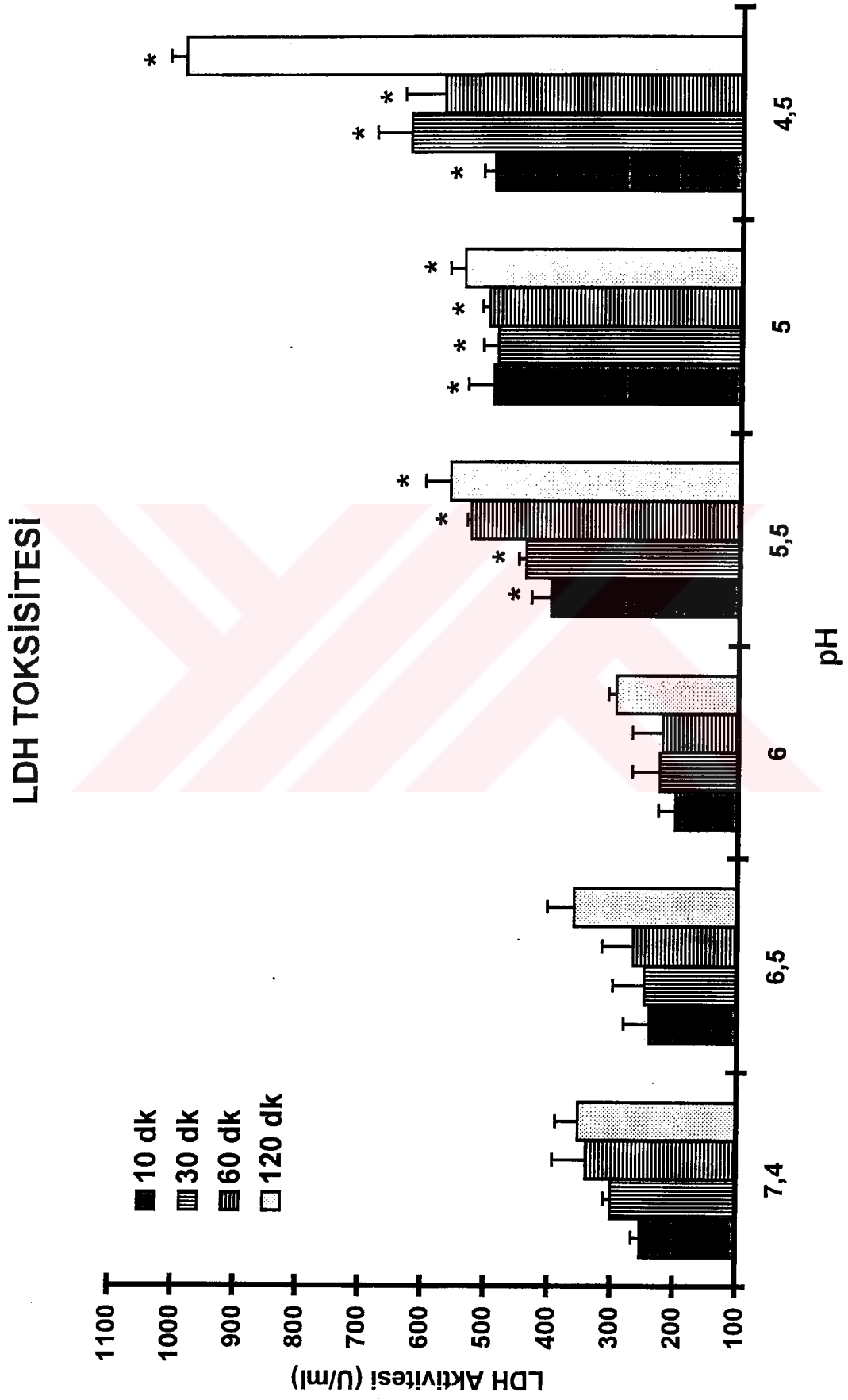
Büyümesini tamamlayan farklı grup glia kültür hücreleri 17. günde farklı pH ortamlarına (pH: 7.4 ± 0.1 , pH: 6.5 ± 0.1 , pH: 6 ± 0.1 , pH: 5.5 ± 0.1 , pH: 5 ± 0.1 , pH: 4.5 ± 0.1), farklı sürelerle (10 dk., 30 dk., 60 dk., 120 dk.) maruz bırakılmışlardır (n=5±2). Asiditeye maruz kalan ortamdaki hücre ölümü LDH aktivitesi ile saptanmıştır.

Kontrol kültürlerinde LDH aktivitesi 311.5 ± 45 U/ml dir. Tüm gruplar ele alındığında pH değişikliği ($F_{82,5}=68,69$; $p<0.0001$) ve bu ortamlara maruz kalınan süre ($F_{82,3}=19,18$; $p<0.0001$) ortamın LDH aktivitesinde önemli ölçüde azalma yaratmaktadır. (Şekil 13). pH değişikliği ile uygulama süresi arasında etkileşim vardır ($F_{82,15}=3.23$; $p<0.001$).

pH: 6.5 ± 0.1 değerli ortama maruz bırakılma 120 dakikaya kadar LDH aktivitesinde önemli bir artış yaratmamıştır (Şekil 14).

