

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

SEREBELLAR GRANÜL HÜCRELERİ ÜZERİNE
SİSPLATİN VE İFOSFAMİD NÖROTOKSİSİTESİNDE
 Ca^{+2} VE K_{ATP} KANALLARININ ROLÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇİĞDEM ÇENGELLİ

DANIŐMAN: PROF. DR. KEVSER EROL

HAZİRAN 2013

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

SEREBELLAR GRANÜL HÜCRELERİ ÜZERİNE
SİSPLATİN VE İFOSFAMİD NÖROTOKSİSİTESİNDE
 Ca^{+2} VE K_{ATP} KANALLARININ ROLÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇİĞDEM ÇENGELLİ

DANIŐMAN: PROF. DR. KEVSER EROL

KABUL VE ONAY SAYFASI

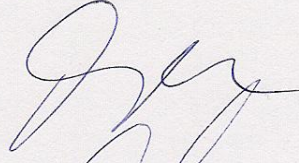
Çiğdem ÇENGELLİ'nin Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı "Serebellar Granül Hücreleri Üzerine Sisplatin Ve İfosfamid Nörotoksisitesinde Ca^{+2} Ve K_{ATP} Kanallarının Rolü" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "**KABUL**" edilmiştir.

Tarih: 21.06.2013

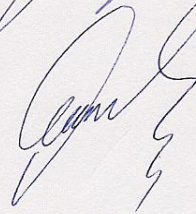
Üye : Prof. Dr. Kevser EROL



Üye : Prof. Dr. Fatma Sultan KILIÇ



Üye : Prof. Dr. Başar SIRMAGÜL



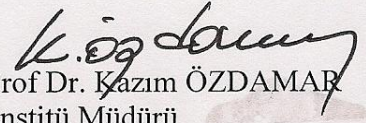
Üye : Doç. Dr. Mahmut ÖZDEMİR



Üye : Doç. Dr. Miriş DİKMEN



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 29.06.2013 tarih ve 961.1.4463. sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Kazım ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

ÖZET

Sisplatin veya ifosfamid gibi antineoplastiklerin neden olduğu nörotoksisite glutamata-bağlı eksitotoksik özelliklere sahiptir. Eksitotoksisitede ise hücre içine kalsiyum girişinin toksisiteyi arttırdığı ancak potasyum çıkışının toksisiteyi azalttığı yönünde çalışmalar bulunmaktadır. Bu nedenle sıçan serebellar granül hücre kültüründe nimodipin (voltaj-bağımlı kalsiyum kanal blokörü), kromakalim (K_{ATP} kanal açıcısı) ve glibenklamid (K_{ATP} kanal blokörü) kullanılarak sisplatin veya ifosfamid (metaboliti kloroasetaldehitin) nörotoksik etkisinde kalsiyum ve potasyum iyonlarının katkısının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

ESOGÜ Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alınarak primer serebellar granül hücre kültürü Sprague Dawley 5 günlük yavru sıçanların serebellumlarından hazırlandı. Sisplatin ve kloroasetaldehit nörotoksisitesi değerlendirilip submaksimal nörotoksisite gösteren konsantrasyonlardaki sisplatin($200\mu M$) ve kloroasetaldehit($10\mu M$) ile nimodipin, kromakalim veya glibenklamidin 1, 10, $50\mu M$ konsantrasyonlarındaki etkileşimleri MTT yöntemiyle değerlendirilmiştir. İstatistiksel analiz için Student's t ve Mann Whitney U testleri uygulanmıştır.

Sisplatin ve kloroasetaldehit konsantrasyon-bağımlı nörotoksisite göstermiştir. Nimodipin $1\mu M$ ($p<0,05$) ve $50\mu M$ ($p<0,01$) konsantrasyonda kloroasetaldehidin toksik etkisini anlamlı bir şekilde artırmıştır. Kromakalim kloroasetaldehidin toksik etkisinde anlamlı değişiklik yapmamıştır ancak $10\mu M$ ($p<0,05$) glibenklamid toksisiteyi artırmıştır. Sisplatinle verilen ilaçlar, $1\mu M$ kromakalim ve $1\mu M$ nimodipin hariç, tüm konsantrasyonlarda sisplatinin nörotoksik etkisini anlamlı bir şekilde artırmıştır.

Nimodipin, L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanallarını kapatarak sisplatin ve kloroasetaldehitin nörotoksisitesini engellememesi ve hatta artırması, bu kanallar vasıtasıyla hücre içine giren kalsiyumun toksik olmadığını düşüncesini desteklemektedir. Eğer bu antineoplastik ajanların neden olduğu nörotoksisitede

kalsiyum iyonlarının katkısı değerlendirilmek isteniyorsa hücre içine diğer kanallar vasıtasıyla giren kalsiyumun da değerlendirilmesi gerekmektedir. Kloroasetaldehit nörotoksisitesinde ATP-duyarlı potasyum kanallarının rolü olduğu ancak sisplatin nörotoksisitesinde bu kanalların karmaşık bir role sahip olduğu düşünölmektedir. Bu sonuçlara ait mekanizmaların aydınlatılabilmesi için daha ayrıntılı çalışmalara gerek bulunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: ifosfamid, kalsiyum, K_{ATP} kanalları, nörotoksisite, serebellar granöl hücreleri, sisplatin

SUMMARY

Neurotoxicity caused by cisplatin or ifosfamide has glutamate-dependent excitotoxic features. According to some studies calcium influx increases, however potassium efflux decreases excitotoxicity. Thus nimodipine(voltage-gated calcium channel blocker), cromakalim(K_{ATP} channel opener), glibenclamide(K_{ATP} channel blocker) were used to investigate cisplatin or chloroacetaldehyde(metabolite of ifosfamide) neurotoxicity in rat primary cerebellar granular cell(CGC) culture.

CGC culture was prepared from the cerebella of Sprague Dawley 5 day-old pups with ethical approval from Local Ethical Committee for Animal Experimentations of ESOGU. Firstly neurotoxic concentrations of cisplatin and chloroacetaldehyde were determined. The submaximal neurotoxicity was seen at concentrations of cisplatin($200\mu\text{M}$) and chloroacetaldehyde($10\mu\text{M}$) and their interactions with nimodipine, cromakalim or glibenclamide ($1, 10, 50\mu\text{M}$) were investigated by using MTT-method. Student's t and Mann Whitney U tests were used for statistical analysis.

Cisplatin and chloroacetaldehyde induced neurotoxicity in a concentration-dependent manner. Nimodipine at $1\mu\text{M}$ ($p < 0,05$), $50\mu\text{M}$ ($p < 0,001$) significantly increased chloroacetaldehyde neurotoxicity. Cromakalim did not significantly change however $10\mu\text{M}$ ($p < 0,05$) glibenclamide increased chloroacetaldehyde neurotoxicity. Nimodipine, cromakalim or glibenclamide (except $1\mu\text{M}$ cromakalim or nimodipine) significantly increased cisplatin neurotoxicity.

By blocking L-type voltage-gated calcium channels, nimodipine did not prevent but also increased both cisplatin and chloroacetaldehyde neurotoxicity. This supports the idea mentioned in previous studies that calcium delivered by these channels is not toxic for the cells. If role of calcium is determined in the neurotoxicity caused by antineoplastic agents, calcium influx through other channels is needed to be investigated. K_{ATP} channels may have role in chloroacetaldehyde neurotoxicity.

However these channels have a complex role in cisplatin neurotoxicity. Further studies are needed to clarify the mechanisms of these results.

Keywords: calcium, cerebellar granule cells, cisplatin, ifosfamide, K_{ATP} channels, neurotoxicity

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	iv
ÖZET	v
SUMMARY	vii
ŞEKİL DİZİNİ	xi
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Serebellar Granül Hücreleri	3
2.1.1. Serebellar Granül Hücrelerinde Hücre İçi Kalsiyum Akımları	5
2.1.2. Serebellar Granül Hücrelerinde Potasyum Akımları	6
2.2. Nöronal Hücre Ölümü	6
2.3. Hücre İçi Kalsiyum Akımları ve Hücre Ölümündeki Önemi	10
2.3.1. Hücre İçi Kalsiyum Depoları	14
2.3.2. L-Tipi Voltaj-Bağımlı Kalsiyum Kanalları	15
2.4. Hücre İçi Sinyal Moleküllerinin Nöronal Ölümdeki Yeri	16
2.4.1. Serbest radikaller	16
2.4.2. Proteazlar	17
2.5. Antineoplastik Ajanlarla İndüklenen Nöronal Hücre Ölümü	18
2.5.1. İfosfamid (N-3-bis(2-kloroetil)-1,3,2-oksazafosfinan-2-amid-2-oksit)	19
2.5.2. Sisplatin (sis -diamindikloroplatin)	20
2.6. Nöronal ATP-Bağımlı Potasyum (K_{ATP}) Kanallarının Moleküler Yapısı	23
2.7. K_{ATP} Kanallarının Nöronal Hücre Ölümündeki Önemi	24
2.8. Hücre Kültürü Besiyeri Ortamının Oluşturulması	26
2.8.1. Hücre Kültürü Besiyerinin Hazırlanması	26
2.9. MTT Sitotoksosite Tayini	28
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	29
3.1. Hücre Kültürü öncesinde yapılan hazırlıklar	29
3.1.1. Kullanılan gereçler	29
3.1.2. Kullanılan cihazlar	29
3.1.3. Kullanılan kimyasal malzemeler	31

3.2.	Çalışmada Kullanılan Hücre Kültürü Besiyerinin Hazırlanması.....	32
3.3.	Poly-D-Lizin İle Kültür Flasklarının Kaplanması	32
3.4.	Primer Hücre Kültürünün Hazırlanması.....	32
3.4.1.	Serebellar Granül Hücrelerinin Elde Edilmesi.....	33
3.4.2.	Deney Protokolü	33
3.4.3.	Hücrelerin Mikroplakalara Ekimi.....	34
3.5.	Thoma Lamı ile Hücre Sayımı.....	35
3.6.	İlaçların Hazırlanması ve Uygulanması	36
3.7.	MTT Sitotoksosite Testinin Uygulanması	36
3.8.	Sonuçların Değerlendirilmesi	36
3.9.	İstatistiksel Testlerin Uygulanması	36
4.	BULGULAR	38
5.	TARTIŞMA	46
6.	SONUÇ ve ÖNERİLER	52
	KAYNAKLAR DİZİNİ	55
	ÖZGEÇMİŞ	69

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Serebellar korteksin yapısı.....	3
Şekil 2. Glutamaterjik nöroiletim ve eksitotoksik hücre ölümü kaskadı	8
Şekil 3. Hücre içine kalsiyum giriş yolları	11
Şekil 4. Endoplazmik retikulum (ER) aracılı nöronal hücre ölümü	15
Şekil 5. K_{ATP} kanalı.....	23
Şekil 6. Glutamat toksisitesine karşı K_{ATP} kanallarının durumu	25
Şekil 7. Hücre kültürü örnek çalışma ortamı	30
Şekil 8. 5 günlük yavru sıçan ve serebellumu	33
Şekil 9. Sisplatin (Cis) ve kloroasetaldehitin (CAA) konsantrasyon – absorbands grafiği	38
Şekil 10. Sisplatinin (Cis) 100, 200 ve 500 μ M ve kloroasetaldehitin (CAA) 1, 10 ve 50 μ M konsantrasyonlarda hücreler üzerine gösterdikleri toksisite	39
Şekil 11. Kloroasetaldehit (CAA) ve sisplatinin (Cis) anlamlı bulunan en düşük toksik konsantrasyonuna ek olarak nimodipin, kromakalim ve glibenklamid 10 μ M konsantrasyonda eklendiğinde toksisitenin değişimi	40
Şekil 12. Nimodipin, kromakalim ve glibenklamidin kloroasetaldehitle beraber 1, 10 ve 50 μ M konsantrasyonda verilmesi ve toksisitenin değişimi	41
Şekil 13. Nimodipin, kromakalim ve glibenklamidin sisplatinle beraber 1, 10 ve 50 μ M konsantrasyonda verilmesi ve toksisitenin değişimi	42
Şekil 14. Nimodipin, kromakalim ve glibenklamidin konsantrasyon – absorbands grafiği	43
Şekil 15. Nimodipin, kromakalim ve glibenklamidin hücreler üzerine tek başlarına 1, 10 ve 50 μ M konsantrasyonda verildiğinde bireysel toksisitelerinin değerlendirilmesi.....	43
Şekil 16. Serebellar granül nöronların flaskta inverted mikroskop altındaki görüntüleri	45
Şekil 17. Sisplatin ve kloroasetaldehit verildikten sonra plakadaki renk değişimi	45

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

μM	mikromolar
μg	mikrogram
μl	mikrolitre
AIF	Apoptoz İndükleyici Faktör
AMPA	A-Amino-3-Hidroksi-5-Metil-4-İsoksazolepropionik asit
Apaf-1	Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1
ATP	Adenozin Trifosfat
Bcl2	B-cell lenfoma 2
Bkz.	Bakınız
Ca^{+2}	Kalsiyum iyonu
CAA	Kloroasetaldehyt
CGC	Serebellar granül hücre (cerebellar granular cell)
Cis	Sisplatin
Cl^-	Klor iyonu
CO_2	Karbondioksit
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medyum
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
ER	Endoplazmik Retikulum
FBS/FCS	Fetal Bovin/Dana Serumu
GABA	Gamma-Amino Butirik Asit
Gl	Glibenklamid
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
HSP70	Isı Şok Protein 70
HBSS	Hank's Dengeli Çözeltisi
IAP	Apoptotik Protein İnhibitörü
ICAD	Kaspazla Aktiflenen DNAaz İnhibitörü
K^+	Potasyum iyonu
K_{ATP} kanalı	ATP-bağımlı potasyum kanalı

Kr	Kromakalim
MAP	Mitojen Aktive Eden Protein
Mg ⁺²	Magnezyum iyonu
mGlu	Metabotropik Glutamat
MIK	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
mitoK _{ATP}	Mitokondriyel K _{ATP}
MPP ⁺	1-metil-4-fenilpiridin
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide
n	Veri sayısı
N	Nimodipin
Na ⁺	Sodyum iyonu
NaClO	Sodyum Hipoklorit
NADP	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NMDA	N-Metil-D-Aspartat
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
O ₂ ⁻	Superoksit
OONO ⁻	Peroksinitrit
PARP	Poly Adenozin Difosfat Riboz Polimeraz
PBS	Fosfatla tamponlanmış serum fizyolojik (Phosphated Buffered Saline)
PKC	Protein Kinaz C
ROS	Reaktif Oksijen Türevleri
SCMC	S-Karboksimetil-L-Sistein
SREP	Sterol Düzenleyici Eleman Bağlayıcı Protein
SSS	Santral Sinir Sistemi
TM	Transmembran
yy.	Yüzyıl

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Serebellar granül hücreleri memeli beyinde en büyük homojen nöronal topluluğu oluşturmaktadır (87). Doğum sonrası gelişimleri nedeniyle ve kültürde çalışılabilmesi uygun bir hücre tipi olduğundan primer in vitro kültür modelinde çeşitli nöroprotektif veya nörotoksik ajanların denenmesiyle sağ kalım veya apoptoz mekanizmaları çalışılabilmektedir.

Serebellar granül hücreleri üzerinde yapılan nörotoksisite çalışmalarında nörotoksisitenin temel olarak aşırı glutamat salınması, Ca^{+2} homeostazında meydana gelen değişiklikler, K^{+} eksikliği, reaktif oksijen radikallerinin oluşması ve kaspaz aktivasyonu gibi çeşitli nedenlerle ortaya çıktığı gösterilmiştir (90, 139). Serebellar granül hücrelerin sağ kalımlarında oldukça önemli rollere sahip bu moleküllerin konsantrasyonlarındaki ani değişiklikler hücrelerin ölümlerine sebep olabilmektedir.

K_{ATP} kanalları birçok önemli hücre fonksiyonunda yer alan ve hücrenin hem metabolik durumuna hem de elektriksel aktivitesine göre açılıp kapanarak membran eksitabilitesinde önemli rol oynayan iyon kanallarıdır. Çeşitli hücre tiplerinde yapılan çok sayıda çalışmada nöroprotektif mekanizmalar arasında bulunabilecekleri üzerinde durulmuştur. Literatürde K_{ATP} kanallarının blokajının orta beyinde bulunan dopamin nöronlarını dejenerasyondan koruduğu çalışmalar olduğu gibi K_{ATP} kanal aktivasyonunun da MPP^{+} ile indüklenen sitotoksisiteye karşı mezensefalik nöronları koruduğuna ilişkin çalışmalar da yer almaktadır (131, 144). Serebellar granül hücrelerinde yapılan bir çalışmada ise K_{ATP} kanallarının aktivasyonu bu hücreleri oksidatif hasara karşı koruyabilmiştir (144).

Kalsiyum ise hücre hasar mekanizmalarının oldukça önemli bir parçasıdır. Nöronal hücrelerin normal fonksiyonlarını yerine getirmeleri ve sağ kalımları açısından da gerekli olan kalsiyum iyonları iskemi gibi patolojik durumlarda kritik seviyelere ulaşarak hücre hasarlarına ve hatta ölümlerine sebep olabilir (105, 121). Bu bakımdan kalsiyum antagonistleri de anti-eksitotoksik stratejiler içerisinde yer almaktadır (90).

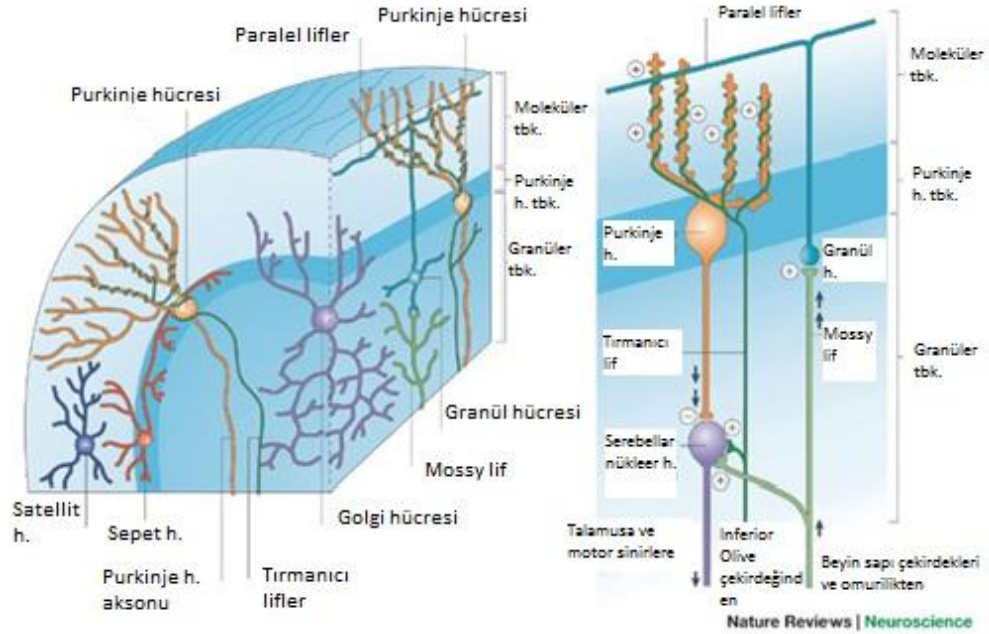
Kemoterapi tedavisinde kullanılan antineoplastik ajanların doz kısıtlayıcı önemli etkilerinden biri de nörotoksitedir. Klinikte yaygın olarak kullanılan sitotoksik kemoterapi ilaçları nöronal hücre kültürlerine uygulanarak bu tipteki hücreler üzerinde olası nörotoksik etkileri değerlendirilebilir (141).