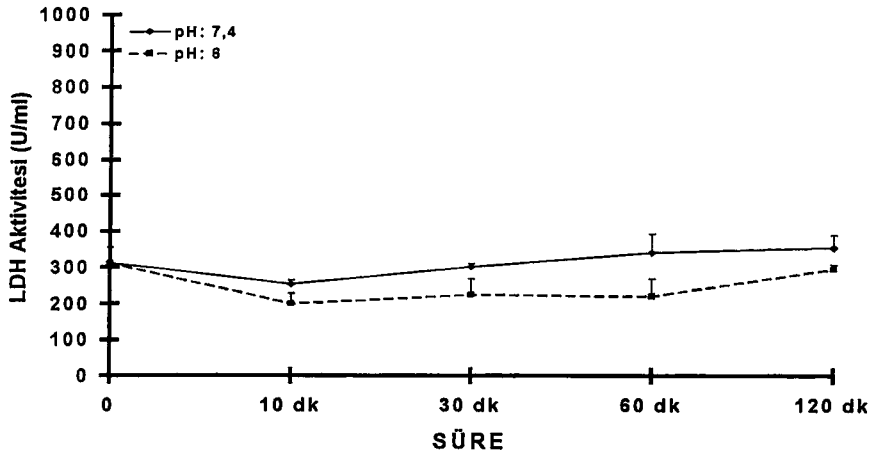


Şekil 14: pH: 6.5 ± 0.1 değerli ortamda LDH aktivitesinin süreye göre değişimi



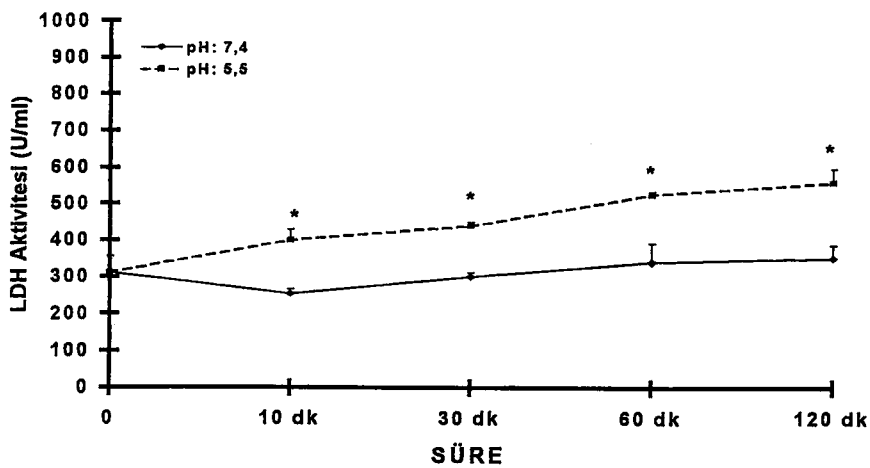
Şekil 13: Asit ortamın Yaratığı Toksikite

pH: 6 ± 0.1 değerli ortama maruz bırakılma 120 dakikaya kadar LDH aktivitesinde önemli bir artış yaratmamıştır (Şekil 15).



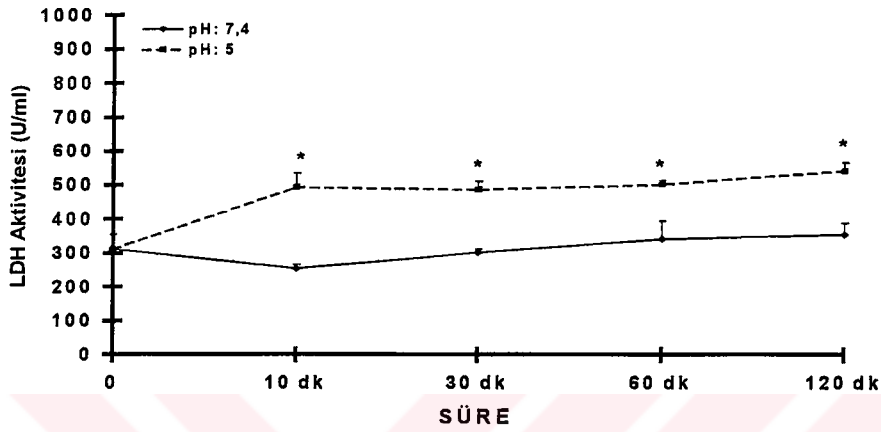
Şekil 15: pH: 6.0 ± 0.1 değerli ortamda LDH aktivitesinin süreye göre değişimi

pH: 5.5 ± 0.1 değerli ortama 10 dakika süreyle, 30 dakika süreyle, 60 dakika süreyle ve 120 dakika süreyle maruz kalma LDH aktivitesinde önemli bir artış yaratmaktadır ($p < 0.05$) (Şekil 16).



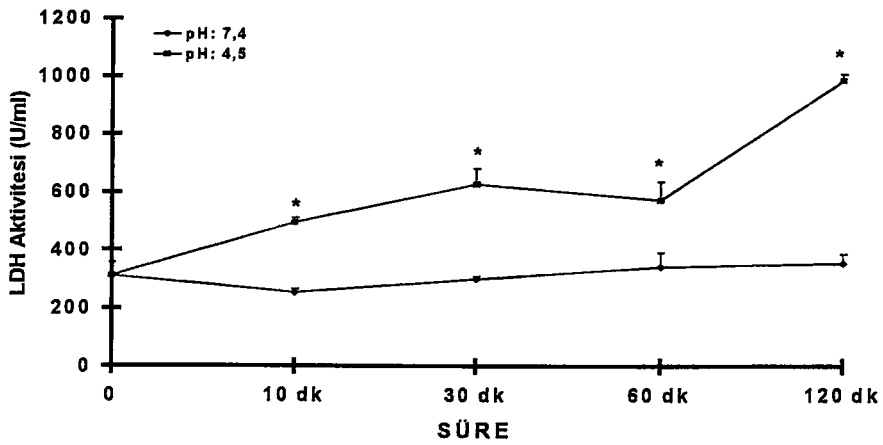
Şekil 16: pH: 5.5 ± 0.1 değerli ortamda LDH aktivitesinin süreye göre değişimi

pH: 5 ± 0.1 değerli ortama 10 dakika süreyle, 30 dakika süreyle, 60 dakika süreyle ve 120 dakika süreyle maruz kalma LDH aktivitesinde önemli bir artış yaratmaktadır ($p < 0.05$) (Şekil 17).



Şekil 17: pH: 5.0 ± 0.1 değerli ortamda LDH aktivitesinin süreye göre değişimi

pH: 4.5 ± 0.1 değerli ortama 10 dakika süreyle, 30 dakika süreyle, 60 dakika süreyle ve 120 dakika süreyle maruz kalma LDH aktivitesinde önemli bir artış yaratmaktadır ($p < 0.05$) (Şekil 18).



Şekil 18: pH: 4.5 ± 0.1 değerli ortamda LDH aktivitesinin süreye göre değişimi

TARTIŞMA

Sinir sisteminin heterojenliği nedeniyle glia hücreleri, in vivo koşullarda nöronlara göre çok daha zor çalışılan bir hücre grubudur. Nöronlar için kullanılabilen elektrofizyolojik tekniklerin, lezyon çalışmalarının gliaya uygulanamaması araştırmacıları in vitro çalışmalara yönlendirmiştir (11). Primer hücre kültürleri in vivo ortamlarla büyük benzerlik gösterir, bu özellikler bir çok çalışmayla gösterilmiştir: glia hücrelerinin negatif membran potansiyeli ve katyon (Na^+ , K^+) transportu özelliğinin in vivo glia hücreleri ile büyük benzerlik gösterdiği (28), enerji metabolizmasının in vivo ortamdakine benzer olduğu (19), kültür glia hücrelerinde bulunan karbonik anhidraz, Na^+ - K^+ ATPaz, HCO_3^- ATP az enzimlerinin uyardığı ATPaz aktivitesinin, gelişimsel ve bölgesel olarak in vivo ile uyumlu olduğu (27), kültür hücrelerinde nükleer proteinlerin gelişiminin in vivo ortamla uyumlu olduğu (52), glutamat ve serotonin geri alınımının in vivo ile bölgesel benzerlik gösterdiği (1, 29) ve travma sonrasında astrosit davranışlarının in vivo ile uyumlu olduğu belirtilmiştir. (10).

Nöron ve glia hücre canlılığının devam etmesinde ortam pH ı en önemli etkenlerden biridir. İskemik beyin hasarı üzerinde yapılan çalışmalar son yıllarda serebral asidozis konusunda odaklanmıştır. İskemi sonrasında kanlanmanın azalmasına bağlı olarak hipoksinin geliştiği, hipoksik ortamda gerekli enerjinin (ATP), glikozun laktata

anaerobik yıkılımı ile elde edildiği; glikoz kullanımının arttığı (39) ve laktat üretiminin artmasıyla laktik asidoz meydana geldiği gösterilmiştir (24). Hipoksik ortamda glikoz varlığında ATP düzeylerinde çok az düşme olduğu, hücrelerin canlılıklarını birkaç saat sürdürebildiği (63) ve glutamat geri alımı gibi ATP bağımlı işlevlerin de birkaç saat korunduğu belirtilmiştir (61).

İskemi sırasında hücre dışı ve hücre içi pH düşmektedir (32, 53), pH ın 6.2- 6.9 arasında olduğu bu değerlerde kültür astroglia hücreleri birkaç saat canlılığını devam ettirebilmektedir (14, 16, 39). Asidifikasyon, ATP nin tükenmesi ile birlikte ilerleyici hücre ölümüne yol açmaktadır (62). Ortam pH ının daha düştüğü değerlerde canlılığın devam edebilmesi daha kısa sürelerde mümkün olmuştur; pH: 6.5 olduğunda glia hücrelerinin yarısının canlılığını 6 saatte kaybettiği, pH: 5.9 da 2 saatte kaybettiği (39), hücre dışı pH da daha fazla düşmenin hücre ölümüne neden olduğu belirtilmiştir (16, 39). Bizim sonuçlarımız da hücre canlılığının pH: 6.5 değerinde 2 saate kadar bozulmadan devam ettiğini, pH: 5.0 altındaki değerlerde kısa sürelerde azalmaya başladığını göstermektedir.

Hipoksinin astroglialarda tek başına minimal hasar yaratırken pH: 6.6-6.2 değerlerinde 7 saatte hücrelerinin yarısının ölümüne yol açtığı, benzer şekilde tek başına ATP düzeylerinde orta dereceli düşme (30 dakikada %70) yaratırken bu pH düzeylerinde büyük düşmelere yol açtığı belirtilmiştir (62). Hipoksiyle birlikte giden asidozda ATP tükenmesine bağlı olarak glutamat geri alımı da düşmektedir (62). Asidoz normoksik koşullarda glikolitik hızı azaltmakta ama ATP oluşumu devam etmektedir, ATP den bağımsız olarak glutamat reseptörünü etkilemektedir ve glutamat geri alımını yavaşlatmakta, glutamat birikimi de nöron ölümüne yol açmaktadır (61).