Çalışmamızın amacı önemli antineoplastik ajanlardan olan sisplatin ve ifosfamidin aktif metaboliti olan kloroasetaldehitin neden olduğu nörotoksitede kalsiyum ve potasyum iyonlarının katkısının değerlendirilmesidir. Bu sebeple serebellar granül hücreler önemli kemoterapi ilaçlarından olan sisplatin ve ifosfamidin aktif metaboliti olan kloroasetaldehite maruz bırakıldı. İlk önce bu hücreler üzerinde ilaçların doz-bağımlı nörotoksik etkileri belirlendi. Sonrasında bu ajanların neden olduğu nörotoksitede L-tipi kalsiyum kanalı ve K_{ATP} kanallarının rolü araştırıldı. Sisplatin ve ifosfamidin nörotoksitesinde kalsiyum iyonlarının rolü incelenmek üzere in vitro ortamda nöron hücreleri nimodipin (voltaja duyarlı kalsiyum kanal blokörü) ile beraber verilerek bu hücreler üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının etkisi belirlendikten sonra çalışmada kullanılan antineoplastik ajanlar K_{ATP} kanal açısı kromakalim ve K_{ATP} kanal blokörü glibenklamid ile beraber nöron kültürüne uygulanarak nörotoksik etkiyi düzeltmede K_{ATP} kanallarının rolü araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Serebellar Granül Hücreleri

Serebellum birçok motor fonksiyondan sorumlu beyin sapının arkasında serebral yarıkürelerin arka-alt kısmında yerleşmiş çok önemli bir beyin kısmıdır. Anatomik yapısı beyne benzer; dış kabuk (korteks), iç beyaz madde ve derin çekirdekler. Serebellar korteks de 3 tabakadan oluşan basit bir yapılanma gösterir: Moleküler tabaka, Purkinje hücre tabakası ve Granül hücre tabakası.



Şekil 1. Serebellar korteksin yapısı

(Apps, R. ve arkadaşlarının makalesinden alınıp, uyarlanmıştır, (7))

Serebellumda yer alan granül hücreler ise granüler tabakada bulunan ve memeli beyni araştırıldığında en büyük homojen nöronal popülasyonu oluşturan hücre tipidir. Yosunsu (mossy) liflerle çevrili 4 kısa dendrit ve paralel liflerde sonlanan ince bir aksona sahip olmalarıyla anatomik yapıları oldukça basittir. Serebellumun yapısında bulunan nöronların %90'dan fazlası granül nöronlardır (34). 19.yy sonlarında Camillo Golgi ve Ramon y Cajal tarafından keşfedilmelerinden sonra yoğun olarak araştırılmışlardır. Somaları dairesel (çap: ~5 µm) ve dendritleri yaklaşık 13 µm

uzunluktadır. Serebellumda tek eksitatör nöronlar olmaları ve santral sinir sisteminin geri kalanından aldıkları bilgiyi serebellar kortekse aktarmaları nedeniyle oldukça önemli stratejik bir konumda bulunmaktadır. Bu önemli konumları nedeniyle nöronal gelişim, sağ kalım ve toksisite çalışmaları açısından ilgi uyandırmaktadırlar (34).

Sıçanlar ve insanlar da dahil olmak üzere granül nöronların nörogenezleri çoğunlukla doğum sonrasında gerçekleşir. Granül nöronlarının gelişimi eksternal granüler düzeyde proliferasyona uğramaları daha sonra içe doğru göç ederek son konumları olan en iç tabakaya (internal granüler tabakaya) yerleşmeleriyle gerçekleşir. Doğum sonrasında gerçekleşen nörogenezleri, neonatal sıçanların serebellumlarının alınmasıyla in vitro kültürlerde yetiştirilebilmeleri bakımından oldukça avantajlıdır. Bu avantajları nedeniyle serebellar granül hücre kültürleri sağkalım, apoptoz, nörodejenerasyon ve nöroproteksiyon mekanizmalarının araştırılması amacıyla kullanılması uygun bir modeldir. Serebellar granül hücrelerin primer kültürlerde kullanılmasında en büyük hedef nörodejenerasyona karşı uygulanabilecek olası farmakolojik nöroproteksiyon mekanizmalarının araştırılmasıdır. Bu nedenle bu hücreler sinir bilim çalışmalarında nöronal gelişim, fonksiyon ve patolojilerinin incelenmesi açısından özel bir yere sahiptir. Kültürde bulunan hücrelerin %90'ından fazlasının serebellar granül nöronları olduğu ileri sürülmektedir (30).

Serebellar kortikal sistemde uyarıcı nitelikte yani glutamaterjik nöronlar oldukları bilinmektedir. Kalsiyum, granül hücrelerin membran uyarılabilirliği, sinaptik plastisite, apoptoz ve gen transkripsiyonu gibi birçok fonksiyonu yerine getirebilmeleri açısından oldukça önemli bir faktördür. Ve bu hücrelerin kalsiyum dinamikleri açısından oldukça heterojen bir yapıya sahip oldukları yapılan çalışmalarla görülmüştür (87).

Serebellar granül hücreleri üzerinde glutamat ve GABA tarafından aktive edilen birçok reseptör bulunmaktadır. İyonotropik reseptörler olan AMPA reseptörleri, NMDA reseptörleri ve GABA-A reseptörleri ile hücre içi birçok transdüksiyon mekanizmasında yer alan metabotropik reseptörler yapılan çalışmalarda tanımlanmışlardır (23, 35, 48, 96).

Serebellar granül hücrelerin hücre sel sinyal sistemlerinin düzenlenmesinde hücre içi Ca^{+2} ve NO düzeyleri çok önemlidir. Hücre içine Ca^{+2} girişi hem NMDA kanalları hem de voltaj-bağımlı kalsiyum kanalları aracılığıyla gerçekleşir. Hücre içinde bulunan kalsiyumun kinazları, fosfatazları ve gen ekspresyonunu da kontrol ettiği gösterilmiştir (31, 95).

2.1.1. Serebellar Granül Hücrelerinde Hücre İçi Kalsiyum Akımları

Kalsiyum akımları membran eksitabilitesi, sinaptik plastisite, apoptoz ve gen ekspresyonu gibi birçok hücre sel fonksiyonu yerine getirmesi açısından oldukça büyük önem taşır (9, 16, 53, 99, 117). Serebellar granül hücreleri sıçan ve insan beynindeki nöronların çoğunluğunu oluşturmasına rağmen diğer nöronlara bakıldığında kalsiyum dinamikleri açısından hakkında bilinenler oldukça kısıtlıdır (11, 63).

Serebellar granül hücrelerinde hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun artmasını sağlayan 3 önemli yol vardır.

- i) NMDA reseptörleri
- ii) Voltaj bağımlı kalsiyum kanalları
- iii) İnternal depolardan kalsiyum salıverilmesi

Kültür edilen serebellar granül hücrelerinde farmakolojik olarak 4 tip voltaj-bağımlı kalsiyum kanalı tanımlanmıştır: P/Q tipi, N tipi, R tipi ve L tipi (109). Serebellar granül hücrelerinin önemli ölçüde serbest sitozolik kalsiyum konsantrasyonlarının düşük bazal seviyelerde olduğu bulunmuştur (15). Bu nedenle gelişimlerinin erken evrelerinde homeostazisin sağlanması açısından hücre içine kalsiyum girişi oldukça büyük önem taşımaktadır.

Yapılan elektrofizyolojik bir çalışmada 1 haftalık kültürlerde kalsiyum kanal fasilitasyonunun çoğunun (%60-70) L-tipi kalsiyum kanalları tarafından gerçekleştiği ve bütün hücre akımlarına katkısının kültürde geçen zamanla azaldığı gösterilmiştir. Bu kalsiyum kanalının fasilitasyonu ise eksitabilitedeki değişikliklere göre değişen Ca^{+2} 'un

hücre içine girmesinin araştırılmasında oldukça büyük önem kazanır. Dihidropiridin yapılı antagonistlerin bu L-tipi kalsiyum kanallarını inhibe ettiği bilinmektedir (104).

2.1.2. Serebellar Granül Hücrelerinde Potasyum Akımları

Potasyum iyonları nöronal eksitabilitenin düzenlenmesinde önemli rol oynar. Bu nöron tipinde başlıca 3 tip potasyum süper ailesi bulunmaktadır

- i. 6 transmembran domaini bulunan voltaj-bağımlı K^+ super ailesi (K_V 1.x – 9.x)
- ii. 2 transmembran domaini bulunan içe-doğrultucu K^+ super ailesi (K_{IR} 1.x – 7.x)
- iii. 4 transmembran 2 kanallı domaini bulunan K^+ kanal super ailesi (örn.TWIK-1, TASK-1 ve TREK-1)

İçe doğrultucu potasyum kanal akımlarının temelini G protein ve sulfonilüre reseptörleri ile kenetli ATP-bağımlı potasyum (K_{ATP}) kanalları ile aktive olan akımlar oluşturur (89). K_{ATP} kanalları birçok uyarılabilir dokuda hücrel elektriksel aktivite ile sitozolik metabolik durumu birleştirirler (12, 85). Bu kanallar, membran eksitabilitesini, nörotransmitter salıverilmesini düzenleyebilecekleri ve nöroproteksiyon sağlayabilecekleri santral sinir sistemi nöronlarında geniş olarak tanımlanmışlardır. Serebellar granül hücrelerinde düşük de olsa K_{ATP} kanallarının alt tiplerinden KIR 6.2 ve SUR1 düzeyleri saptanmıştır (72). Bu hücrelerde bulunan bu denli çok sayıda potasyum kanallarının hangi fizyolojik rollerde yer aldığı halen tam olarak anlaşılamamıştır.

2.2. Nöronal Hücre Ölümü

Nöronal hücre ölümü sinaptogenez, histogenez ve doku homeostazisinin sağlanması için fizyolojik koşullarda gerçekleştiği gibi hücre içi ve hücre dışı ölüm sinyallerinin hücre tarafından alınmasıyla patolojik koşullarda da tetiklenebilen hücrel

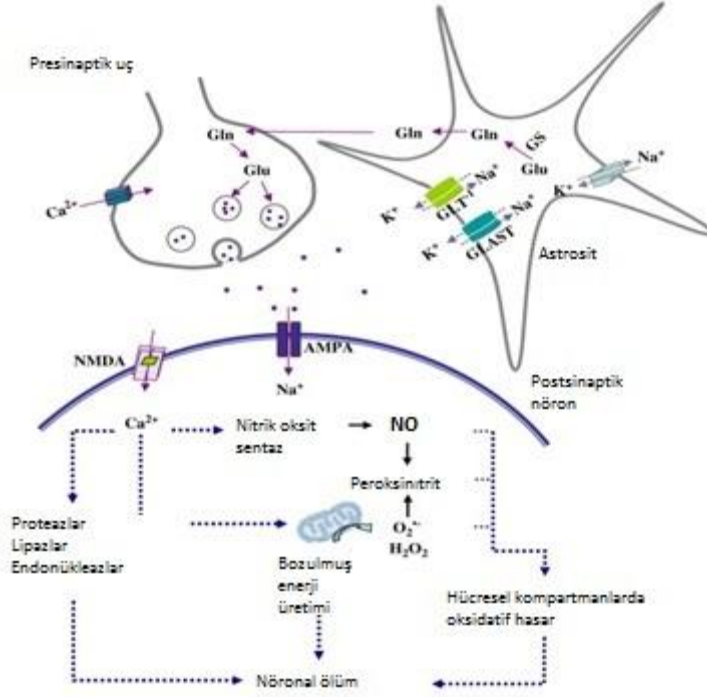
bir olaydır. Hipoksi-iskemi, travma, epilepsi, nörodejenerasyon ve nörotoksisite gibi birçok akut ve kronik beyin hasarında toksik uyarı nöronal ölümü izler.

Eksitotoksisite: Eksitator aminoasit reseptörlerinin aşırı uyarılması sonucu gerçekleşen pasif hücre ölümü şeklindedir.

Memelilerin santral sinir sisteminde yer alan bazı aminoasitler nörotransmitter görevindedir. Elektrofizyolojik çalışmalarda nörotransmitter olarak görev alan aminoasitler 2 gruba ayrılmıştır. Eksitator aminoasitler (l-glutamik asit ve l-Aspartik asit) ve inhibitör aminoasitler (gama aminobütirik asit 'GABA', glisin, taurin, prolin, β -alanindir). Eksitator nörotransmitterler memeli santral sinir sisteminde depolarizasyona, inhibitör nörotransmitterler ise memeli nöronlarında hiperpolarizasyona neden olurlar (82). Glutamik asitin anyonik formu olan glutamat santral sinir sisteminde yer alan önemli bir nörotransmitterdir. Spesifik membran reseptörleri ile etkileşerek öğrenme, bellek, hareket, duyu ve sinaptik bağlantıların plastisitesinin sağlanması gibi çeşitli nörolojik fonksiyonlarda görev almaktadır (29, 84).

Glutamat, glutamaterjik sinir uçlarında glutaminaz aracılığıyla glutaminden sentezlenir ve ATP aracılığıyla presinaptik veziküllere taşınarak burada depolanır. Hücre membranının depolarizasyonu presinaptik sinir uçlarındaki veziküllerden sinaptik aralığa kalsiyum iyonuna bağlı glutamat salıverilmesine neden olur. Sinaptik aralığa salıverilen glutamat, postsinaptik uçta yer alan spesifik reseptörleri etkileyerek etkilerinin ortaya çıkmasını sağlar. Normal şartlarda sinaptik aralığa salıverilen glutamat sodyum iyonuna bağımlı yüksek afiniteli glutamat geri-alım taşıyıcıları ile hızla ortamdaki uzaklaştırılır. Bu taşıyıcılar nöron ve glial hücrelerin membranlarında bulunurlar. Glial hücre içine alınan glutamat, glutamin sentetaz enzimi aracılığıyla glutamine dönüştürüldükten sonra tekrar glutamaterjik sinir uçlarına geri alınır (57). Glutamat, sinaptik sinir uçlarından salıverildikten sonra postsinaptik nöronlardaki 3 farklı reseptörü aktive eder: N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörleri, "NMDA olmayan" a-amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolepropiyonik asit (AMPA) ve kainik asit reseptörleri; ve metabotropik reseptörler (60, 73, 92, 98, 106). Hücre içinde meydana gelen olası aksaklıklar sonucunda eksitator nörotransmitter olan glutamik asit

aşırı ve uzun süre sinaptik aralıkta kaldığında postsinaptik membranda yer alan bu reseptörlerin aşırı uyarılmasına neden olur ve bunun sonucunda nöronal hücre harabiyeti ve eksitotoksisite denilen nöronal ölüm gerçekleşir (41).



Şekil 2. Glutamaterjik nöroiletim ve eksitotoksik hücre ölümü kaskadı

(Estrada Sanchez, A.M ve arkadaşlarının makalesinden alınıp, uyarlanmıştır (47).)

Ekstraselüler glutamik asit düzeyinin yükselmesi nöronda devamlı depolarizasyona neden olur. Depolarizasyon AMPA reseptörlerinin aktivasyonu ve voltaj-bağımlı Na^+ kanallarının aktivasyonu ile başlar. Kronik depolarizasyon ise Mg^{+2} blokajının ortadan kalkması nedeniyle NMDA reseptörlerinin sinaptik glutamik asit tarafından aktivasyonunun uygun hale gelmesiyle devam eder. Bu açıdan Mg^{+2} iyonu doğal bir kalsiyum antagonistidir. Sürekli depolarizasyon sonucu hücre içi sodyum konsantrasyonunun artmasıyla nörondaki ozmotik denge bozulur. Na^+ iyonlarının girişi iyonik dengiyi korumak için Cl^- iyonlarının girişini de aktive eder ve ozmotik gradient nedeniyle hücre içine su girişi de artar. Suyun hücre içine girmesi hücrelerin ozmotik şişmelerine, sitoplazmik içeriğin seyrelmesine ve daha sonrasında da organellerin parçalanmasına yol açar. Bu olaylar nöronal hücre ölümüne ve hücre içeriğinin ekstraselüler boşluğa yayılmasıyla son bulur.

NMDA reseptörlerinin aşırı uyarılmasına bağlı kalsiyum iyonunun hücre içine yüksek oranda girmesiyle mitokondriyel işlev kaybı, bunun sonucunda serbest oksijen ve nitrojen radikallerinin salıverilmesiyle hücrel kompartmanlarda oksidatif hasar meydana gelir. Hücre içindeki yüksek kalsiyum konsantrasyonu fosfolipaz, proteaz ve endonükleaz gibi enzimlerin aktivasyonuna da neden olarak nöronal ölümü tetikleyebilir (bkz. Şekil 2). Glutamat reseptör tipleri 3 iyonotropik ve 3 metabotropik sınıfa ayrılmıştır.

İyonotropik reseptörler ligand kapılı iyon kanallarıdır. Glutamatın bağlanmasıyla açılır ve sodyum ve/veya kalsiyumun hücre içine alınmasına ve potasyumun dışarı atılmasına neden olur.

NMDA reseptörleri: Tetra-heteromerik yapıli kanallardır. Sodyum, potasyum, çinko ve kalsiyum iyonlarına karşı geçirgendir. Normal fizyolojik dinlenme durumundaki membran potansiyelinde magnezyum bu kanalı kapatır. Magnezyum ayrıldığında ise, NMDA reseptörlerinde kalsiyum hücre içine girer ve postsinaptik depolarizasyona neden olarak postsinaptik nöronda aksiyon potansiyeline yol açar. Kalsiyum konsantrasyonundaki yaptığı değişikliklerin yanı sıra NMDA reseptörleri mitonkondrial membran depolarizasyonuna neden olmaları, serbest radikallerde artışa sebep olmaları ve kaspaz aktivasyonunu uyardmaları bakımından hücre ölümünde oldukça önemlidir.

AMPA reseptörleri: Sodyum, potasyum, çinko iyonlarına geçirgenlik gösterir. Kalsiyum iyonlarına karşı geçirgen olmadıkları bilinen bu reseptörler yine de eksitotoksite açısından önem taşır. Sodyumun hücre içine girişine neden olarak hücre membranında hafif depolarizasyona ve bunun sonucunda da NMDA reseptörlerinde aktivasyona sebep olurlar.