Astroglia hücre içi pH, hücre dışı pH a paralel olarak düşmektedir (39). Hücre içi pH aktif proton (H^+) boşaltımı ve değişim mekanizmalarıyla nötral değerlere getirilmeye çalışılmaktadır (62). Bu aktif süreç ATP bağımlı olduğundan ATP tükenmesi hücre içi pH da düşmeye neden olmaktadır. Hücre içi pH düşmesi hipoksinin de olduğu durumda daha fazla hücre içi pH düşmesine yol açmaktadır (62). Hücre içinde küçük pH değişiklikleri hücre canlılığında önemli değişikliklere yol açmaktadır (16, 39).

Hücre içi pH ın düşmesi glikolitik hız ve ATP nin düşme hızıyla paraleldir. Enerji kaybı hücre içi asidoza, hücre içi asidoz enerji kaybına yol açarak bir kısır döngü oluşumuna ve astroglia hücrelerinde ölüme yol açmaktadır. (62).

İn vivo ortamda iskemi sonrasında in vitro ortamdan farklı olarak reperfüzyon ile lökosit invazyonu, endotel hasarı ve reperfüzyon hasarı meydana gelmektedir, kültür ortamında nöron ve mikroglia gelişimi de yoktur, buna rağmen hipoksi ve asidoza maruz bırakılan kültür hücrelerindeki değişiklikler in vivo ortamla paraleldir (62).

İskemi sırasında gliada hücre içi pH düşmektedir (32), düşük hücre içi pH hücre ölümüne yol açmaktadır (16). Mekanizma tam olarak bilinmemekle birlikte, hücre içi asidozun, demir iyonunun katalizlediği serbest radikal oluşumunu artırdığı, bunun da lipid peroksidasyonu ile hücrenin membran yapısını bozduğu (47), düşük pH değerleri proteinlerin ve nükleik asitlerin denatürasyonuna yol açabildiği (24), asidozun Na^+/H^+ ve Cl^-/HCO_3^- değişimini uyararak hücrenin şişmesine yol açtığı (28) öne sürülmektedir. Aynı zamanda mitokondrial enerji metabolizmasının inhibisyonu ile iskemi sonrası metabolik iyileşmeyi (18) engellemektedir. Mekanizması bilinmemekle beraber iskemi sırasında astrositlerden eksitatör amino asit salgılandığı gösterilmiştir (42).

Astroglia hücreleri K^+ fazlalığını uzaklaştırarak ve doku pH'ını stabilize ederek nöronları korumaktadır (26, 28). Bu hücreler asidoz sırasında proton çukuru gibi rol oynamaktadır (32). İn vitro pH düştüğünde astroglia hücreleri de asidifiye olarak (35). pH: 6.0 altındaki değerlerde hipoksiye karşı daha hassaslaşmaktadır (13, 39, 63), pH: 5.5 altındaki belirgin hasara uğramaktadır (32). Astroglia hücrelerinin asidoza nöronlardan daha hassas olduğu gösterilmiştir (13, 16).

Asidozun beyinde yarattığı hasar, dozuna bağlıdır, iskemi öncesinde görülen hipergliseminin iskemiyeye duyarlılığı artırdığı, yüksek glikoz düzeyinin hücrelerde daha belirgin hasar yarattığı gösterilmiştir (24).

İnkomplet iskemide hasarın komplet iskemiden daha fazla olduğu (47), bu durum, glikozun ortamda bulunmasının anaerobik glikozla daha fazla laktat oluşumuna, ve laktik asidoza neden olması ile açıklanabilir çünkü laktat yoğunluğunun yükselmesi ile hücre dışı ve hücre içi pH da düşme belirlenmiştir (18). Laktik asit birikimi katalitik demiri açığa çıkararak serbest radikal oluşumuna bu da peroksidatif hasara yol açmaktadır (47). İskemik hasarın oluşumunda asidoz, eksitatör amino asitler, serbest sitozolik Ca ve oksijen radikalleri ile birlikte rol oynamaktadır (64).

İskemi sırasında oluşan hasar üzerinde yapılan çalışmalarda asidozun önemli rolü olduğu bilinmektedir. Asidozda pH: 6.0-5.8 değerlerinde protein sentezinden bağımsız olarak immunoreaktivitenin arttığı (reaktif gliozis) GFAP boyaması ile gösterilmiştir (43). Anaerobik glikoliz sonucu oluşan laktik asit, asidoza yol açmakta, bu da hücre metabolizmasını bozmaktadır (24). Ayrıca hipoksi ve asidoz birlikte ve ayrı ayrı glutamat geri alımını bozarak nöron ölümüne yol açmaktadırlar (60, 61). Nöronlar ile

ilgili bu konuda birçok çalışma yapılmış ve asidoza karşı daha dirençli oldukları gösterilmiştir (14, 16). İn vivo ortamda mikro elektrotlarla yapılan deneylerde kortikal astroglia hücrelerinin hücre içi pH değerlerinin (5.3 ± 0.2) hücre dışı ortamdaki daha düşük olduğu gösterilmiştir (32), hiperglisemide de hücre içi pH (5.9 ± 0.1) daha düşük bulunmuştur (53). Glia hücreleri belki bu özellikleriyle nöronları hücre dışı pH düşüklüğünün yarattığı hasardan korumaktadır.

Glia hücrelerinin de asidoza verdikleri yanıt araştırılmaktadır. Asit ortamın hücre volümünde artışa ve hücre ölümüne yol açtığı gösterilmiştir (16, 22, 39, 54, 55). Yapılan çalışmalarda hücrelerin verdiği yanıtın ortamın pH derecesine ve bu pH değerine maruz kalınan süreye göre değiştiği saptanmıştır (16), pH düşmesine yol açan asidin de önemi büyüktür, laktik asit gibi organik asitler membrandan geçiş hızları daha fazla olduğundan hücre içinde HCL gibi inorganik asitlerden daha fazla asidifikasyona yol açmakta (8) ve daha çok hasar yaratmaktadır (8, 13, 16, 39, 55), kontrol kültürlerinde hücre canlılığı 93 ± 6.6 iken laktik asitle yaratılan asidozda hücrelerin pH: 4.8, HCL ile yaratılan asidozda pH: 3.8 değerine kadar canlılıklarını devam ettirebildiği gösterilmiştir(16).

Bizim çalışma modelimizde HCL kullanılmıştır, pH in 4.5 e kadar düştüğü değerler 2 saate kadar çalışılmıştır. Bir başka çalışmada pH 4.1 in altındaki değerlerde 10 dakika gibi kısa bir sürede hücrelerin canlılığını kaybettiği, HCL ile oluşturulan asidozda pH: 4.4 üzerindeki değerlerde 10 dakikaya kadar geçici değişiklikler olduğu, 24 saat sürenin sonunda morfolojik yapılarının önemli ölçüde değiştiği gösterilmiştir (16). Bizim modelimizde pH: 5.5 altındaki değerlerde 10 dakikada önemli kayıplar başlamıştır.

pH ın 6.5 değerine kadar dūşmesi kısa sürelerde glia hücrelerinin ölümüne yol açmadığı gösterilmiştir (64). Bizim sonuçlarımız da bununla uyumludur. pH: 6.4 değerinde 9 saatte hücrelerin canlılığını %30 oranında kaybettiğı, hipoksi ve glikozun veya ortama laktat (25mM) eklenmesinin hasarı artırdığı gösterilmiştir (13). Hipoksi tek başına veya glikoz tüketimi ile birlikte glial hasara neden olmaktadır (67). Kortikal astroglial hücrelerin kültür ortamında pH: 6.5-6.0 değerlerinde 1-2 saat sürede geri dönüşümlü kromatin kümelenmesi gösterdiği, daha uzun sürelerde geri dönüşümsüz hasara uğradığı vurgulanmıştır (40). Narasimhan canlı hücre oranının pH: 5.2 değerinde 3 saatte % 60 olduğunu belirtmiştir (38).

Hayvan modellerinde iskemi sırasında hücre dışı pH ın 6.5-6.0 değerlerine düştüğü gösterilmiştir, hiperglisemide daha da düşük değerlere ulaşmaktadır (53).

Hücre canlılığı-toksisite deneyleri çeşitli yöntemlerle yapılabilir, en çok kullanılan yöntemler Tripan blue reddi, ve LDH aktivitesi ölçüm deneyleridir (16, 31, 39).

Hücre dışı pH 6.8 değerine kadar düştüğünde hücre içi pH sabit tutulabilmektedir (39), ılımlı asidoz nöronlarda NMDA kanal iletiminin düşmesine neden olarak, nöronları glutamat nörotoksisitesinden korumaktadır (14, 26). Hücre içi pH değerinin düzenlenmesi hücre dışı Na^+ iyonlarına bağlıdır, düşük hücre dışı pH değerlerinde Na^+/H^+ değişimi inhibisyona uğrar bu da sitoplazmik asidifikasyonu takiben hücre şişmesine iskemi sonrası ödeme neden olmaktadır (22).

pH ın hücre dışında 6.8 in altına düştüğü değerlerde hücre volümünde artış başladığı, laktik asitin hücre şişmesine Na^+ , Cl^- akımı ile neden olduğu, asidozun derece ve süresi arttıkça volümün arttığı ve 5.6 altındaki değerlerde buna paralel olarak hücre ölümü

görüldüğü saptanmıştır (54, 55, 56, 57) Hücre şişmesinin Na^+/H^+ antiporteri gibi sistemlerle ilgili olduğu (35) ve Na^+ ve HCO_3^- replasmanı ile inhibe edilebildiği gösterilmiştir(55). Diüretikler asidozda aktive olan $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ değişim mekanizmasını bloke ederek hücre şişmesini önlemektedirler (56). Glia hücrelerinin volüm artışında araşidonik asitin rolü olduğu ve Na^+ iyonunun olmadığı besiyeri ortamında hücre şişmesinin engellendiği gösterilmiştir (57, 58).

Asidoz sırasında hücre içi ATP depolarındaki azalma glia hücre canlılığındaki azalmaya paralel bulunmuştur (39). Farklı gelişim derecelerinde hücre canlılık deneylerinin benzer bulunması, olgunlaşma derecesinin asit ortamdan etkilenmede matürasyonun önemli olmadığını göstermektedir (39) Hasar sonrasında hipotermi uygulaması metabolizmayı yavaşlatarak canlılığı artırmaktadır (39).

SONUÇ

Yeni doğan sıçan beyinlerinden elde edilen örneklerle primer mikst glia hücre kültürü oluşturuldu. Hücreler, serum destekli besiyeri ortamında, CO₂ li inkübatörde çoğalmaları kontrol edilerek 16-18 gün boyunca yaşatıldı. Hücrelerin büyük çoğunluğunun glia hücresi olduğu bu hücelere özgü glial fibriler asidik protein antikoru ile belirlendi.

Kültür glia hücreleri asit ortamın yarattığı toksisiteyi belirlemek amacıyla kullanıldı. Hücreler farklı sürelerle (10, 30, 60 ve 120 dakika), farklı asit ortamlara (pH: 6.5, 6.0, 5.5, 5.0, 4.5) maruz bırakıldı. Hangi pH değerlerinde hangi sürelerle canlılıklarını korudukları / kaybettikleri iki farklı deney grubunda gösterildi.