Kainat reseptörleri: Heteromerik yapıda reseptörlerdir. Sodyum, potasyum ve bazen de kalsiyum iyonlarına geçirgenlik gösterirler. Bu reseptörler de eksitotoksisite açısından incelendiğinde, glutamatın salıverilmesi, sodyumun hücre içine girişiyle membranda depolarizasyona sebep olmaları, NMDA reseptörlerinden magnezyum

iyonunun ayrılması sonucu NMDA reseptörlerinin aktivasyonuna neden olmalarıyla indirekt yoldan etkilidir.

Metabotropik glutamat reseptörleri (mGlu) de 3 grupta incelenir (Grup I-III). Grup I mGlu reseptörleri kalsiyum, potasyum ve seçici-olmayan katyonik kanalları regüle etmeleriyle birlikte NMDA reseptör aktivasyonunu potansiyalize ederler, böylece eksitator nöro-iletimi, sinaptik plastisiteyi ve uzun süre potansiyalizasyonu etkilerler (28, 78). Grup II ve III mGlu reseptörleri birçok kalsiyum kanalını inhibe edebilir ve nörotransmitterlerin presinaptik saliverilmesine engel olabilir (6). Grup I mGlu reseptörleri nöronal eksitasyonu ve NMDA reseptör aktivasyonunu artırmaları nedeniyle eksitotoksistiteyi şiddetlendirirken grup II ve III mGlu reseptörleri glutamatın saliverilmesini presinaptik inhibe etmeleriyle nöroproteksiyonda önemli olabilecekleri de düşünülmüştür (22, 40).

2.3. Hücre İçi Kalsiyum Akımları ve Hücre Ölümündeki Önemi

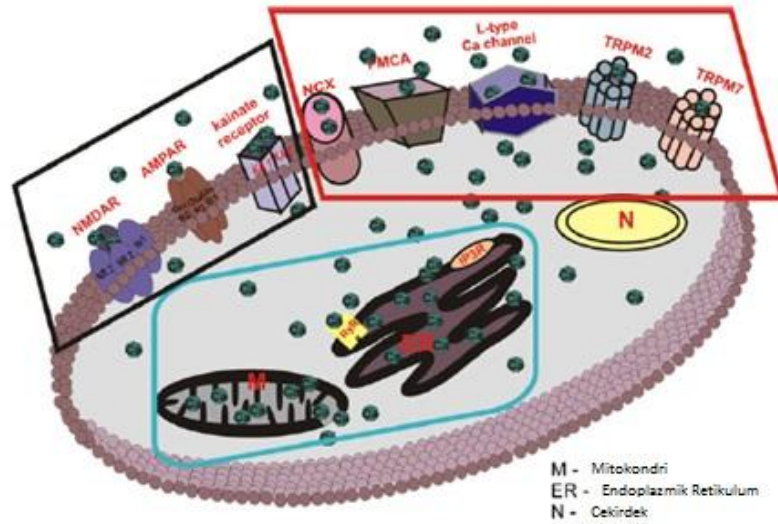
Kalsiyum (Ca^{+2}) hücre içi birçok fonksiyonda yer alır bu bakımdan ikinci ulak olarak düşünülebilir. Bu iki değerlikli katyon hücrel reaksiyonlarda ko-faktör olarak görev alır. Hücre içi Ca^{+2} dengesinin bozulmasıyla nöronal metabolizma ve fonksiyonlarında aksaklıklar görülebilir. Hücre içinde kalsiyum konsantrasyonu önemli ölçüde regüle edilir. Sitolde serbest Ca^{+2} çok düşük düzeydedir. Kalsiyumun fizyolojik ekstrasellüler seviyeleri plazma membranı boyunca serbest kalsiyumun hücreye giriş çıkışına olanak sağlar. Primer olarak intrasellüler Ca^{+2} 'un bağlandığı yerler mitokondri ve endoplazmik retikulum, az miktarda da nöronun plazma membranı ve çekirdeğidir. Bağlanma ATP-bağımlıdır ve hücre içi pH'ından etkilenen bağımsız olaylar ile oluşur. Ayrıca sitozol içinde Ca^{+2} bağlayan spesifik proteinler de bulunur ve bunlar serbest Ca^{+2} konsantrasyonlarının düşük olmasını sağlar.

Hücre içi depolardan (mitokondri ve endoplazmik retikulum) serbestleşmesiyle ve plazma membranından geçişinin (NMDA ve voltaj-bağımlı kalsiyum kanalları ile) artmasıyla sitozolde bulunan serbest Ca^{+2} konsantrasyonu toksik düzeylere ulaşır.

Kalsiyum dengesindeki bu değişiklikler Ca^{+2} ile ilgili biyokimyasal reaksiyonlarda bozukluklara neden olur ve nöronun canlılığının devamı bu durumdan etkilenir.

Glutamat tarafından postsinaptik membranda yer alan glutamat reseptörlerinin özellikle de NMDA reseptörlerinin aşırı uyarılmasıyla beraber L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının da $A\beta$ peptidler tarafından aşırı-eksitasyonu sonucu hücre içine yüksek miktarlarda kalsiyum girişı olur (5, 19, 60). Kalsiyum sitotoksisite mekanizması tam olarak anlaşılmasa da proteazlar, protein kinazlar, nitrik oksit sentaz, kalsinörin ve endonükleazlar gibi birçok enzimin aktivasyonu ve aşırı uyarılmasına neden olarak nörotoksik kaskadları tetiklediği bilinmektedir (8). Bu enzimlerin aktivitelerindeki değişiklikler ise hücreler için toksik olan reaktif oksijen birleşiklerinin üretimine, hücre organizasyonunda değişiklikler meydana gelmesine, hücre ölümü genetik sinyallerinin aktivasyonlarına ve mitokondriyel disfonksiyona neden olur (8).

Kalsiyum iyonları iyon kanalları, iyon taşıyıcıları aracılığıyla, membranın doğrudan hasarlanmasıyla ya da hücre içi depolardan salıverilme gibi çeşitli yollardan hücrelere girebilir (bkz. Şekil 3).



Şekil 3. Hücre içine kalsiyum giriş yolları

(Szydłowska, K. ve arkadaşlarının makalesinden alınıp, uyarlanmıştır (129).)

Hücre içindeki kalsiyumun artması hücre ölümüne giden yolda geri dönüşümsüz bir basamaktır. Bu nedenle nöronların eksitotoksik hasara karşı koymaları hücre içi kalsiyumu ne kadar tamponlayabildiklerine bağlıdır. Hücre içindeki kalsiyumun artmasıyla nörona zarar verecek birçok olay da aktive olmuş olur.

Normal koşullarda hücre dışı Ca^{+2} konsantrasyonu, hücre içi kompartmana oranla 10000 kat daha yüksektir. Bu nedenle Ca^{+2} 'un hücre dışında tutulması için büyük bir elektromekanik güce ihtiyaç vardır (132).

Hücre içi Ca^{+2} homeostazisi beş mekanizma ile sağlanır:

1. Hücre içine Ca^{+2} girişi: Reseptör kapılı iyon kanalları (glutamat reseptörleri gibi) aracılığıyla Ca^{+2} ve Na^{+} hücre içine girerken, K^{+} hücre dışına çıkar. Voltaj kapılı Ca^{+2} kanalları da diğer bir giriş yoludur.

2. Sitozolik Ca^{+2} 'un tamponlanması: Normalde hücre içine giren Ca^{+2} 'un %95-99'u hızlıca kalmodulin, kalbindin ve parvalbumin gibi sitoplazmik proteinler tarafından tamponlanır.

3. Ca^{+2} 'un hücre içinde sekestrasyonu ve depolanması: Hücre içine giren Ca^{+2} miktarı tamponlayıcı proteinlerin kapasitesini aştığında, açıkta kalan Ca^{+2} düz endoplazmik retikulum, mitokondri ve sinaptik veziküllerde depolanır.

4. Ca^{+2} 'un hücre dışına çıkarılması: Nöronlar iki temel mekanizma ile kalsiyumu hücre dışına çıkarırlar: Ca^{+2} -ATPaz ve Na^{+}/K^{+} yer değiştirici mekanizma. Ca^{+2} -ATPaz'ın aktivitesi hücre membranındaki kalmodulin, bir kısım yağ asidi ve protein kinazlar (A ve C) tarafından ayarlanır. Dışarı atılan her bir kalsiyum iyonu için bir ATP harcanır. Ca^{+2} -ATPaz düz endoplazmik retikulum membranında da bulunur ve kalsiyumun sekestrasyonunda rol oynar; kalmoduline bağımlı değildir ve bir ATP'ye karşılık iki adet Ca^{+2} iyonunu sekestre eder. Na^{+}/K^{+} değişimi ise hücre içi Ca^{+2} iyonu artışı ile tetiklenir; hücre dışına bir kalsiyum iyonu atarken, hücre içine 2 veya 3 Na^{+} iyonu sokar. Bu enzim hücre içi Na^{+} iyonu konsantrasyonuna ve dolayısıyla da Na^{+}/K^{+} -ATPaz'a bağımlıdır.

5. Nükleik asit transkripsiyonu için: Hücre çekirdeği içine de bir miktar Ca^{+2} iyonu girişi olur.

Hücre içinde enerji yetmezliği durumlarında hücre içi Ca^{+2} iyon konsantrasyonu artar. Bu artışa sebep olan durumlar (132):

1. Na^+/K^+ ATPaz gibi enerjiye bağımlı iyon pompaları durur. Buna bağlı olarak transmembran iyon gradiyenti bozulur ve nöronal hücre membranında depolarizasyon meydana gelir. Depolarizasyon sırasında voltaja-bağımlı Ca^{+2} kanalları açılır ve hücre içine Ca^{+2} girişi olur.
2. Travmatik nöronal hasarda parçalanmış nöronlardan açığa çıkan K^+ transmembran iyonik gradiyentini bozarak depolarizasyona yol açar.
3. İstirahat halindeki bir hücre membranında magnezyum iyonu NMDA reseptörlerini bloke eder. Hücre membranının depolarizasyonu sonucunda Mg^{+2} yer değiştirir bu da Ca^{+2} 'un NMDA reseptörleri aracılığıyla hücre içine girmesine yol açar.
4. Transmembran Na^+ gradiyent kollapsı Na^+/Ca^{+2} pompasının tersine çalışmasına yol açar. Böylece Na^+ hücre dışına atılırken, Ca^{+2} da hücre içine alınır.
5. ATP - bağımlı Ca^{+2} atılımı durur.
6. Mitokondri içinde aşırı Ca^{+2} birikimi kalıcı mitokondri hasarı sonucu ATP üretiminin durmasına yol açar.
7. Glikoliz sonucu oluşan laktik aside bağlı sitoplazmada laktik asidoz olur.
8. Metabotropik glutamat reseptörlerinin aktivasyonu sonucu intrasellüler kalsiyum depolarından (endoplazmik retikulum ve mitokondri) Ca^{+2} salıverilir.
9. Santral sinir sistemi travmalarında oluşan mekanik etki de hücre membranındaki geçitlerden içeri Ca^{+2} girişini tetikler.

Sitozolik kalsiyum iyon konsantrasyonundaki artış birçok doku tipinde hücre ölümünün ortak yoludur.

Hücre içinde kalsiyum birikimine bağlı meydana gelen olaylar (4):

1. Fosfolipaz A_2 aktivasyonu
2. Serbest yağ asitlerinin serbestlenmesi
3. Toksik eikozanoid sentezi
4. Serbest radikallerin ortaya çıkması
5. Kalsiyum-bağımlı ATP aktivasyonu sonucu enerji depolarının tükenmesi

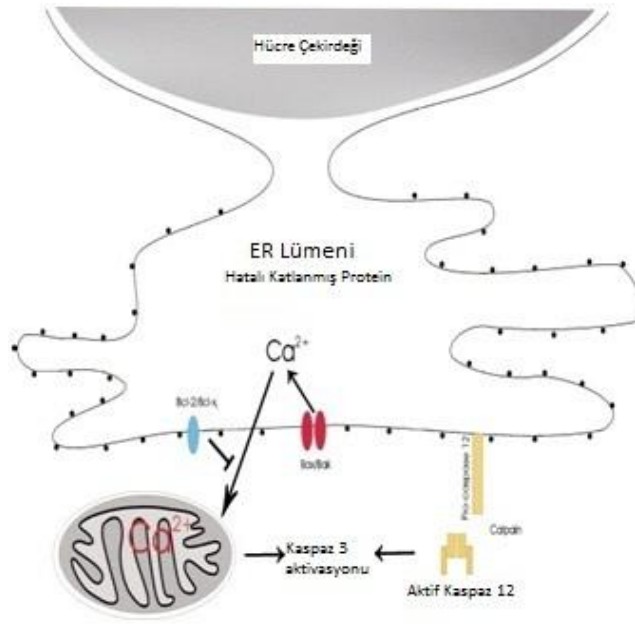
6. Reseptör proteinlerinin kovalent modifikasyonu
7. Hücre iskeletinin mikrotübüler ve nörofilament komponentlerinin modifikasyonu
8. Mitokondriyel oksidatif fosforilasyonun bozulması
9. Aksonal dejenerasyon
10. Proteaz, fosfataz ve endonükleaz gibi litik enzimlerin aktivasyonu

Nöron koruyucu tedavi stratejisi olarak NMDA ve AMPA reseptörlerini hedef alan ajanlarla yapılan klinik araştırmalarda başarılı olunamamıştır (38, 70, 81). Bu nedenle diğer kalsiyum giriş yollarının hedef alınması ya da çeşitli kalsiyum akımlarına yönelik kombine uygulamalar yeni ve etkili tedavilerin geliştirilebilmesi bakımından etkili olabilir.

2.3.1. Hücre İçi Kalsiyum Depoları

Nöronlarda hücre ölümü birçok organelin, sinyal yolları ve protein aktiviteleri arasındaki iletişimleri sayesinde kontrol edilir. Mitokondri enerji üretiminin yanı sıra hücre içi Ca^{+2} homeostazisinin düzenlenmesinde ve reaktif oksijen radikallerinin (ROR) endojen üretimlerinde de görevli bir organeldir. Bu açıdan mitokondriyel hasar hücre içi enerji üretiminin bozulmasıyla eksitotoksik nöronal ölüme oldukça kritik bir öneme sahiptir. Mitokondri içerisine de aşırı derecede Ca^{+2} girişı sonucunda superoksit üretimi, proapoptotik mitokondriyel proteinlerin salıverilmesi, DNA fragmentasyonu ve yoğunlaşması meydana gelmesiyle hücreler apoptoz ve/veya nekroz sonucu ölürlür. Mitokondriyel disfonksiyon ile beraber membran potansiyelinde değişiklikler meydana gelmesi ve reaktif oksijen radikali üretimindeki artış hücre ölümüne katkıda bulunur (101). Mitokondri içine aşırı Ca^{+2} girişıyla membran potansiyeli değişir ve mitokondrilerde membran geçiş porları meydana gelir. Mitokondrilerde bu membran potansiyelinin değişimiyle ATP sentezi azalır ve hücreler ölüm sinyallerine karşı daha da duyarlı hale gelir. Endoplazmik retikulum (ER) da hücre içi homeostazisin sağlanmasında ve sitozolik kalsiyumun düzenlenmesinde önemli bir diğer organeldir (135) (bkz. Şekil 4). Hücre içine aşırı derecede kalsiyum girmesi, NO üretiminin aşırı

artması ER'da Ca^{+2} 'un azalmasına sebep olacak bu durumda da hücresel homeostazisin ve kalsiyum regülasyonunun bozulmasına yol açan ER stres denilen durum ortaya çıkacaktır. ER stres de mitokondri-bağımlı ve mitokondri-bağımsız hücre ölümlerini tetikleyebilir (139).



Şekil 4. Endoplazmik retikulum (ER) aracılı nöronal hücre ölümü
(Northington, F.J. ve arkadaşlarının makalesinden alınıp, uyarlanmıştır (102).)

2.3.2. L-Tipi Voltaj-Bağımlı Kalsiyum Kanalları

L-tipi kalsiyum kanalları iskelet kaslarında, kardiyak kasta, endokrin organlarda ve nöronlarda ana kalsiyum geçirgen kanallardır. Esas yerleşimleri post-sinaptiktir (2). Sinir uçlarından nörotransmitter salıverilmesini sağlayan P/Q, N ve R tipi kanalların aksine L tipi kalsiyum kanalları somatodendrit kompartmanlarda yer alırlar (37, 62, 103). Sirkadiyen ritim, nöronal sağ kalım ve uzun süreli bellek gibi işlemlerin aktivite bağımlı nöronal gen ekspresyonunu kontrol ederler (39). Beyinde bulunan L-tipi kalsiyum kanalları başlıca $Ca_v1.2$ ve $Ca_v1.3\alpha_1$ alt ünitelerinden oluşmakla beraber az da olsa $Ca_v1.1$ ve $Ca_v1.4$ alt tipleri de yer alır (122). $Ca_v1.2$ ve $Ca_v1.3$ izoformları çeşitli nöron tiplerinde tanımlanmıştır. Farklı biyofiziksel ve biyokimyasal özelliklere sahip olup bu sayede birçok nöronal fonksiyonda yer almaktadırlar. Serebellar granül hücrelerinde de yer alan L-tipi kalsiyum kanallarında ise %89 $Ca_v1.2$ alt tipi ve %11

Ca_v1.3 alt tipi bulunduğu gösterilmiştir (75). Beyinde bulunan L-tipi kalsiyum kanalları farklı bir açılma özelliği gösterirler. Depolarizasyon boyunca açılma ihtimalleri düşükken depolarizasyonu takiben gerçekleşen repolarizasyon sonrası kanal uzun süreli açık kalır (50, 65).

Nimodipin

Kalsiyum kanal blokörleri genel olarak klinikte hipertansiyon, anjina pektoris ve aritmi gibi kardiyak problemlerde kullanılır. Nimodipin, 1-4 dihidropiridin türevi L-tipi kalsiyum kanal blokörüdür. Kardiyovasküler etkileri yanında bazı hayvan modellerinde nöroprotektif özellikleri de olduğu gösterilmiştir. Yüksek oranda yağda çözünür ve kan beyin bariyerini kolaylıkla geçer. Hayvan çalışmalarında serebral kan akımının artmasında, sempatik stimülasyona bağlı vazokonstriksiyonu önlemede ve serebral iskemi sonrası nörolojik durumu düzeltmede etkili olduğu gösterilmiştir. Yüzde 90 proteinlere bağlanan nimodipinin yarılanma ömrü ise yaklaşık 13 saattir (55). Beyin/plazma oranı nifedipin ve amlodipine göre 3 ila 5 kat daha yüksektir. Fare beyinleri üzerine yapılan farmakokinetik ve reseptör bağlanma çalışmasında beyin hastalıklarının farmakolojik tedavisinde nimodipin gibi kalsiyum kanal blokörlerinin kullanılmasının faydalı olacağı belirtilmiştir (133). Ayrıca iskemi ve fasiyal sinir hasarı modellerinde, eksitotoksik nöronal ölümden, kültür edilmiş fare nöronlarında amiloid β ile indüklenen nörotoksisitede nöron koruyucu özelliklerinden bahsedilmektedir (13, 61, 91, 140). Aynı şekilde serebellar granül hücrelerinde NMDA ile indüklenen nörotoksisitede nimodipinin (10^{-5} M) nöron koruyucu etki gösterdiği bulunmuştur (46).