Tripan Blue reddi deneyleriyle toksisite ölçümü yapılan grupta hücre canlılığı, kontrol kültürlerinde 93 ± 1 idi. pH değişikliğinin ($p < 0.001$) ve bu ortamlara maruz kalma süresinin ($p < 0.001$) hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığını belirlendi. pH düşmesine ve sürenin uzamasına paralel olarak hücre canlılığında azalma gözlemlendi. pH:6.5 değerinde hücre dışı ortama maruz bırakılmanın 2 saate kadar hücre canlılığında değişiklik yaratmadığı, pH: 6 değerinde 1 saat, pH: 5.5 değerinde 30 dakika, pH: 5 ve pH: 4.5 değerlerinde 10 dakika maruz bırakılmanın hücre canlılığında önemli azalmaya ($p < 0.05$) yol açtığını belirlendi.

LDH aktivitesi ölçümü ile toksisite belirlenen grupta kontrol kültürlerinde LDH aktivitesi 311.5 ± 45 bulunmuşken benzer şekilde pH değişikliğinin ($p < 0.001$) ve bu ortamlara maruz kalma süresinin ($p < 0.001$) LDH aktivitesini (dolayısıyla hücre ölümünü) önemli ölçüde artırdığını gözlemlendi. pH:6.5 ve pH: 6 değerinde hücre dışı ortama maruz bırakılmanın 2 saate kadar LDH aktivitesinde değişiklik yaratmadığı, pH: 5.5, pH: 5 ve pH: 4.5 değerinde 10 dakika maruz bırakılmanın ise önemli artışa ($p < 0.05$) yol açtığı belirlendi.

İki deneyde elde edilen sonuçlar birbirine yakındı, asit ortamın yarattığı toksisite ile ilgili bu sonuçların glia hücre özellikleri ile ilgili bilgilere bir katkı olacağı ve toksisiteden korunma ile ilgili çalışmalara yol gösterebileceği düşüncesindeyiz.

ÖZET

Santral sinir sisteminde en geniş yer tutan hücre topluluğu glia hücreleridir. Uzun yıllar sadece nöronlara destek görevi yaptığı düşünülmüştür. Son yıllarda birçok önemli fonksiyonunun olduğu anlaşılmaya başlamıştır. Kültür ortamında yapılan çalışmalarda, glia hücrelerinde görülen özelliklerin in vivo ortamla benzerliği ortaya konmuştur. Bu da araştırmacıları, hücre davranışlarının daha kolay kontrol edilebileceği kültür çalışmalarına yönlendirmiştir.

Serebral iskemi konusunda yapılan çalışmalar, ortaya çıkan doku hasarında asidozun önemli rol oynadığını göstermiştir. Bu çalışmada ortam pHındaki düşmenin glia hücrelerinin canlılığına etkileri, tripan blue reddi deneyleri ve LDH aktivitesi ölçümü ile araştırılmıştır. Kullanılan besiyerindeki pH değerinin düşmesi hücrelerde ölüme yol açmaktadır. Hücre ölümü, pH değerlerinin düşmesiyle ve bu pH değerlerine maruz kalınan süre uzadıkça artar. pH: 6.5 değerli ortamda 2 saat boyunca hücre canlılığında önemli bir değişiklik gözlenmezken, 5.5-5.0 altındaki değerlerde 10 dakika önemli oranda hücre kaybına yol açmaktadır.

SUMMARY

Glial cells are the most abundant cell population in the central nervous system. For many years, they were considered only as supporting elements for neurons. In recent years, it is understood that they also have other important functions.

The studies performed in culture medium have revealed that the glial cell features in cultures and in vivo are very similar. This has led the investigators to carry out their studies in cultured cells where they can easily control the cell behaviour.

The experiments concerning cerebral ischemia have revealed that acidosis has an important role in tissue damage. In this study, we investigated the effects of the decrease in the pH of medium on the viability of the glial cells by using trypan blue exclusion and LDH activity. When the pH of the medium was decreased, the cell death occurred. Cell death increased as the pH decreased and the exposure time increased. Although there wasn't any important change at pH: 6.5 for 2 hours, the cells lost most of their viability at pH values lower than 5.5-5.0, in 10 minutes.

KAYNAKLAR

1. Amundson RH, Goderie SK and Kimelberg HK (1992) Uptake of ³H Serotonin and ³H Glutamate by primary astrocyte cultures. II. Differences in cultures prepared from different brain regions. *Glia*, 6: 9-18
2. Antanitus DS, Choi BH and Lapham LW (1975) Immunofluorescence staining of astrocytes in vitro using antiserum to glial fibrillary acidic protein. *Brain Res*, 89: 363-367
3. Banker G and Goslin K, 1991. *Culturing Nerve Cells*, London, The MIT Press
4. Bottenstein JE and Sato G, 1985. *Cell Culture in the Neurosciences*, New York, Plenum
5. Cameron RS and Rakic P (1991) Glial cell lineage in the cerebral cortex: A review and synthesis. *Glia*, 4: 124-137
6. Charles E, Virgin Jr, Taryn P, Ha T, Packan DR, Tombaugh GC, Yang SH, Horner HC and Sapolsky RM (1991) Glucocorticoids inhibit glucose transport and glutamate uptake in hippocampal astrocytes: Implications for glucocorticoid toxicity. *J Neurochemistry*, (57) 4: 1422-1428