2.4. Hücre İçi Sinyal Moleküllerinin Nöronal Ölümdeki Yeri

2.4.1. Serbest radikaller

Reaktif oksijen radikalleri mitokondriyel solunum sonucu oluşabildiği gibi hücresel homeostazın sağlanması için meydana gelen biyosentez ve katabolizma olayları sonucunda da oluşur. Reaktif oksijen ve reaktif nitrojen radikalleri hücrede meydana gelen oksidatif stres ve buna bağlı oluşan oksidatif hasardan sorumludur. Bu radikaller, nöronlarda, astrositlerde ve mikroglia hücrelerinde apoptoz programının

aktivasyonu, iyonların taşınması ve kalsiyumun mobilizasyonu gibi birçok önemli hücre fonksiyonunun düzenlenmesinde oldukça önemlidir (139). Glutamatla indüklenen oksitotoksistide hücre serbest oksijen radikallerinin aşırı artması da hücre ölümünde büyük rol oynar (100, 126). Glutamat NMDA reseptörlerini aktive ederek hücre membranında bulunan birçok katyon-geçirici kanalı da aktive etmiş olur. Kalsiyumun bu kanallar aracılığıyla hücre içine girişiyle beraber kalmoduline (NOS ko-faktörü) bağlanarak nitrik oksit sentaz da aktive olur. Nitrik oksit sentazın aktivasyonu nitrik oksit üretimi meydana gelir, bu da superoksit anyonuyla (O_2^-) etkileşerek nöronal hasara neden olan peroksinitritlerin ($OONO^-$) ortaya çıkmasını sağlar (83, 145). NO hücrelerde tehlikeli ölüm döngüsünü tetikler. Mitokondriyel fonksiyon ve enerji üretiminde bozukluklarla beraber iyon pompalarının ve parsiyel hipopolarizasyonun bozulmasına neden olur. Bu durumda Mg^{+2} 'un NMDA reseptörlerinden ayrılmasıyla nöronlar glutamat stimülasyonuna duyarlı hale gelir. NMDA aracılı kalsiyum salıverilmesi depolarizasyonu artırır böylece kalsiyum girişi daha da tetiklenir ve endojen glutamat depolardan salıverilerek hücre ölüm mekanizması sürekli aktive edilmiş olur (128).

2.4.2. Proteazlar

Kaspazlar apoptozda önemli rol oynayan sistein-proteaz grubu enzimlerdir. Aktif hücre ölümü şekli olan kaspaz-bağımlı hücre ölümünde yer alırlar. Kaspaz bağımlı ölüm yolu Apaf-1 (apoptotik proteaz aktive edici faktör-1) ile bağlanan sitokrom c'nin mitokondriden salıverilmesiyle başlar (36). Aktif kaspazlar en son kaspaz-3 aktivasyonu ile son bulan ekstrinsik ve intrinsik yollar aracılığıyla nöronal apoptozise neden olurlar. Serebellar granül hücrelerinde yapılan bir çalışmada glutamata bağlı apoptozda kaspaz 3 aktivasyonunun etkili olduğu bulunmuştur (42). Kaspaz 6 ve 9'un da glutamata bağlı apoptotik kaskada rol oynadığı gösterilmiştir (125). Kaspaz 3'ün aktive olması için öncü proteinlerin 2 alt üniteye proteolitik olarak parçalanması gerekmektedir. Birçok çalışmada kaspaz 3'ün ya oto-aktivasyonla ya da diğer kaspaz aile üyeleri tarafından aktif hale getirildiği belirtilmiştir (86). Kaspaz 3'ün glutamatla indüklenen hücre ölümündeki işlevi birçok mekanizmaya bağlı olabilir. Kaspaz 3, DNA onarımında rol oynayan PARP (Poly ADP Riboz Polimeraz) gibi birçok spesifik hücre proteini parçalayabilir. Ek olarak DNA-bağımlı protein kinaz, protein kinaz C

(PKC), transkripsiyon faktörleri ve *Sterol düzenleyici* eleman bağlayıcı proteinler (SREPLer) ve aktin de kaspaz 3'ün hücrel hedefleri arasında yer alır (139). Proteaz ailesinin 14 üyesi tanımlanmıştır ve çoğu nöronal ölümden rol oynar. Başlatıcı ve efektör (kaspaz-3, -6, -7) kaspazlar olarak 2 gruba ayrılırlar. Hücrelerin yaşaması için önemli olan birçok yapısal proteini (laminler, aktinler vb.), DNA tamir enzimlerini (PARP) ve topoizomeraz I'i ve kaspaz ile aktiflenen DNAaz inhibitörü (ICAD) gibi düzenleyici proteinleri hedef alırlar (66).

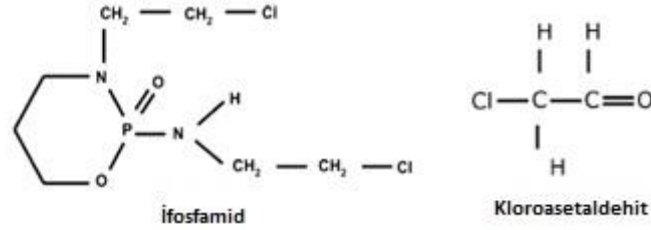
Glutamatla indüklenen hücre ölümü hücrenin enerji durumundan çok etkilenir. Fizyolojik konsantrasyonlardaki glutamat bile enerji yetmezliği durumunda toksik olup hücre ölümüne neden olabilir. Membran potansiyelindeki azalmalara neden olan nöronal enerji durumundaki değişiklikler nöronal ölümden önemli rol oynar. NMDA kanalı Mg^{+2} iyonu tarafından voltaj bağımlı şekilde kapalıdır. Bu iyonun reseptörden ayrılması plazma membranının depolarize olmasıyla mümkündür. ATP'nin kısıtlandığı bozulmuş glikolitik veya mitokondriyel metabolizma durumunda plazma membranı depolarize olur ve Mg^{+2} bu reseptörlerden ayrılarak bu reseptörleri glutamat tarafından uyarılmaya açık hale getirir. Glutamatın plazma membran taşıyıcılarıyla taşınma yönü ters çevrilebilir. Fizyolojik koşullarda konvensiyonel taşınma yönü hücre içine doğru olsa da glutamat, hücre dışı $[Na^{+}]$ /hücre içi $[K^{+}]$ azaldığında ve/veya hücre içi $[Na^{+}]$ /hücre dışı $[K^{+}]$ arttığında taşıyıcı yönü hücre dışıdır (17, 67).

2.5. Antineoplastik Ajanlarla İndüklenen Nöronal Hücre Ölümü

Kemoterapi sırasında santral veya periferik sistemde görülebilecek olası bir toksik komplikasyon ilacın dozunun azaltılmasına veya ilacın tamamen kesilmesine neden olmaktadır. Bazen bu toksik tablonun sonuçları hem de geç farkedildiyse geri döndürülemeyebilir. Bu yüzden bu ilaçların toksik etkilerinin önlenmesi çok önemlidir. Sisplatin ve ifosfamid akut ve gecikmiş santral sinir sistemi (SSS) toksisitesine sebep olan önemli antineoplastik ajanlardandır.

2.5.1. İfosfamid (N-3-bis(2-kloroetil)-1,3,2-oksazafosfinan-2-amid-2-oksit)

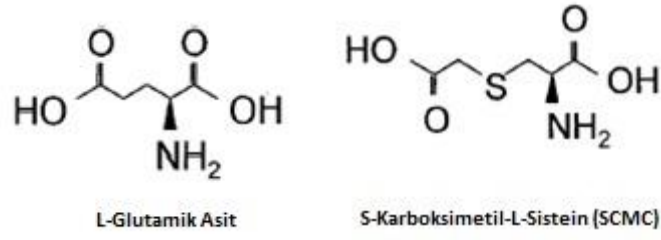
İfosfamid sarkoma ve hematolojik tümörlere karşı etkili yaygın olarak kullanılan antitümöral bir ilaçtır. Klinikte karşılaşılan en yaygın toksisitesi ürotoksisite, nefrotoksisite ve nörotoksisitedir. Alkilleyici bir ajan olan ifosfamid bir ön ilaçtır. Sitokrom P450 enzimleriyle aktif metabolitlerine parçalanması gerekir. Kan-beyin engelini geçebilmesiyle nörotoksik etkisinden sorumlu aktif metaboliti ise N-dekloroetilasyon reaksiyonuyla ortaya çıkan **kloroasetaldehit** ($ClCH_2CHO$) molekülüdür. İfosfamidin yaklaşık %50'si bu aktif metabolite parçalanır. Yapıca etanolün toksik metaboliti olan asetaldehite benzerdir. Nörotoksisite mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir. Klinikte nörotoksisite ensefalopati gelişimiyle görülür. İnsidansı düşüktür. Sürekli intravenöz infüzyon sonucunda ortaya çıkar. İfosfamidin etkililiği ekstraselüler aktivasyon sonrasında DNA'yı alkillemesine bağlıdır. İplik içi ve iplikler arası çapraz bağlara neden olarak DNA sentezini inhibe etmesi sonucu sitotoksisite ve hücre ölümüne sebep olduğu bilinmektedir (49, 56, 69)



Kloroasetaldehit etki mekanizması:

- Glutasyon depolarının boşalması (80)
- Uzun zincir yağ asidi oksidasyonunun inhibisyonu (137)
- Kloroasetaldehitin 2-kloro asetik asite oksidasyonu sonucu ortaya çıkan glutamaterjik etkileri (136)

Kloroasetaldehit klorik asite dönüştükten sonra sistein aminoasidiyle konjugasyon yaparak S-karboksimetil-l-sisteine (SCMC) dönüşür. Uygulanan ifosfamid dozunun %80'i bu moleküle dönüşür (76). Karboksimetilsisteinin aşağıda yer alan kimyasal yapısı incelendiğinde eksitatör nörotransmitter glutamata yapıca benzediği görülmüştür.



Bu nedenle nöronlar üzerinde glutamaterjik etkilere sahip olduğu düşünülmektedir (25). Hatta yapılan bir çalışmada ifosfamidin sebep olduğu nöronal hücre ölümünde eksitotoksitenin de katkısı olduğu gösterilmiştir (111).

2.5.2. Sisplatin (sis -diamindikloroplatin)

Sisplatin birçok solid tümörün tedavisinde kullanılan önemli bir kemoterapi ilacıdır (24). Sisplatin DNA'ya tutunup DNA replikasyonu ve mitozu engellemesiyle çok hızlı çoğalan hücrelere karşı oldukça yüksek toksisite gösterir (115, 123). Nefrotoksisite, ototoksisite ve nörotoksisite gibi birçok yan etkisi sebebiyle terapötik kullanımı ve etkinliği oldukça kısıtlıdır. Bu yan etkilerinin yanı sıra tümör hücreleri ve normal hücrelere karşı olan sitotoksik etki mekanizmalarının anlaşılabilmesi bu ilacın toksikolojik profilinin tanımlanmasında oldukça yararlı olacaktır. Daha önceden sisplatinin düşük dozlarının hücrelerde ölüme sebep olmak yerine hücre döngüsünü durduklarını göstermişlerdir (112). Normal koşullarda birçok somatik hücre bölünme geçirmemekte G0 durumunda dinlenmektedir; bu da sisplatinin düşük dozlarda nasıl antitümoral etki gösterdiğini açıklamaktadır.

Sisplatinin hücrelerde hem apoptoza hem de apoptotik olmayan nekrotik benzeri hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir (24, 107, 108, 116). Hücre ölümünün tipi sisplatin konsantrasyonuna bağlıdır. Düşük konsantrasyonlarda apoptozu tetiklediği ancak yüksek konsantrasyonlarda nekroza neden olduğu bilinmektedir (113).

Hücrelerin sisplatine maruz kalması apoptozun intrinsik yolağının aktivasyonuna ve diğer ölüm sinyallerine neden olabilecek mitokondriyel değişikliklere neden olur

(32). Mitokondri membranı uyarı aldığıında dış transmembran potansiyeli bozulur ve dış membranın geçirgenliği artmaya başlar. Hücre ölümü açısından çok önemli olan mitokondriyel membran geçirgenliğinin kontrolü ise Bcl2 ailesinin proapoptotik iki üyesi Bax ve Bak'ın kontrolündedir (77). Sonuç olarak spesifik moleküller membran aralığından sitozole dağılır ve hücrede ölüm sinyallerini başlatır. Hücrelerin ekzojen bu toksinle ölüm sinyalini algılaması mitokondriden sitozole ölüm moleküllerinin salıverilmesine neden olur. Bu önemli ölüm moleküllerinden biri Sitokrom C'dir. Sitozolda Apaf-1 molekülüyle birleşerek apoptozom denilen protein kompleksini oluşturur. Bu kompleks de prokaspaz 9'la birleşerek kaspaz 9'u aktiveştirir. Aktif kaspaz 9 da sırasıyla kaspaz 3 ve 7'nin aktiveşmesine neden olur. Sitokrom C ile beraber sitozole Smac/Diablo da saliverilir. Smac/Diablo, normalde kaspazları inaktif halde tutan IAPleri (apoptotik protein inhibitör) engelleyerek hücrelerde apoptozun indüklenmesine katkıda bulunan diğer bir proapoptotik moleküldür (134). Apoptoz indükleyici faktör (AIF) de normalde iç mitokondriyel membranda konumlanmıştır ancak mitokondri hasarlandıktan sonra o da sitozole akar. Daha sonrasında nukleusa yerleşerek kaspaz bağımsız kromatin yoğunlaşmasına ve DNA fragmantasyonuna sebep olur (14). Mitokondriden sitozole salıverilen diğer proapoptotik moleküller ise serin-proteaz HtrA2/Omi ve endonükleaz G'dir.

Sisplatinin direkt olarak mitokondriyi etkileyerek apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (32). İzole mitokondri üzerinde sisplatinin kalsiyum bağımlı şişmeye, mitokondriyel membran potansiyelinde depolarizasyona, kalsiyum salıverilmesine ve NADPH yıkımına neden olduğunu gösterilmiştir (33). Buna ek olarak sisplatinin izole mitokondrilerde enerji üretimini deprese ettiği ve ROS üretimine neden olduğu da gösterilmiştir (114). Sisplatinin bu etkileri nasıl ortaya çıkardığı tam olarak anlaşılmasa da sisplatin ya enerji üretim zincirinden ve ROS üretiminden bağımsız olarak direkt ya da indirekt olarak mitokondriyel porlar üzerine etki ederek etkisini ortaya çıkarmakta veya artmış mitokondriyel permeabilite organelde enerji üretim depresyonuna ve sonuç olarak ROS üretimine neden olmaktadır. Yukarıda da belirtildiği gibi aşırı artan ROS da mitokondride ve hücrede oksidatif strese sebep olur ve DNA, proteinler, lipitler gibi birçok makromolekülü hasarlandırarak hücre ölümüne yol açar. Sisplatin mitokondri

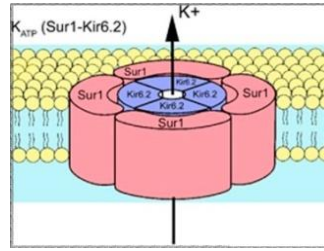
dışında da hücresele hedeflere zarar verir. Sitolitik ve membranda yerleşik proapoptotik Bcl2 üyeleri (Bax, Bak, Bad vb) ve aşırı kalsiyum birikimi gibi diğer etkilerle de hücreler hasarlanabilir (113). Aktive olan proapoptotik Bax ve Bak molekülleri mitokondri membranında depolarizasyona ve permeabilite artışına sebep oldukları gibi endoplazmik retikulum gibi organellerin zarlarına da etki ederler. Bu organellerin de membran geçirgenliğini artırarak ve kalsiyum homeostazisini bozarak ölümcül etkilerini gösterirler (21, 138).

Sisplatin sitotoksitesinde ana mekanizma DNA hasarıdır. DNA'da eklentilerin oluşmasına neden olarak DNA'nın yapısını bozar. DNA replikasyonuna ve transkripsiyonuna engel olur. DNA'da hasar meydana gelmesi de hücre döngüsünün durmasına neden olur ve DNA tamir mekanizması aktive olur. Eğer hasar, hücrenin tamir mekanizmasını yenerse hücreler apoptoza gider ve ölür.

Sisplatin plazma membranına da etki gösterir. Plazmalemmal proteinlerle güçlü, negatif yüklü fosfolipitlerle zayıf bağlar oluşturur. Bazı iyon kanalların ve taşıyıcıların aktivitelerini bozar. Sisplatin uygulamalarında plazmalemmal destabilizasyonun ve akışkanlığın arttığı gözlemlenmiştir. Membran akışkanlığındaki artışın FasL bağımsız ölüm reseptörü olan CD95/Fas redistribüsyonuna ve aktivasyonuna sebep olduğu gösterilmiştir (110, 119). Fas'ın uyarılması poliprotein ölüm sinyal kompleksinin (DISC) oluşumuyla apoptozun ekstrinsik yolağını aktive eder (44). Bu da başlatıcı kaspazlar olan kaspaz 8 ve 10'un aktive olmasına daha sonrasında kaspaz 3 ve 7 efektör kaspazların aktivasyonuna neden olarak ya mitokondriyel intrinsik apoptoz yolağını aktive eder ya da direkt olarak efektör kaspazların aktive olmasına neden olarak hücrelerin ölmesine neden olur (74). Sisplatin uygulanmış bir nöronal kültür çalışmasında, eksitotoksik mekanizmaların ve kaspaz aracılı hücre ölümünün bu ajanın nörotoksitesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (111).

2.6. Nöronal ATP-Bağımlı Potasyum (K_{ATP}) Kanallarının Moleküler Yapısı

K_{ATP} kanalları kardiyak miyositler, hormon-salgılayıcı hücreler, kemik, düz kas ve nöronlar gibi birçok uyarılabilir hücrede yer almaktadır. ATP duyarlı bu potasyum kanalları, içe yönlendirici K^+ kanallarından (Kir 6.1 ve Kir 6.2) ve düzenleyici sülfonilüre reseptörlerinden (SUR1, SUR2A ve SUR2B) oluşan oktomerik bir kompleks yapıda olup ATP bağlayıcı kaset protein ailesine mensuptur (118). Kir 6.1 ve Kir 6.2 %70 amino asit benzerliği gösterirler ve monomerleri 2 transmembran segmentiyle (TM1 ve TM2) sarmalanmış por oluşturan bölgelere sahiptir. N ve C terminal bölgeleri sitoplazmiktir ve ATP'ye bağlanır. TM1'i TM2'ye bağlayıcı bir molekül, kanalı K^+ iyonu akım geçirgenliğine seçici kılar (59). Hem por oluşturan alt üniteleri hem de düzenleyici SUR reseptörleri endoplazmik retikulum tutan motiflere sahiptir.



Şekil 5. K_{ATP} kanalı

(Simard JM ve arkadaşlarının makalesinden alınmıştır (120).)

Farklı hücre türlerinde Kir ve SUR alt tiplerinin farklı kombinasyonlarından meydana gelen birçok farklı tipte fonksiyonel K_{ATP} kanalı mevcuttur (bkz. Şekil 5). Kir 6.2/SUR1 kompleksi β -hücrelerine özgü, kan glukoz konsantrasyonundaki değişikliklere göre insülin sekresyonunun kontrol edilmesinden sorumlu bir K_{ATP} kanalıdır. Kardiyak kasta bulunan K_{ATP} kanalı ise Kir6.2 alt tipi ve SUR2A reseptörlerinden oluşur (71). Vasküler tonusun düzenlenmesinde çok önemli bir yere sahip olan vasküler K_{ATP} kanalları ise Kir6.1/SUR2B yapısına sahiptir (94). Periferik dokulara kıyasla nöronal K_{ATP} kanallarının yapısı çok net anlaşılamamıştır. Önceden moleküler olarak karakterize edilen K_{ATP} kanal birleşenleri hipotalamus, bazal ön beyin kolinerjik nöronlarında ve striatum gibi beyin yapılarında bulunan Kir 6.2 tiptekilerdir (3, 10, 93). Farmakolojik çalışmalarla beyinde SUR1 reseptörlerinin varlığı gösterilmiş olsa da fonksiyonel özellikleri tam olarak belirlenememiştir (26). Bu alt tiplerin farklı

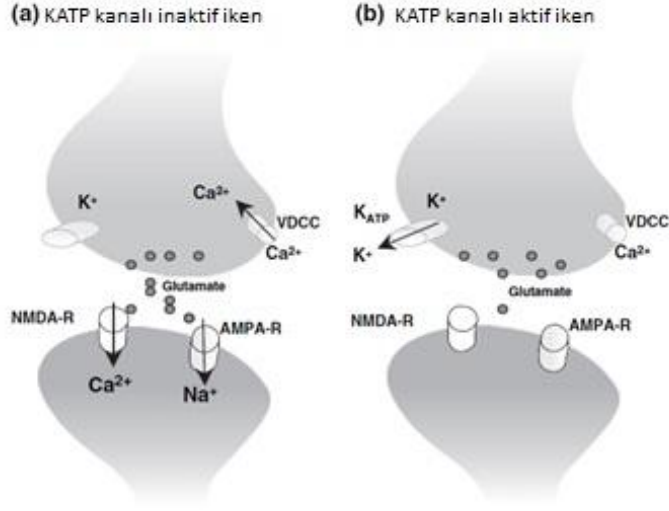
dokulardaki kombinasyonlarının belirlenmesi ise bu dokulardaki K_{ATP} kanallarına yönelik daha selektif ajanların seçilebilmesi bakımından önem taşır.

2.7. K_{ATP} Kanallarının Nöronal Hücre Ölümündeki Önemi

K_{ATP} kanalları hücrenin metabolik olaylarından elektriksel aktiviteye kadar önemli yaşamsal aktivitelerinde görev almaktadır. Potasyum kanalları hücrenin elektriksel aktivitesine bağlı membran polarizasyonu, buna bağlı iyon hareketleri ve nörotransmitter salınması gibi önemli olaylardan da sorumludur.

Santral sinir sisteminde enerji yetmezliği (hücre içi ATP konsantrasyonunun azaldığı) durumlarında bu kanalların aktive olması potasyum iyonlarının hücre dışına çıkmasına ve nöronların hiperpolarizasyonuna neden olur. Oysaki glutamatın uyardığı NMDA reseptörlerinden hücre içine kalsiyum iyonlarının geçişi için nöronal depolarizasyon gerekmektedir (27). Bu durumda membranal depolarizasyonun önlenmesi bu hücreler için öldürücü olan Ca^{+2} iyonlarının geçişini engelleyebilir.

Nöronlarda eksitasyon ve aksiyon potansiyellerinin oluşabilmesi Ca^{+2} , Na^{+} ve K^{+} iyonlarına geçirgen iyon kapılı kanalların aktivasyonuna bağlıdır. Voltaj-bağımlı K^{+} kanalları hücrelerin dinlenme durumunda repolarizasyonlarına neden olan ana kanallardır. Böylece nöronda aşırı kalsiyum girişi ve aşırı glutamat salınması de engellenmiş olur. Yani hücrede bulunan bazı iyon kanallarının nöronal depolarizasyonu azaltarak nöron koyucu etki oluşturabilirler. Bu duruma aday kanallardan biri de K_{ATP} kanallarıdır. Hücre içinde hipoksi ya da epilepsi gibi metabolik stres durumlarında ATP azalması K_{ATP} kanallarını aktive eder ve hücreler membran depolarizasyonundan korunabilir. Hücrede depolarizasyonla beraber birçok voltaj-bağımlı kanal da aktive olup hücre içine oldukça fazla oranlarda Na^{+} ve Ca^{+2} girmesine neden olur. Böylece bazı hücre fonksiyonları bozulur ve hücreler ölür (52).



Şekil 6. Glutamat toksisitesine karşı K_{ATP} kanallarının durumu

- K_{ATP} kanalları inaktif durumda. Nöronal depolarizasyonla voltaj-bağımlı Ca^{+2} kanalları aracılığıyla hücre içine Ca^{+2} girişi olur. Ca^{+2} girişi de glutamatu uyarır. Post sinaptik nöronda bulunan NMDA ve AMPA reseptörlerinin glutamat tarafından aşırı uyarılmasıyla nöronal ölüm meydana gelir.
- K_{ATP} kanalları aktif durumda. Nöronal sinir uçlarında hiperpolarizasyon meydana gelir. Voltaj bağımlı kalsiyum kanalları inaktive olur ve Ca^{+2} bağımlı glutamat saliverilmesi engellenmiş olur

(Soundarapandian, M.M. ve arkadaşlarının makalesinden alınıp, uyarlanmıştır (124).)

K_{ATP} kanallarının hücrenin metabolik durumuna göre membran eksitabilitesini azaltma ve hücre hasarından hücreleri koruyabilme özelliğinden faydalanarak nöronal hasar engellenebilir (bkz. Şekil 6). Mitokondriyel K_{ATP} (mito K_{ATP}) kanallarının aktivasyonu da mitokondride hiperpolarizasyona ve Ca^{+2} 'un hücre içine girişinin azalmasına neden olur. Serebellar granül hücrelerinde mito K_{ATP} kanallarının aktivasyonunun hücreleri oksidatif hasara karşı koruyabildiği gösterilmiştir (130). Mitokondriyel K_{ATP} kanallarının aktivasyonu da hücre membranında bulunan K_{ATP} kanalları gibi eksitator toksik uyarıda nöronal koruma sağlayabilir.

Kromakalim benzopiran türevi bir potasyum kanal açıcısıdır. Potasyum kanallarında açılmaya neden olarak vazodilatör etki gösteren bir ajandır. Aktif izomeri levokromakalimdir. Özellikle K_{ATP} kanallarını aktive ederek membranda

hiperpolarizasyona neden olur. Vasküler düz kaslarda gevşemeye neden olduklarından kan basıncını düşürmek amacıyla hipertansiyon tedavisinde kullanılabilir. Kromakalimin hipokampal nöronlarda glutamata bağlı hem nekrotik hem de apoptotik hücre ölümünü önlediği de gösterilmiştir (79). Önceden K_{ATP} kanal açıcı ajanların iskemi ve epileptik nöbetlere karşı nöron koruyucu etkilerinin presinaptik kanalları etkileyerek glutamat salıverilmesini engellemeleri dolayısıyla olduğu düşünülmekteydi (1, 64). Ancak daha sonra glutamatın eksitotoksik etkilerine karşı indirekt antagonistik etkiyle postsinaptik düzeyde de olabileceği düşünülmüştür (64). Kromakalimin ise postsinaptik K_{ATP} kanallarını açarak glutamat toksisitesine karşı koruma sağladığı görülmüştür (79).

Glibenklamid ise sülfonilüre türevi bir K_{ATP} kanal antagonistidir. Pankreatik beta hücrelerinde K_{ATP} kanallarını inhibe ederek insulin salıverilmesine neden olur. Böylece tip 2 diyabetli hastalarda oral hipoglisemik ajan olarak kullanılmaktadır. Özellikle SUR1 alt tipe sahip K_{ATP} kanalları bu ajanın hedef reseptörleridir (120).

2.8. Hücre Kültürü Besiyeri Ortamının Oluşturulması

2.8.1. Hücre Kültürü Besiyerinin Hazırlanması

Hücre kültürü besiyeri laboratuvar ortamında hücrelerin normal metabolik aktivitelerini sürdürebilmeleri için gerekli olan fizyolojik ortamı sağlayan besleyici solüsyonlardır. İçerdiği aminoasit, karbonhidrat, vitamin ve iyonlarla hücrelerin gelişimini desteklerler. In vitro ortamda hücrelerin yaşayabilmesi ve çoğalabilmesi için uygun pH, sıcaklık ve nemin sağlanması çok önemlidir. Bu nedenle hücre kültürü besiyeri içerdiği iyonlarla gerekli ozmolarite ve pH'ı da sağlar. Besiyeri hücrelerin tipine, adaptasyon yeteneğine ve hücre kaynağı organizmanın türüne göre farklılık gösterir. Çalışmanın amacına göre ve hücrenin ihtiyaçlarına göre uygun olan besiyeri tercih edilmelidir. Hücrelerin canlılıklarının devamı ve çoğalmaları için aminoasitler, karbonhidratlar, lipidler, vitaminler, iyonlar ve proteinlerin ortamda bulunması şarttır. Standart bir besiyerinde yukarıdaki bileşenlerin sağlanması için iki temel solüsyon uygulanır (51).

- **Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM)**

Hücre kültürlerinde olması gereken temel aminoasit kombinasyonu ilk defa Eagle tarafından 1955'de tanımlanmıştır (45). Kendi ismini taşıyan Minimum Eagle's Medium (MEM) isimli besiyeri bazı modifikasyonlarla bugüne kadar gelmiştir. Dulbecco tarafından modifiye edilen MEM solüsyonu (DMEM) bugün somatik hücre kültürlerinde en sık kullanılan besiyeri bileşenidir. DMEM hücrelerin beslenebilmeleri için gerekli glukozu, canlılıklarını sürdürebilmeleri için uygun ozmolarite ve pH'a, fonksiyonlarını görebilmeleri için gerekli aminoasitlere ve vitaminlere sahiptir. Ancak tek başına hücre gelişimi için yeterli değildir.

- **Fetal Bovin Serum (FBS)**

Serum hücrelerin tutunabilmeleri ve çoğalmaları için kullanılan ve içeriği tam olarak tanımlanmamış zengin bir protein çözeltilisidir. Bu protein çözeltilisinin içinde hormonlar, enzimler, hücrenin büyümesi ve çoğalmasını sağlayan büyüme faktörleri, yüzeylere tutunabilmesini sağlayan hücrelerarası matris proteinleri bulunur. Hücre çeşidine ve uygulamalara göre besiyerindeki serum oranı değişebilir. Standart bir somatik hücre kültüründe serum oranı %10'dur (51).

- ❖ **Fetal Bovin Serumunun (FBS) İnaktive Edilmesi**

Fetal bovin serumu, içerdiği kompleman proteinlerin denatüre olmasını sağlayarak hemolitik aktivitesini inhibe etmek amacıyla inaktive edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla -20°C'de tutulan FBS çözünmesi sağlandıktan sonra 56°C'lik su banyosunda 30 dakika bekletilir.

- **Glutamin ve penisilin/streptomisin**

Glutamin kültürdeki hücrelerin enerji ve karbon kaynağı olarak kullanmaları amacıyla besiyeri hazırlanırken karışıma eklenir. Kontaminasyonun önlenmesi amacıyla da penisilin/streptomisin solüsyonu hücre kültürü besiyerine ilave edilir.

2.9. MTT Sitotoksisite Tayini

MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) testi indirekt olarak hücre büyümesi ve/veya hücre ölümünü değerlendirmeyi amaçlayan bir ilaç duyarlılığı testidir (97). MTT yöntemi ile bir hücre topluluğundaki canlı hücreler kolorimetrik ve kantitatif olarak saptanabilmektedir. Birçok hücre popülasyonu için total mitokondriyel aktivite canlı hücre sayısı ile ilişkilendirilir. MTT sitotoksisite testi de tetrazolyum tuzu MTT'nin canlı hücrelerin sağlam mitokondrileri tarafından formazan kristallerine dönüştürülmesi esasına dayanır. Daha sonrasında mor renkli formazan ürününün çözünmesi amacıyla DMSO eklenir ve ortaya çıkan renkli çözeltinin spektrofotometrede ışık absorbansının ölçülmesiyle canlı hücre yoğunluğu belirlenmiş olur.

Sonuç olarak yaygın olarak kullanılan antineoplastiklerden sisplatin ve ifosfamidin neden olduğu nörotoksisite glutamata-bağlı eksitotoksik özellikler göstermektedir. Eksitotoksisitede hücre içine "kalsiyum girişi" toksisiteyi arttırabilmesi ve "potasyum çıkışı" da toksisiteyi azaltabilmesi bakımından önem taşımaktadır. Bu nedenle sıçan serebellar granül hücre kültüründe nimodipin (voltaj-bağımlı kalsiyum kanal blokörü), kromakalim (K_{ATP} kanal açıcısı) ve glibenklamid (K_{ATP} kanal blokörü) kullanılarak sisplatinin ve ifosfamid metaboliti olan kloroasetaldehitin nörotoksik etkilerinde kalsiyum ve potasyum iyonlarının katkısının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Hücre Kültürü öncesinde yapılan hazırlıklar

3.1.1. Kullanılan gereçler

Cam malzemeler: Beher (50-100 ml), pastör pipetler, petri kapları (çap: 90 mm), thoma lamı, lamel

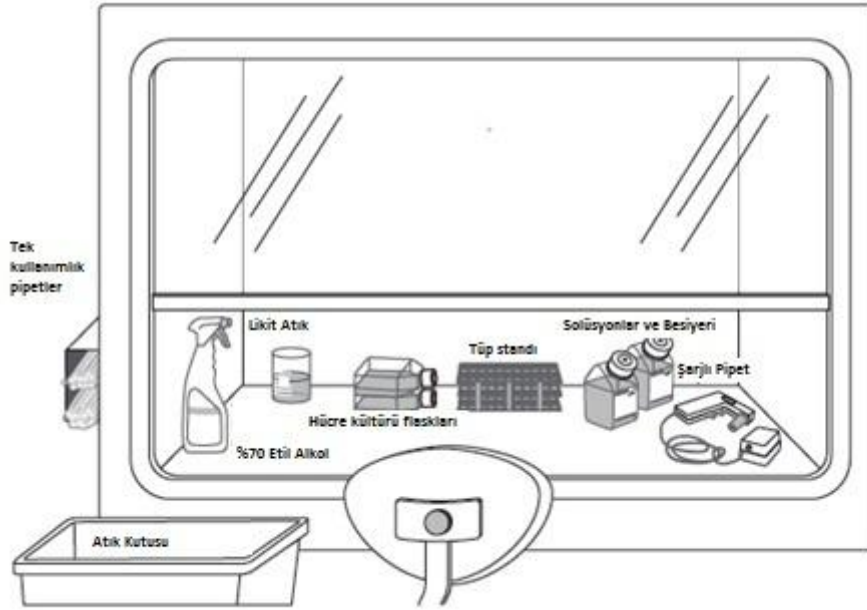
Metal malzemeler: Makas, pens

Plastik malzemeler: Tek kullanımlık pipetler, kültür flaskları, santrifüj tüpleri (15 ve 50 ml), otoklavlanabilir pipet uçları, steril filtreler (0,45µm), hücre kazıyıcı

3.1.2. Kullanılan cihazlar

Cihazlar	Üretici
CO ₂ inkübatör (37°C, %95 nemli hava, %5 CO ₂)	Newbrunswick Scientific, Eppendorf, ABD
Laminar akım steril ekim kabini (Vertikal)	Nüve- LN 090/120, Türkiye
İnverted Mikroskop	Leica Microsystems, Almanya
Otoklav (121°C, 1.5 atm, 20 dakika)	Tuttnauer 2540EL, Almanya
Santrifüj	Hettich Mikro 2202, İngiltere
Otomatik pipetler ve şarjlı pipetör	Eppendorf, Almanya
-20°C buzdolabı	Samsung, Güney Kore
Hava sterilizasyon cihazı	Air So Pure S980, ABD
ELISA okuyucu	Thermo Labsystems, Almanya
Hassas Tartı	Sartorius CPA26P, Almanya

Hücre kültüründe kullanılan malzemelerin tümü steril olarak kullanıldı. Şekil 7’de de görüldüğü gibi hücre kültürü ile ilgili işlemlerin tümü laminar akım steril kabinde gerçekleştirilmiştir. Cam malzemeler ve metal malzemeler yıkandıktan sonra distile su ile durulanıp, 121°C, 1.5 atm basınçta 20 dakika süre ile otoklavda sterilize edilmiştir. Plastik malzemeler steril olarak temin edilmiştir.



Şekil 7. Hücre kültürü örnek çalışma ortamı
(GIBCO® web sayfasından alınıp, uyarlanmıştır (148).)

Hücre kültürü laboratuvarı her hafta periyodik olarak dezenfektan içeren sıvılarla temizlendi (Sodyum Hipoklorit, NaClO). Odanın kullanılmadığı zamanlarda UV lamba kullanılarak odanın sterilizasyonu sağlandı. Çalışmaya başlamadan en az yarım saat önce laminar akım kabini açılarak çalışma ortamının sterilizasyonu sağlandı.