7. Dawson R, Jr, Peterson TA and Eppler B (1995) Endogenous excitatory amino acid release from brain slices and astrocyte cultures evoked by trimethyltin and other neurotoxic agents. *Neurochemical Research*, (20) 7: 847-858
8. de Hemptinne A, Marannes R and Vanheel B (1983) Influence of organic acids on intracellular pH. *Am J Physiol*, 245: C178-183
9. Dusart I, Marty S and Peschanski M (1991) Glial changes following an excitotoxic lesion in the CNS-II: Astrocytes. *Neuroscience*, 3:541-549
10. Faber-Elman A, Solomon A, Abraham JA, Marikovsky M, Schwartz M (1997) Involvement of wound-associated factors in rat brain astrocyte migratory response to axonal injury: In vitro stimulation. *J Clinical Investigation*, 97:162-171
11. Federoff S and Richardson A, 1992. *Protocols for Neural Cell Culture*, New Jersey, Humana Press
12. Freshney RI, 1992. *Animal Cell Culture*, second edition, New York, Oxford University Press
13. Giffard RG, Monyer H and Choi DW (1990) Selective vulnerability of cultured cortical glia to injury by extracellular acidosis. *Brain Research*, 530: 138-141
14. Giffard RG, Monyer H, Christine CW and Choi DW (1990) Acidosis reduces NMDA receptor activation, glutamate neurotoxicity, and oxygen-glucose deprivation neuronal injury in cortical cultures. *Brain Res* 506, 339-342
15. Goldberg MP, Weiss J, Pham PC and Choi DW (1987) N-Methyl-D-Aspartate receptors mediate hypoxic neuronal injury in cortical culture. *J Pharmacology and Exp Ther*, (243) 2:784-791

16. Goldman SA, Pulsinelli WA, Clarke WY, Kraig RP and Plum F (1989) The effects of extracellular acidosis on neurons and glia in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab*, (9) 4: 471-477
17. Guerri C, Saez R, Sacho-Tello M, de Aquilera M and Renau-Piqueras J (1990) Ethanol alters astrocyte development: A study of critical periods using primary cultures. *Neurochemical Research*, (15) 5:559-565
18. Hillered L, Smith ML and Siesjö Bk (1985) Lactic acidosis and recovery of mitochondrial function following forebrain ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 5: 259-266
19. Holtzman D and Olson JE (1980) Respiration in rat cerebral astrocytes from primary culture. *J Neuroscience Research*, 5: 497-506
20. Holtzman D, Olson JE, Devries C and Bensch K (1987) Lead toxicity primary cultured cerebral astrocytes and cerebellar granular neurons. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 89:211-225
21. Horner HC, Packan DR, Sapolsky RM (1990) Glucocorticoids inhibit glucose transport in cultured hippocampal neurons and glia. *Neuroendocrinology*, 52:57-64
22. Jakubovicz DE, Klip A (1989) Lactic acid induced swelling in C6 glial cells via Na^+/H^+ exchange. *Brain Res*, 485: 215-224
23. Jorgensen MB, Finsen BR, Jensen MB, Castellano B, Diemer NH and Zimmer J (1993) Microglial and astroglial reactions to ischemic and kainic acid induced lesions of the adult rat hippocampus. *Exp Neurology*, 120:70-88
24. Kalimo H, Rehnöron S, Söderfelt B, Olsson Y and Siesjö BK (1981) Brain Lactic Acidosis and ischemic cell damage: 2. Histopathology. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1: 313-327

25. Kandel ER, Schwartz JH and Jessel TM (1991) Principles of Neuroscience, Third edition: pp22-24, New York, Elsevier Science Publishing
26. Kaneko T Shigemoto R and Mizuno N (1988) Metabolism of glutamate and ammonia in astrocyte: an immunocytochemical study. *Brain Res*, 457: 160-164
27. Kimelberg HK, Narumi S and Bourke RS (1978) Enzymatic and morphological properties of primary rat brain astrocyte cultures, and enzyme development in vivo. *Brain Research*, 153:55-77
28. Kimelberg HK, Bowman C, Biddlecome and Bourke RS (1979) Cation transport and membran potential properties of primary astroglial cultures from neonatal rat brains. *Brain Res*, 177: 533-550
29. Kimelberg HK, Goderie SK, Conley PA, Higman S, Goldschmidt and Amundson RH (1992) Uptake of ³H Serotonin and ³H Glutamate by primary astrocyte cultures. I. Effects of different sera and time in culture. *Glia*, 6: 1-8
30. Kocur M and Adler J (1993) Advanced techniques in animal cell cultures. Brno, Workshop
31. Koh JY and Choi DW (1987) Quantative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *J Neuroscience Methods*, 20:83-90
32. Kraig RP and Chesler M (1990) Astrocytic acidosis in hyperglycemic and complete ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, (10) 1: 104-114
33. Mayordomo F, Renau-Piqueras J, Megias L, Guerri C, Iborra FJ, Azorin I and Ledig M (1992) Cytochemical and stereological analysis of rat cortical astrocytes during development in primary culture. Effect of prenatal exposure to ethanol. *Int J Dev Biology*, 36: 311-321