3.1.3. Kullanılan kimyasal malzemeler

Kimyasallar	Üretici
Etil alkol (% 70)	Sigma Aldrich, ABD
Besiyeri: DMEM “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium” (pH indikatörü olarak fenol kırmızısı içerir, optimum üreme için pH 7.4 olmalıdır, kırmızı renk)	Hyclone Thermo Scientific, Almanya
Fetal Dana Serumu (FCS)	Hyclone Thermo Scientific, Almanya
PBS: Phosphated Buffered Saline	Hyclone Thermo Scientific, Almanya
HBSS (Hank’s Dengeli Çözeltisi): Ca ve Mg içermeyen Hank’s dengeli çözeltisi	Hyclone Thermo Scientific, Almanya
Tripsin-EDTA: Tripsin hücre pasajlamalarında kullanılan temel enzimdir. Tripsin, bir serin proteaz tipi enzimdir. Lizin ve arjinin aminoasitlerinden peptidleri yıkar. Çalışmada % 0.25 EDTA’lı tripsin solüsyonu kullanılmıştır.	Sigma Aldrich, ABD
Poly-D-Lizin: Non-spesifik bağlanarak pozitif yüzey oluşturan bir proteindir. Flaskları ve plakaları kaplamak için kullanılır.	Sigma Aldrich, ABD
Penisilin-streptomisin solüsyonu	Hyclone Thermo Scientific, Almanya
L-Glutamin	Sigma Aldrich, ABD
MTT (Thiazolyl blue tetrazolium bromide %98)	ABCR Gmbh Co., Almanya
Tripan Mavisi	Sigma Aldrich, ABD
DMSO	Merck, Almanya
Distile su	Hyclone Thermo Scientific, Almanya

Nimodipin (Nimotop)	Bayer
Kromakalim	Sigma Aldrich, ABD
Glibenklamid	Sigma Aldrich, ABD
Sisplatin	Sigma Aldrich, ABD
Kloroasetaldehit	Sigma Aldrich, ABD

3.2. Çalışmada Kullanılan Hücre Kültürü Besiyerinin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan besiyeri DMEM ve %10 inaktive edilmiş fetal dana serumu (FBS) içermektedir. Bu çözeltiye 50 µg/ml penisilin ve 0,2 mM L-Glutamin eklenmiştir.

3.3. Poly-D-Lizin İle Kültür Flasklarının Kaplanması

Poly-d-lizin 0,1 mg/ml konsantrasyonda PBS içinde çözdürüldü. 1 ml'lik çözelti hazırlandıktan sonra bir flaskın içine pipetle verilip tabanına iyice yayılması sağlanır. Flaskın ağız kısmı yukarı bakacak şekilde tutularak içine konulan solüsyon pipetle alınıp bırakılarak tabanın iyice kaplanması sağlandı. Kaplama işlemi sona erdikten sonra flasklar 37°C, nemlendirilmiş %95 hava ve %5 CO₂ koşullarını sağlayan inkübatörde 1 gece bekletildi ve daha sonra +4°C buzdolabında saklandı.

3.4. Primer Hücre Kültürünün Hazırlanması

Hücre kültürü çalışmaları steril koşullar gerektirmektedir. Bu nedenle bütün deneyler steril laminar akım kabininde gerçekleştirilmiştir. Kabin ve ortamın sterilizasyonu ultraviyole ışık ile sağlanmıştır.

3.4.1. Serebellar Granül Hücrelerinin Elde Edilmesi

Çalışmada yenidoğan (5 günlük) her iki cins Sprague Dawley türü yavru sıçanlar kullanılmıştır. Toplamda 16 adet sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar 273/2012 karar numarasıyla ESOGÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alınarak ESOGÜ Tıp Fakültesi Deneysel Cerrahi ve Araştırma Hayvan Üretim ve Bakım Merkezi'nden temin edilmiştir.

Beş günlük sıçanlar %70'lik alkolle temizlendikten sonra hayatlarına dekapitasyon yöntemiyle son verildi. Kafa derisi pens yardımıyla sıyrılarak kafatası açıldı ve serebellum beyinden izole edildi.



Şekil 8. 5 günlük yavru sıçan ve serebellumu

3.4.2. Deney Protokolü

- Yavru sıçanların hayatına dekapitasyon yöntemiyle son verildikten sonra serebellum izole edildi.
- İzole edilen serebellum 5 ml'lik kalsiyum magnezyum içermeyen Hank's dengeli tuz çözeltisine kondu.
- Sterilizasyonu sağlamak amacıyla hücreler 2 kez santrifüj işlemi gerçekleştirilip besiyeri solüsyonları değiştirilerek yıkanmaları sağlandı.

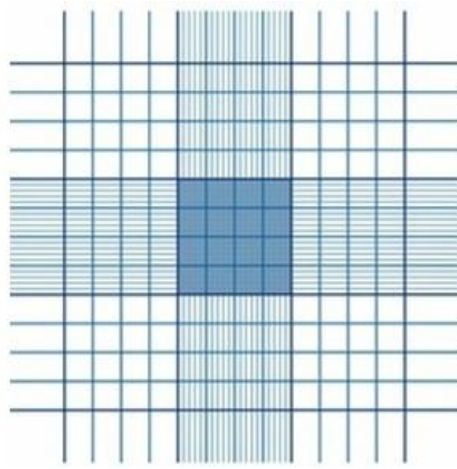
- En son yıkama işleminden sonra 5 ml'lik Hank's çözeltisi üzerine 2 ml tripsin-EDTA eklendi. Bu şekilde serebellum 37°C'de 40 dakika inkübatörde inkübasyona bırakıldı.
- Süre bitiminde tüp içine tripsin etkisini sonlandırmak amacıyla içerdiği HBSS miktarı kadar DMEM (5 ml) eklendi. Tripsini inhibe etmek için tripsin hacminin en az iki katı kadar %10 FBS'li besiyeri kullanıldı.
- Hücreleri tripsinden arındırılmasını sağlamak amacıyla 2 kez 1000 devirde 5 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Her seferde supernatantlar boşaltılarak hücreler üzerine 5 ml DMEM çözeltisi eklendi ve son santrifüj işleminden sonra hücreler tripsinden arındırılmış oldu.
- Daha sonrasında hücrelerin mekanik olarak da ayrışmasını sağlamak amacıyla tüp içerisinde hücrelere zarar vermemek için uçları bek alevinde hafif yuvarlatılmış bir pastör pipet yardımıyla 5 dakika süresince tritürasyon işlemi gerçekleştirildi.
- Daha önceden poly-d-lizin ile kaplanmış olan kültür flasklarına hücreler alınarak yüzeye yapışmaları sağlandı.
- Kültür flaskları 37°C, nemlendirilmiş %95 hava ve %5 CO₂ koşullarını sağlayan inkübatöre alındı.
- Ekim işlemi gerçekleştirildikten 30 dakika sonra kültür ortamını yapışmayan hücrelerden arındırmak amacıyla flasklardaki DMEM çözeltisi boşaltıldı ve yapışan hücreler üzerine yeni DMEM (5ml) çözeltisi eklendi.
- Besiyerleri haftada 2 kez değiştirildi.
- Serebellar granül hücreleri toplam 9 günlük in vitro inkübasyon sonunda ilaçların uygulanmasına hazır hale gelmiş oldu ve 10. günde sonuçlar elde edilerek çalışma sonlandırılmıştır (46).

3.4.3. Hücrelerin Mikroplakalara Ekimi

Çalışmanın 7. gününde serebellar granül hücreleri flaskların tabanından hücre kazıyıcı yardımıyla nazikçe kaldırıldı. Kaldırılan hücreler 15 ml'lik tüplere alınarak canlı hücre sayımı için hazır hale getirildi. Tüp içindeki hücrelerden alınan 50µl'lik örnek üzerine %4'lük tripan mavisinden 50 µl ilave edilerek ölü hücrelerin boyanması

sağlandı. Thoma lamında canlı hücreler sayılarak 96 kuyucuklu poly-d-lizin kaplı mikrolakaya her kuyucuğa 10^4 hücre düşecek şekilde hücre süspansiyonu hazırlandı ve her kuyucuğa bu süspansiyondan 100 μ l eklendi. Mikrolakalardaki hücrelerin inkübatöre konularak 1-2 gün yapışmaları ve büyümeleri için beklendi daha sonrasında hücreler toksisite deneyleri için hazır hale gelmiş oldu.

3.5. Thoma Lamı ile Hücre Sayımı



Yukarıda canlı hücre sayımında kullanılan Thoma lamının inverted mikroskop altında bakıldığında görülen çizgiler görülmektedir.

Ortadaki kare alanın içindeki küçük karelerin alanı: $0,0025 \text{ mm}^2$

Ortadaki büyük kare alanda $25 * 16 = 400$ küçük kare bulunmaktadır.

Ortadaki büyük karenin alanı: $400 * 0,0025 \text{ mm}^2 = 1 \text{ mm}^2$

Ortadaki büyük karenin hacmi(alan*derinlik=hacim): $1 \text{ mm}^2 * 0,1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \mu\text{l}$

Hücrelerin sayılması:

Örn: Ortadaki büyük kare alanda sayılan hücre sayısı: 20

Tripan mavisi ile dilüsyon faktörü: 2 (50 μ l Tripan mavisi ve 50 μ l hücre süsp.)

0,1 μ l'de => 20 hücre sayılmış olur

1 ml'de => $20 * 10^4$ hücre olur

Toplam hücre süspansiyonu hacmi: 5 ml

Toplam hücre sayısı: $20 * 10^4$ (hücre/ml) * 2 (dilüsyon faktörü) * 5 ml = $2 * 10^6$ (hücre/5ml)

3.6. İlaçların Hazırlanması ve Uygulanması

Sisplatin: Şişe içerisinde toz halde temin edilmiş ve DMSO'da çözülmüştür.

Kloroasetaldehit: ~%50 sulu çözelti halinde temin edilmiştir.

Nimodipin (Nimotop®): 10 mg/50 ml infüzyon solüsyonu kullanılmıştır.

Kromakalim ve Glibenklamid: Şişe içinde toz halde temin edilmiş ve 0,1 ml DMSO'da çözdürüldükten sonra steril distile su kullanılarak konsantrasyonları hazırlanmıştır.

Tüm ilaçlar hazırlandıktan sonra steril filtrasyondan geçirildi. Hücreler mikropalakalara alındıktan 2 gün sonra ilaçlar kontrol grubu hariç uygulandı (9.gün) ve tekrar inkübatöre alınarak 24 saat bekletildi.

3.7. MTT Sitotoksosite Testinin Uygulanması

MTT 5 mg/ml konsantrasyon olacak şekilde Hank's dengeli tuz çözeltisinde çözüldükten sonra steril filtreden geçirildi. Çalışmanın son gününde (10.gün) 10 µl MTT mikropalaka kuyucuklarına uygulandı ve karbondioksitli inkübatörde 4 saat bekletildi. Dört saatlik inkübasyon süresi sonunda kuyucuklardaki besiyerleri boşaltıldıktan sonra 150 µl DMSO eklendi ve ELISA okuyucuda 540 nm'de sonuçlar elde edildi.

3.8. Sonuçların Değerlendirilmesi

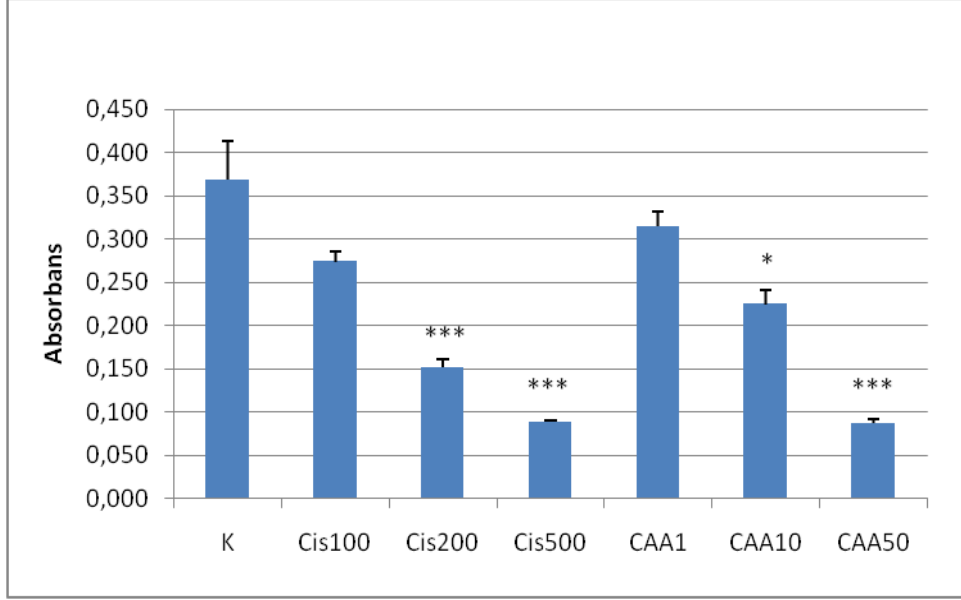
Elde edilen verilerin yüzde inhibisyon değerleri her grup için kendi mikropalakasında yer alan kontrol ortalamasına göre hesaplanmıştır.

3.9. İstatistiksel Testlerin Uygulanması

Elde edilen verilerin yüzde inhibisyon ortalamaları \pm SH (standart hata) hesaplandıktan sonra SPSS.15 paket programı kullanılarak sonuçlar analiz edildi. Normal dağılan veriler için bağımsız iki örneklem t testi uygulandı. Normal dağılmayan

veriler için de non-parametrik bir test olan Mann Whitney U testi uygulandı. Ortaya çıkan sonuçlarda $p < 0,05$ olan veriler anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR



Şekil 9. Sisplatin (Cis) ve kloroasetaldehitin (CAA) konsantrasyon – absorbans grafiği

*: <0,05: kontrol ile karşılaştırıldığında

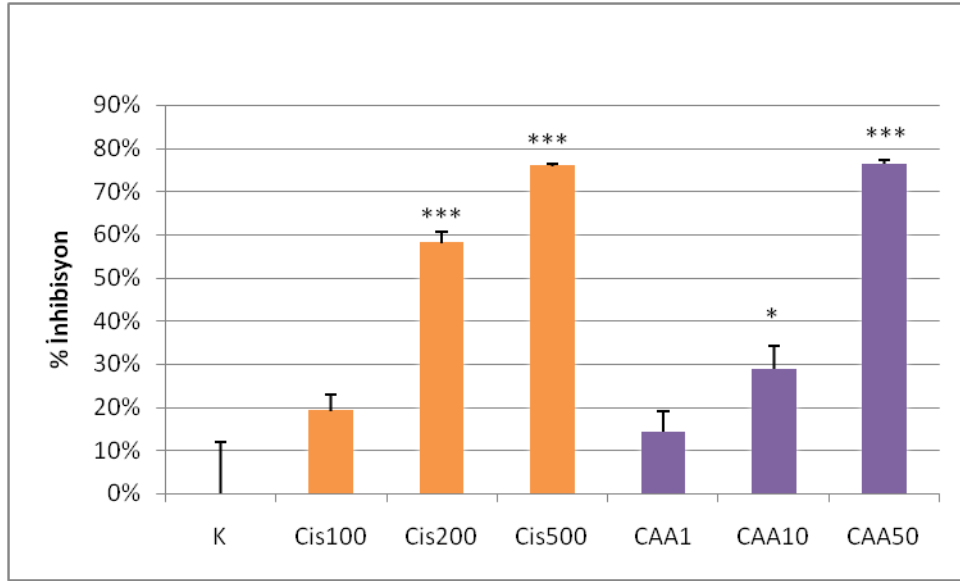
** : <0,01: kontrol ile karşılaştırıldığında

***: <0,001: kontrol ile karşılaştırıldığında

Sisplatin (Cis) ve kloroasetaldehitin (CAA) etkileri değerdendirildiğinde; her iki antineoplastik ajanın da konsantrasyon-bağımlı toksik etkileri olduğu gözlemlenmiştir. Sisplatin ve kloroasetaldehitin submaksimal konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla absorbans değerdelerine bakıldığında, kontrole göre sisplatinin 200 μ M ve kloroasetaldehitin ise 10 μ M konsantrasyonu minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) olarak belirlenmiştir.

Yüzde inhibisyon değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{ İnhibisyon} = 1 - (n / n_{K \text{ ort}}) * 100$$



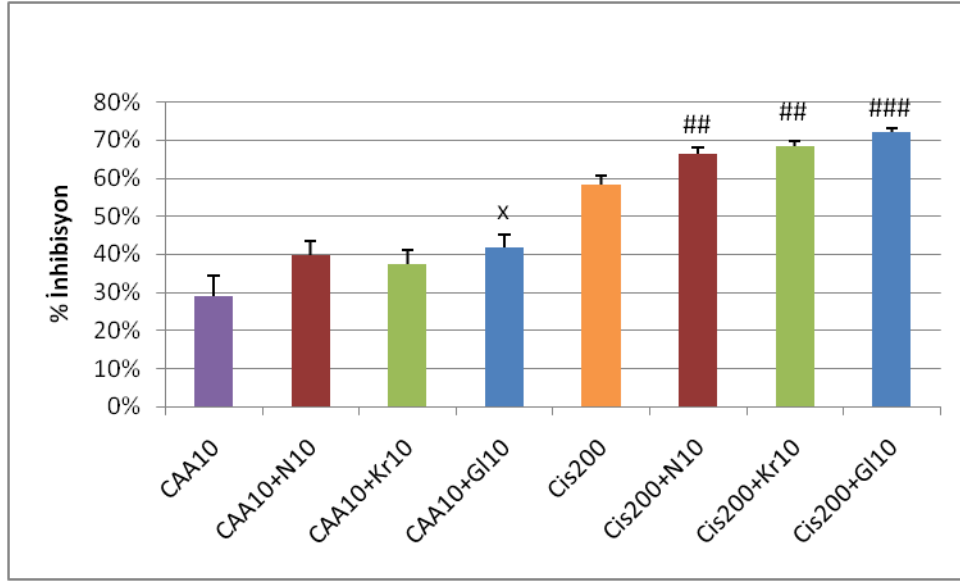
Şekil 10. Sisplatinin (Cis) 100, 200 ve 500 μM ve kloroasetaldehitin (CAA) 1, 10 ve 50 μM konsantrasyonlarda hücreler üzerine gösterdikleri toksisite

*: <0,05: kontrol ile karşılaştırıldığında

**> <0,01: kontrol ile karşılaştırıldığında

***> <0,001: kontrol ile karşılaştırıldığında

Sisplatin 100 (n=24) , 200 (n=24) ve 500 μM (n=24) konsantrasyonlarda uygulandığında sisplatinin kontrole (n=22) göre minimum inhibitör konsantrasyonu 200 μM olarak görülmüş ve çalışmaya bu değerle devam edilmiştir. Kloroasetaldehit ise 1 (n=24), 10 (n=24) ve 50 μM (n=24) konsantrasyonlarda hücreler üzerine uygulanmış ve kontrole göre minimum inhibitör konsantrasyon 10 μM olarak belirlenmiş ve çalışmanın geri kalan kısmında bu konsantrasyon kullanılmıştır.