34. Mc Carthy, KD and de Vellis, J (1980) Preparation of separate astroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J. Cell Biol.* 85, 890-902
35. Mellergard PE and Siesjö BK (1991) Astrocytes fail to regulate intracellular pH at moderately reduced extracellular pH. *Neuroreport*, 2: 695-698
36. Montoliu C, Sacho-Tello M, Azorin I, Burgal M, Valles S, Renau-Piqueras J and Guerri C (1995) Ethanol increases cytochrome P4502E1 and induces oxidative stress in astrocytes. *J Neurochemistry*, (65) 6:2561-2570
37. Morrison RS and DeVellis J (1984) Preparation of a chemically defined medium for purified astrocytes. In: *Methods for Serum Free Culture of Neuronal and Lymphoid Cells*. Barnes Dw, Sirbasko DA and Sato GH, New York, Liss
38. Narasimhan P, Swanson RA, Sagar SM and Sharp FR (1996) Astrocyte survival and HSP70 heat shock protein induction following heat shock and acidosis. *Glia*, 17: 147-159
39. Nedergaard M, Goldman SA, Desai S and Pulsinelli WA (1991) Acid induced death in neurons and glia. *J. Neuroscience* 11(8): 2489-2497
40. Norenberg MD, Mozes LW, Gregorios JB and Norenberg LB (1987) Effect of lactic acid on astrocytes in primary culture. *J Neuropathol Exp Neurol*, 46: 154-166
41. O'Callaghan JP, Miller DB and Reinhard JF, Jr (1990) Characterization of origins of astrocytes response injury using the dopaminergic neurotoxicant, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Brain Research*, 521: 73-80
42. Ogata T, Nakamura Y, Shibata T and Kataoka K (1992) Release of excitatory amino acids from cultured hippocampal astrocytes induced by a hypoxic-hypoglycemic stimulation. *J Neurochemistry*, (58) 5: 1957-1959

43. Oh TH, Markelonis GJ, Von Visger JR, Baik B and Shiplay MT (1995) Acidic pH rapidly increases immunoreactivity of glial fibrillary acidic protein in cultured astrocytes. *Glia*, 13: 319-322
44. Penfield W, (1932). Neuroglia, normal and pathological . In: Cytology and Cellular Pathology of the Nervous system. W Penfield, New York, P B Hooper
45. Peterson ER and Murray MR (1955) Myelin sheath formation in cultures of avian spinal ganglia. *Am J Anat*, 96: 319-355
46. Renau-Piqueras J, Zaragoza R, De Paz P, BaguenaCervellera R, Megias L and Guerri C (1989) Effects of prolonged ethanol exposure on the glial fibrillary acidic protein-containing intermediate filaments of astrocytes in primary culture: A quantitative immunofluorescence and immunogold electron microscopic study. *J Histochemistry and Cytochemistry*, (37) 2: 229-240
47. Rhencrona S, Hauge HN and Siesjö BK (1989) Enhancement of iron catalyzed free radical formation by acidosis in brain homogenates: differences in effect by lactic acid and CO₂. *J Cereb Blood Flow Metab*, 9: 65-70
48. Rosenberg PA, Aizenman E (1989) Hundred-fold increase in neuronal vulnerability to glutamate toxicity in astrocyte-poor cultures of rat cerebral cortex. *Neurosci Lett*, 103: 162-168.
49. Rosenberg PA (1991) Accumulation of extracellular glutamate and neuronal death in astrocyte-poor cortical cultures exposed to glutamine. *Glia*, 4:91-100.
50. Rosenberg PA, Amin S and Leitner M (1992) Glutamate uptake disguises neurotoxic potency of glutamate agonists in cerebral cortex in dissociated cell culture. *J Neurosci*, 12: 56-61

51. Sarantis M, Attwell D (1990) Glutamate uptake in mammalian retinal glia is voltage- and potassium-dependent. *Brain Research*, 516:322-325
52. Schilling K, Duvernoy C, Keck S and 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) 2: 241-247
53. Smith ML, von Hanwehr R and Siesjö BK (1986) Changes in extra- and intracellular pH in the brain during and following ischemia in hyperglycemic and in moderately hypoglycemic rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, (6) 5:574-583
54. Staub F, Baethmann A, Peters J and Kempfski O (1990) Effects of lactacidosis on volume and viability of glial cells. *Acta Neurochirurgica Suppl*, 51:3-6
55. Staub F, Baethmann A, Peters J, Weigt H and Kempfski O (1990) Effects of lactacidosis on glial cell volume and viability. *J Cereb Blood Flow Metab*, (10) 6:866-876
56. Staub F, Mackert B, Kempfski O, Peters J and Baethmann A (1993) Swelling and death of neuronal cells by lactic acid. *J Neurological Sciences*, 119: 79-84
57. Staub F, Winkler A, Peters J, Kempfski O, Kachel V and Baethmann A (1994) Swelling, acidosis, and irreversible damage of glial cells from exposure to arachidonic acid in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab*, (14) 6:1030-1039
58. Staub F, Winkler A, Haberstock J, Plesnila N, Peters J, Chang RCC, Kempfski O and Baethmann A (1996) Swelling, intracellular acidosis, damage of glial cells. *Acta Neurochirurgica Suppl*, 66:56-62
59. Swanson RA (1992) Astrocyte glutamate uptake during chemical hypoxia in vitro. *Neuroscience Letters*, 147:143-146

ÖZGEÇMİŞ

24. 5. 1965 yılında doğdum. İlkokulu Erzurum, Ortaokul ve Liseyi İzmirde tamamladım.

1982 yılında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne girdim, 1989 yılında mezun oldum. Mecburi hizmetimi 18 ay süreyle Tokat SSK Hastanesinde yaptıktan sonra İzmir Tepecik SSK Hastanesinde Pratisyen Hekim olarak çalıştım. 1992 yılında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalında doktora eğitimime başladım.

Dr. CUMHURİYET
DOKÜMANI KAYIT NO: 11111/11