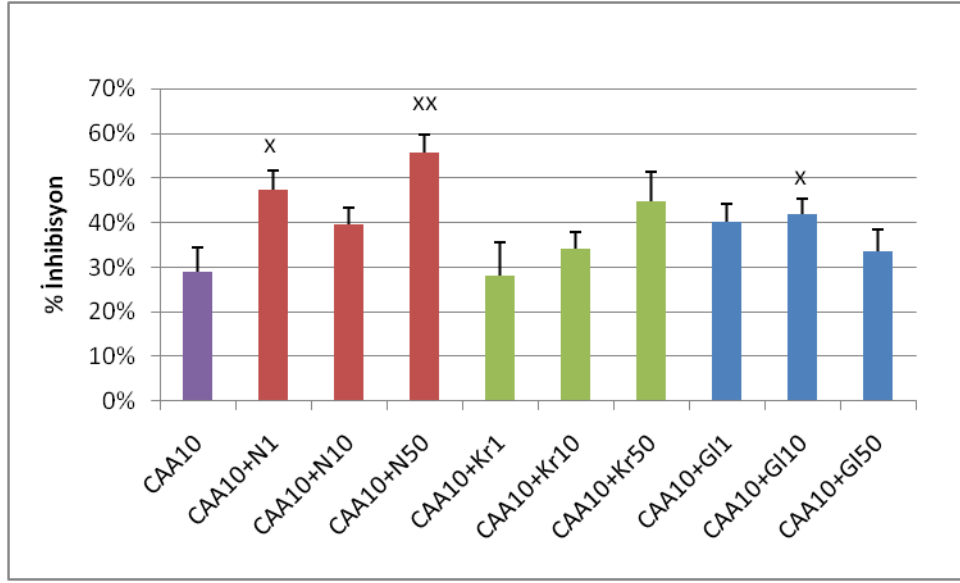
Şekil 11. Kloroasetaldehit (CAA) ve sisplatinin (Cis) anlamlı bulunan en düşük toksik konsantrasyonuna ek olarak nimodipin, kromakalim ve glibenklamid 10 µM konsantrasyonda eklendiğinde toksisitenin değişimi

x: $p < 0,05$: CAA10 ile karşılaştırıldığında

##: $p < 0,01$: Cis200 ile karşılaştırıldığında

###: $p < 0,001$: Cis200 ile karşılaştırıldığında

Hücreler üzerine ilaçların tahmin edilen terapötik değerlerdeki konsantrasyonları olan 10 µM verildiğinde toksik ilaçlara göre bu hücreleri ne kadar inhibe ettikleri yukarıdaki grafikte gösterilmiştir. Kloroasetaldehite (10 µM; n=24) ilaveten nimodipin (N) (n=48), kromakalim (Kr) (n=36) ve glibenklamid (Gl) (n=48) 10 µM uygulandığında yüzde inhibisyon kloroasetaldehitten yüksek gözükse N10 ve Kr10'da anlamlı bir fark bulunamamıştır. Ancak Gl10 kloroasetaldehitin nörotoksitesini anlamlı farklı artırmıştır ($p < 0,05$). Sisplatine (200 µM; n=24) ilaveten nimodipin (n=48), kromakalim (n=36) ve glibenklamid (n=36) 10 µM uygulandığında bütün ilaçlar bu konsantrasyonda sisplatinden anlamlı farklı şekilde inhibisyonu arttırmış yani sisplatinin toksik etkisini daha da arttırmıştır.

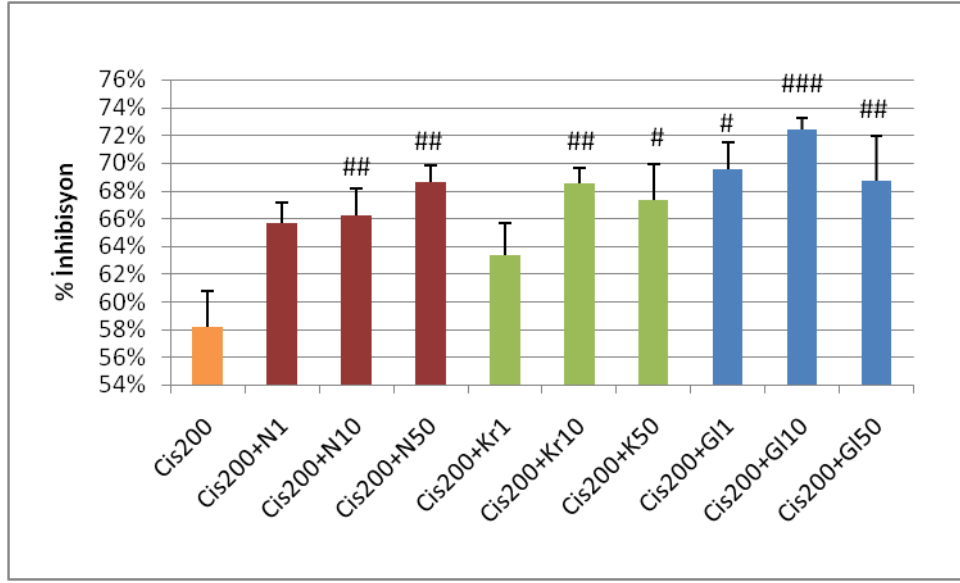


Şekil 12. Nimodipin, kromakalim ve glibenklamidin kloroasetaldehitle beraber 1, 10 ve 50 µM konsantrasyonda verilmesi ve toksisitenin değişimi

x: p<0,05: CAA10 ile karşılaştırıldığında

xx: p<0,01: CAA10 ile karşılaştırıldığında

Nimodipin, kromakalim ve glibenklamidin 10 µM'lık konsantrasyonları toksik etkiyi artırıcı etkileri görüldükten sonra bu ilaçların farklı dozları da denenmiştir. Kloroasetaldehite ilaveten nimodipin 1 (n=12), 10 (n=48) ve 50 µM (n=12) verildiğinde 1 µM (p<0,05) ve 50 µM (p<0,01) nimodipin kloroasetaldehitin toksik etkisini anlamlı bir şekilde artırmıştır. Kromakalim 10 µM (n=36) ve 50 µM (n=12) konsantrasyonlarda toksisiteyi artırmış gibi gözükse de kloroasetaldehite göre anlamlı değildir. Glibenklamid ise sadece 10µM (n=48) konsantrasyonda kloroasetaldehitin toksisitesini anlamlı farklı artırmıştır (p<0,05). 1 µM (n=23) ve 50µM (n=24) glibenklamid kloroasetaldehitin toksik etkisi üzerinde anlamlı farklı bir etki yaratmamıştır.



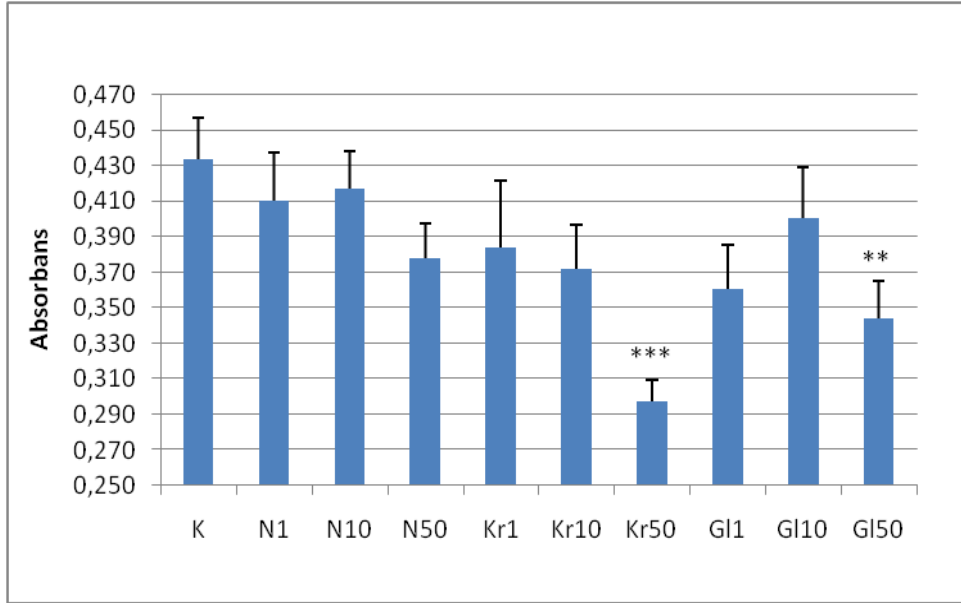
Şekil 13. Nimodipin, kromakalim ve glibenklamidin sisplatinle beraber 1, 10 ve 50 µM konsantrasyonda verilmesi ve toksisitenin değişimi

#: $p < 0,05$: Cis200 ile karşılaştırıldığında

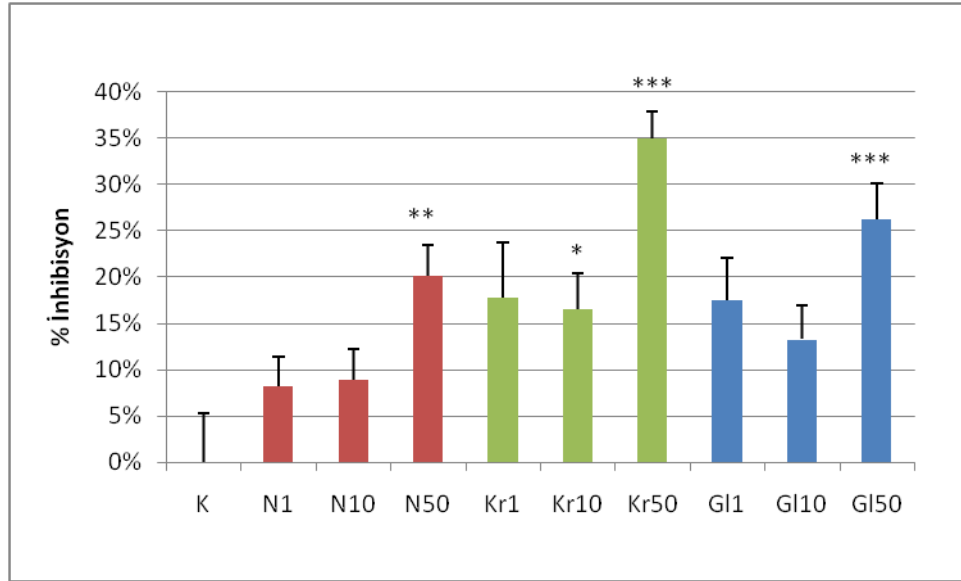
##: $p < 0,01$: Cis200 ile karşılaştırıldığında

###: $p < 0,001$: Cis200 ile karşılaştırıldığında

Sisplatinle beraber nimodipin (1 µM; n=12, 10 µM; n=48 ve 50 µM; n=23), kromakalim (1 µM; n=12, 10µM; n=36, ve 50 µM; n=12) ve glibenklamid (1 µM; n=12, 10 µM; n=34, ve 50 µM; n=12) 3 farklı konsantrasyonda uygulandığında nimodipin ve kromakalim 1 µM hariç bütün konsantrasyonlarda sisplatinin toksik etkisinin anlamlı bir şekilde daha da arttığı görülmüştür. Nimodipin bu toksisiteyi arttırıcı etkiyi doz bağımlı şekilde gösterirken, kromakalim ve glibenklamidde böyle bir durum gözlenmemektedir. Kromakalim ve glibenklamid 10 µM konsantrasyonda sisplatininden en fazla anlamlı farklı bulunmuştur.



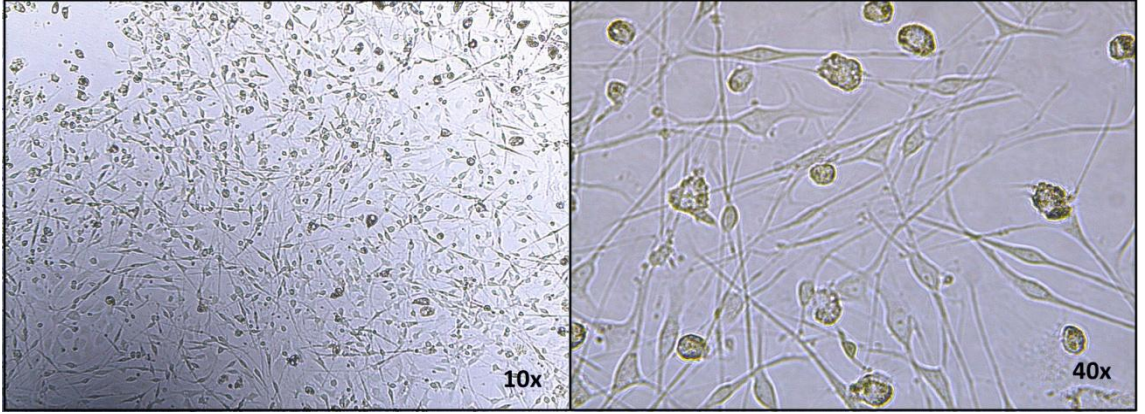
Şekil 14. Nimodipin, kromakalim ve glibenklamidin konsantrasyon – absorbans grafiği



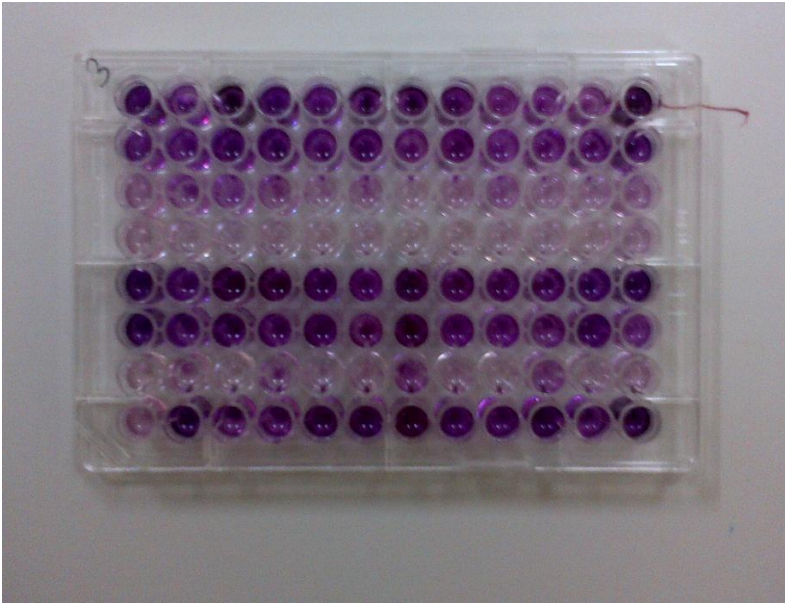
Şekil 15. Nimodipin, kromakalim ve glibenklamidin hücreler üzerine tek başlarına 1, 10 ve 50 µM konsantrasyonda verildiğinde bireysel toksisitelerinin değerlendirilmesi

- *: $p < 0,05$: kontrol ile karşılaştırıldığında
- ** : $p < 0,01$: kontrol ile karşılaştırıldığında
- ***: $p < 0,001$: kontrol ile karşılaştırıldığında

Toksik ilaçlarla beraber kültür ortamına verilen nimodipin (1 μ M; n=12, 10 μ M; n=24 ve 50 μ M; n=23), kromakalim (1 μ M; n=12, 10 μ M; n=24, ve 50 μ M; n=23) ve glibenklamidin (1 μ M; n=12, 10 μ M; n=23, ve 50 μ M; n=24) bireysel etkilerini değerlendirmek amacıyla kültür ortamına yalnız verildiklerinde nimodipinin düşük konsantrasyonlarda kontrolden farksız ancak yüksek konsantrasyonda (50 μ M) toksik olduğu görülmüştür (p<0,01). 10 μ M (p<0,05) ve 50 μ M (p<0,001) kromakalim ile 50 μ M (p<0,001) glibenklamid de kontrolden anlamlı farklıdır yani bu hücreler üzerinde tek başlarına toksik oldukları görülmüştür.



Şekil 16. Serebellar granül nöronların flaskta inverted mikroskop altındaki görüntüleri
(10x ve 40x büyütme)



1. Kontrol
2. Cis100
3. Cis200
4. Cis500
5. CAA1
6. CAA10
7. CAA50
8. CAA10+N10

Şekil 17. Sisplatin ve kloroasetaldehit verildikten sonra plakadaki renk değişimi

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda antineoplastik ajanlardan sisplatin ve ifosfamidin önemli yan etkilerinden biri olan nörotoksisitede Ca^{+2} ve K^{+} iyonlarının rolünü değerlendirmeyi amaçladık. Bu ajanların neden olduğu nörotoksisiteyi in vitro ortamda değerlendirebilmek amacıyla konumları itibariyle oldukça önemli bir noktada bulunan serebellar granül hücrelerini seçtik. Nörotoksik etkilerin araştırılması amacıyla sisplatin 100, 200, 500 μ M ve ifosfamidin nörotoksik metaboliti kloroasetaldehit 1, 10, 50 μ M konsantrasyonlarda serebellar granül hücre kültürüne uygulanmış ve bu ajanların konsantrasyon-bağımlı nörotoksisite gösterdikleri gözlemlenmiştir. Minimum inhibitör konsantrasyonları ise sisplatin için 200 μ M, kloroasetaldehit için 10 μ M olarak belirlenmiştir.

Sisplatin, sitotoksisitesi en fazla araştırılmış kemoterapi ajanlarından bir tanesidir. Konsantrasyon-bağımlı bir şekilde çok farklı tipte hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda sisplatin sitotoksisitesinin diferansiyel hücre içi birikimine bağlı olarak dokudan dokuya veya hücreden hücreye değiştiği de yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (113). Ancak serebellar granül hücreleri üzerine gösterdiği nörotoksisite hakkında bilinenler oldukça sınırlıdır. İfosfamid nörotoksisitesi konusunda ise in vivo çalışmalar dışında çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda ifosfamid bir ön ilaç olması dolayısıyla nörotoksik etkisinin değerlendirilmesinde hücre kültürüne bilinen metaboliti kloroasetaldehit uygulanmıştır. Bu molekülün de nörotoksisite mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır. Yapılan bir in vivo çalışmada ifosfamidin beynin birçok yapısında doz-bağımlı geniş lezyonlara sebep olduğu gösterilmiştir (111).

Her iki ajanın da neden olduğu nörotoksisite aktif nöronal ölüme neden olduğu gibi glutamata-bağımlı eksitotoksik özelliklere de sahip olduğu gösterilmiştir (111). Hücre içi kalsiyum homeostazisinde meydana gelen değişiklikler ile hücrenin redoks durumu da eksitotoksisitede dikkat çekmektedir. Farklı hücre gruplarıyla yapılan çalışmalarda eksitotoksisitenin hücre içine kalsiyum girişiyle arttığı, potasyum çıkışıyla azaldığı

yönünde çalışmalar bulunmaktadır (47, 130). Bu iyon hareketlerini değerlendirmek amacıyla serebellar granül hücre kültürüne nimodipin (voltaj-bağımlı kalsiyum kanal blokörü), kromakalim (K_{ATP} kanal açıcısı) ve glibenklamid (K_{ATP} kanal blokörü) antineoplastik ajanlarla beraber uygulanarak bu hücrelerde meydana gelen nörotoksisitede kalsiyum ve potasyum iyonlarının katkısı değerlendirilmiştir.

Bir haftalık serebellar granül hücrelerinde L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanalları bu hücrelerde yer alan kalsiyum kanal fasilitasyonunun oldukça büyük bir kısmını (%60-70) oluşturmaktadır (104). Dolayısıyla bu kanallar aracılığıyla hücre içine girebilecek kalsiyum miktarı hücrelerin ölümü açısından önemli olabilir. Bu etkiyi değerlendirmek amacıyla nörotoksik ajanlar 1, 10 ve 50 μM konsantrasyonlardaki nimodipin ile beraber hücre kültürlerine uygulanmıştır. Kloroasetaldehit ile beraber 1 ve 50 μM nimodipin bu hücrelerde nörotoksisiteyi beklenenin aksine anlamlı şekilde arttırmıştır. 10 μM nimodipin kloroasetaldehitin nörotoksisitesini arttırmış gibi gözükse de bu etki anlamlı bulunamamıştır. Sisplatin ile nimodipin beraber uygulandığında ise nörotoksisite konsantrasyon-bağımlı şekilde yine artış göstermiştir. 10 ve 50 μM konsantrasyonlardaki nimodipin bu hücreler üzerinde sisplatinin toksik etkisini anlamlı şekilde arttırmıştır. Oysaki daha önce yapılan çalışmalarda nimodipin hidrojen sülfür ve NMDA nörotoksisitesine karşı serebellar granül hücreleri intraselüler kalsiyum artışına bağlı hücre ölümünden koruyabildiği gösterilmiştir (46, 54).

Ekzojen bir toksine maruz kalan hücreler için bu kanallar aracılı hücre içi Ca^{+2} artışı bu hücrelerin sağkalımları açısından önemli olacağını düşünsek de durum tam tersine gerçekleşmiştir. Bu durumda hem sisplatin hem de kloroasetaldehit nörotoksisitesinde başka mekanizmalar aracılığıyla kalsiyumun hücre içine girişinin meydana gelebileceği düşünülebilir. İlk başlarda nörotoksisitenin hücre içi kalsiyumun - hangi yoldan olursa olsun - sadece aşırı artmasından kaynaklandığı düşünülmekteyken sonradan yapılan çalışmalarla hücre içine kalsiyumun hangi yoldan girdiği ve hangi ikinci haberci mekanizmaları etkilediği de önem kazanmaya başlamıştır (129). Hipokampal nöronlarda yapılan bir çalışmada L-tipi voltaj bağımlı kanal aracılı Ca^{+2} 'un hücre içine girişi zararsız olurken NMDA reseptörleri aracılı Ca^{+2} girişi hücreler için

öldürücü olmuştur (43). Kalsiyum sinyalleşme fizyolojileri hücreden hücreye de fark edebilmektedir. Örneğin serebellar Purkinje hücreleri komşuları olan serebellar Granül hücrelerden bile farklılık gösterebilir. Her ikisi de nöron olmalarına rağmen farklı sinyalleşme mekanizmalarına sahip olabilirler (43). Bu durumda serebellar granül hücrelerinde voltaj bağımlı kanalların kapatılmasıyla nörotoksisitenin engellenememesi diğer hücrelerden farklı kalsiyum sinyal mekanizmalarına sahip olduklarını ya da bu kanallar aracılığıyla hücre içine giren kalsiyumun engellense bile toksisiteyi bakımından önemli bir fark oluşturmadığını düşündürmektedir. Toksisitenin artmış olması ise Şekil 3'te de gösterildiği gibi diğer kalsiyum yollarının aktivasyonu ile toksik Ca^{+2} 'un hücre içine girmesine bağlı olabileceği düşünülebilir.

Nöronlar gibi uyarılabilir hücrelerde iyon konsantrasyonlarının düzenlenmesi membran potansiyeli ve elektriksel aktivitenin düzenlenmesi bakımından önemlidir. Hücre içi ve hücreler arası kompartmanlarda meydana gelen iyon konsantrasyonlardaki değişiklikler, hücre ölümleriyle ilgili mekanizmaların da düzenlenmesine katkıda bulunur. Bu iyonlardan bir diğeri de potasyum iyonudur (K^+). Bu durumda K_{ATP} kanalları aracılı hücre içi ve hücre dışında meydana gelen K^+ konsantrasyonu değişiklikleri hücrelerin ölümleri ve/veya sağkalımları açısından önemli olabilir. K_{ATP} kanalları membran potansiyeline göre çalışan kanallardır. Potasyumun akım yönü aksiyon potansiyeline göre ayarlanır. Pozitif membran potansiyelinde K^+ akım yönü hücre dışına doğru olurken negatif membran potansiyelinde K^+ hücre içine akar. K_{ATP} kanalları hücre membranının aksiyon potansiyeline göre K^+ iyonunun akım yönünü belirleyerek membran eksitabilitesinin azalmasını sağlar. Bu nedenle nöronları eksitotoksisiteye karşı koruyabilecek aday iyon kanalları oldukları düşünülmektedir (127).

Sisplatin de dahil birçok kemoterapi ajanının antitümoral aktivitesinde apoptotik mekanizmalar yer almaktadır. Apoptoz hücrelerin büzüşmesi, membranın tomurcuklanması, DNA'nın fragmantasyonu ve proapoptotik moleküllerin oluşumu ile karakterize bir hücre ölümü şeklidir. Bir hücredeki potasyum düzeyinin yüksekten düşüğe geçmesi hücre hacminin azalmasına ve apoptozu indükleyecek bazı enzimlerin

(örn. kaspaz, endonükleaz) aktivasyonuna neden olur (20). Bu durumda intraselüler potasyum kaybının engellenmesi hücrelerin sağkalımını sağlayabilecek bir strateji de olabilir.

Sisplatinin nörotoksik aktivitesinin K_{ATP} kanalları-aracılı K^+ iyon hareketiyle ilişkisini değerlendirmek amacıyla serebellar granül hücre kültürüne sisplatinle beraber K_{ATP} kanal açıcısı kromakalim ve kapatıcısı glibenklamid 1, 10, 50 μM konsantrasyonlarda uygulanmıştır. İlginç olarak her iki ajan da sisplatinin nörotoksik etkisini artırmıştır. Bir çalışmada hücre içindeki potasyumun azalmasıyla sisplatinin sitotoksitesinin ve antitümoral etkinliğinin arttığı gözlemlenmiştir (88). Normal fizyolojik koşullarda K_{ATP} kanalları kapalı durumdadır ancak sisplatin varlığı gibi bir patolojik durumda hücre membran potansiyeli depolarizasyon yönünde değişir (127). Hücreler uyarılır ve K_{ATP} kanalları bu membran potansiyelini yenmek için açılarak K^+ iyonlarının hücre dışına akmasıyla hiperpolarizasyon meydana gelir. Eğer K_{ATP} kanalı dışarıdan verilen bir ajanla kapatılırsa hücreler bu aksiyon potansiyelini yenemeyecek ve eksitasyon meydana gelecektir. Bu durumda glibenklamidin toksik etkiyi artırması beklenen bir sonuçtur. Bizim verilerimize göre de kromakalime göre glibenklamid toksik etkiyi daha fazla artırmıştır.

Kromakalim verildiğinde de sisplatinin nörotoksik etkinliğinin artmasına sebep olabilecek durumlar aşağıda sıralanabilir;

- a) Serebellar granül hücrelerinde bulunan K_{ATP} kanallarının alt-ünite kombinasyonu ile kromakalimin seçici olduğu Kir 6.2/SUR2B alt-ünite kombinasyonundan farklı olabilir (142).
- b) K_{ATP} kanal açıcısı olarak bilinen iptakalim yüksek konsantrasyonda dopamin nöronlarının plazma membranında bulunan K_{ATP} kanallarında kapatıcı olduğu gösterilmiştir (142). Serebellar granül hücrelerinde de kromakalim benzer şekilde davranmış olabilir. Aynı şekilde kromakalim de yüksek konsantrasyonlarda (10-50 μM) sisplatinin toksik etkisini anlamlı şekilde artırmıştır.

- c) Düşük K^+ içeren besiyerinde bulunan serebellar granül hücrelerin eksitotoksositeye karşı daha hassas oldukları gösterilmiştir (58). Çalışmamızda kullandığımız serebellar granül hücreler sisplatinin nörotoksik etkisine daha duyarlı davranmış olabilirler.
- d) Kromakalim çok yüksek konsantrasyonda (50 μM : $p < 0,001$) serebellar granül hücreler üzerine direkt uygulandığında da kontrole göre toksik etki göstermiştir (bkz. Şekil 13-14). Yani kromakalim de yüksek konsantrasyonda sisplatinin toksik etkisine katkı sağlamış olabilir.

Kloroasetaldehit nörotoksitesinde K_{ATP} kanallarının rolünü değerlendirmek amacıyla aynı şekilde serebellar granül hücreleri kloroasetaldehit ile birlikte kromakalim ve glibenklamid maruz bırakılmıştır. Kloroasetaldehit ile beraber verilen kromakalimle K_{ATP} kanal aktivasyonu nörotoksik etkide anlamlı bir fark oluşturmamıştır. Kromakalim yüksek konsantrasyonda (50 μM) nörotoksiteyi artırmış gibi gözükse de fark anlamlı değildir. Bu artış kromakalimin yüksek konsantrasyonda kendi toksisitesinden kaynaklanmış olabilir (bkz. Şekil 13-14). Kloroasetaldehit ile beraber verilen glibenklamid ise sadece 10 μM konsantrasyonda kloroasetaldehitin nörotoksitesini anlamlı şekilde artırmıştır ($p < 0,05$). Bu beklenen bir durumdur. Ekzojen bir uyarın varlığında hücrelerde meydana gelen depolarizasyon K_{ATP} kanallarının kapatılmasıyla engellenemeyeceğinden hücrelerde eksitasyon meydana gelerek ölüm gerçekleşebilir. Ancak yüksek dozda verilen glibenklamid kendi toksisitesi (bkz. Şekil 13-14) de olmasına rağmen kloroasetaldehitin nörotoksik etkisinde anlamlı bir fark yaratmamıştır (bkz. Şekil 11).

Hücre ölümü çalışmalarında ayrıntılı bir şekilde araştırılan Ca^{+2} , un hücre içine girişi ve intraselüler Ca^{+2} birikimi yanında K^+ , un hücre dışına çıkmasıyla intraselüler K^+ , un aşırı azalması da dikkat çekmektedir (146). Fizyolojik konsantrasyonlardaki hücre içi K^+ apoptotik moleküller üzerinde baskılayıcı rol oynamaktadır. Buna ek olarak K^+ , un hücre dışına çıkışı gerçekleşirken hücrelerden su kaybı da meydana gelir ve bu da apoptozun karakteristik morfolojik değişikliklerinden biri olan hücre hacminin azalmasına bağlı hücre büzüşmelerine sebep olur. Hücre içi potasyum kaybının fazla

olması kaspaz aktivasyonu, sitokrom c salıverilmesi ve endonükleaz enzimlerin aktivasyonuna da neden olarak apoptotik kaskadı aktive edebilir. Potasyum iyonu hücre içinde en çok bulunan iyonlardan biridir ve hücre onlarca mM potasyum kaybını tolere edebilse de bu kayıp yaklaşık %50 oranında olduğu zaman hücreler tarafından tolere edilemeyip hücrelerin ölümüne sebep olabilir (146). Bu durumda hücrelerin aşırı miktarlarda K^+ kaybetmeleri de hücrelerin ölüm sebepleri arasında sayılabilir.

Her iki antineoplastik ajanın da nörotoksitesinde glibenklamidin en yüksek dozu (50 μ M) toksisiteyi daha az artırmıştır. Bu durumda K_{ATP} kanalları aracılı K^+ 'un hücre dışına çıkması yüksek dozlardaki glibenklamidle az da olsa engellenebilmesi hücre membranında bulunan diğer pompalar veya kanallar aracılığıyla K^+ hücre dışına çıkması dahi nörotoksik etkiyi azaltmada kısmen katkıda bulunmuş olduğunu gösterebilir.

Potasyum kanallarının aktivasyonu L-tipi voltaj bağımlı kanallar vasıtasıyla Ca^{+2} 'un hücre içine girişini de uyarır ve intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonu artar. Bu durum serebellar granül hücrelerin sağkalımları açısından önemli olan MAP kinaz yolağının aktivasyonuna neden olur. Kalsiyum artışı belli bir değere kadar hücrelerin sağkalımları açısından yararlı olsa da hücre içinde aşırı birikmesi sonucunda apoptotik mekanizmaların aktive olmasıyla toksik etki göstermektedir (147).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmada kullanılan L-tipi kalsiyum kanal blokörü nimodipin, sisplatin ve kloroasetaldehit nörotoksitesini anlamlı şekilde arttırmıştır. Kalsiyum iyonlarının hücre içinde aşırı birikimi hücre ölümlerine giden yolda önemli bir basamaktır. Kalsiyumun hücre içine girişinin engellenmesiyle bu toksik etkinin azaltılabileceğini düşünsük de çalışmamızda tam tersi bir durum gerçekleşmesi bu kanallar aracılığıyla hücre içine giren Ca^{+2} 'un serebellar granül hücrelerde toksik olmadığını düşündürmektedir. Dolayısıyla bu kanalların kapatılması toksisiteyi azaltmamıştır. Bu durumun en önemli sebeplerinden bir tanesi toksik ajanların kendilerine özgü hangi hücre ölümü mekanizmalarını harekete geçirdiklerinin bilinmemesi olabilir. Plazma membranında bulunan diğer kanallar aracılığıyla hücre içine giren kalsiyum bu antineoplastik ajanların toksisitelerine katkıda bulunmuş olabilir ve sadece L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının bloke olması nörotoksiteyi değiştirememiştir. Hücrelerin tipi de farklı kalsiyum sinyallerine sahip olabilmeleri bakımından farklılık gösterebilir. Serebellar granül hücrelerine uygulanan antineoplastik ajanlara (sisplatin ve kloroasetaldehit) bağlı gerçekleşen nörotoksitede kalsiyum akımlarına yönelik daha ayrıntılı çalışmaların yapılması gerekmektedir. Sisplatin ve kloroasetaldehitin nörotoksik etkisinde kalsiyum iyonlarının rolü araştırılırken diğer kanallar vasıtasıyla hücre içine giren Ca^{+2} da değerlendirilmelidir.

Toksik bir uyarın varlığında membranda depolarizasyon meydana gelmesi K_{ATP} kanallarının aktive olup K^+ iyonlarının hücre dışına çıkması hiperpolarizasyon meydana getirir. Bu durum membran eksitabilitesi azaldığı için hücrelerin sağkalımlarına katkıda bulunur. Dışarıdan bu kanalları kapatacak bir ajan uygulandığı takdirde toksisitenin artması beklenen bir durumdur. Çalışmamızda da glibenklamid hem sisplatin hem de kloroasetaldehit nörotoksitesini K_{ATP} kanallarını kapatarak artırmıştır. Öte yandan dışarıdan K_{ATP} kanallarını açan bir ajan ortama verildiğinde ya etki göstermemesi ya da toksisiteyi azaltması beklenirken sisplatinin nörotoksitesi kromakalim varlığında yine artmıştır. Bu sebeple sisplatin nörotoksitesinde K_{ATP} kanallarının karmaşık bir role sahip olduğu görülmüştür. Ancak kloroasetaldehit nörotoksitesi kromakalim

varlığında anlamlı bir değişiklik göstermemiştir. Sonuç olarak her iki antineoplastik ajanın da sebep olduğu nörotoksisitede K_{ATP} kanalları aracılı K^+ iyonlarının değerlendirilmesi için daha kapsamlı çalışmalara gerek bulunmaktadır.

Çalışmamızın sonuçlarına göre ileriye dönük çalışmalarda dikkat edilecek noktaları sıralayacak olursak;

- a) Kalsiyum iyonlarının sisplatin ve kloroasetaldehit ile meydana gelen nörotoksisitede olası rollerini değerlendirebilmek için daha kapsamlı çalışmalara gerek vardır. Plazma membranında bulunan diğer Ca^{+2} kanalları, hücre içinde bulunan depo ve organellere bağlı kalsiyum mekanizmalarının da değerlendirilmesi gerekmektedir.
- b) Kainik asit ile indüklenen nöbetler öncesinde verilen kromakalim hipokampal nöronlarda anti-apoptotik etkiye sahip HSP70'i aktive ederek nöroprotektif etki göstermiştir. Böylece K_{ATP} kanallarının ön-koşullanmaya (pre-conditioning) bağlı nöronal koruyucu mekanizmalarda yer alabileceği önerilmiştir (18). Olası nöronal hasar öncesinde K_{ATP} kanallarının açılması hücrelerin sağkalımları açısından daha yararlı olabilir.
- c) K_{ATP} kanal aktivasyonunu sağlamak için bu hücrelerde bulunan alt-ünite kombinasyonuna göre daha seçici ajanların kullanılması daha yararlı olabilir.
- d) Plazma membranından ziyade hücre ölümünde önemli bir merkez olan mitokondride bulunan K_{ATP} kanal aktivasyonu ile meydana gelen Ca^{+2} hücre içine girişinin, serbest oksijen radikalleri oluşumunun ve pro-apoptotik moleküllerin engellenmesi hücrelerin sağkalımları açısından daha etkili olabilir. Hatta mitokondriyel K_{ATP} (mito K_{ATP}) kanallarının aktivasyonu serebellar granül hücreleri H_2O_2 'ye bağlı oksidatif hasara karşı koruduğu da gösterilmiştir (130). Antineoplastik ajanların neden olduğu nörotoksisitede de mito K_{ATP} kanal aktivasyonu hücrelerin sağkalımları açısından daha yararlı olabilir.
- e) K_{ATP} kanallarını etkileyen ve düzenleyen mekanizmaların anlaşılabilmesi de bu kanalların fonksiyonlarının belirlenmesine yardımcı olabilir.
- f) K_{ATP} kanalları farklı doku ve hücrelerde farklı davranabilir. Örneğin mito K_{ATP} kanallarını açan diazoksit mezensefalik nöronlarda MPP^+ sitotoksisitesine karşı

koruma sağlarken, K_{ATP} kanallarının kapatılması orta beyinde bulunan dopamin nöronlarında koruma sağlamıştır (131, 144).

- g) K_{ATP} kanallarının ve sülfonilüre reseptörlerinin oluşumu sıçanlarda doğum sonrası gerçekleşmekte ve en fazla yoğunluğa yetişkinlikte erişmektedir. Bu durumda yetişkin dönemdeki K_{ATP} kanal aktivasyonu nörotoksik etkiye karşı daha etkili olabilir (68, 143).

KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Abele AE, and Miller RJ., 1990, Potassium channel activators abolish excitotoxicity in cultured hippocampal pyramidal neurons. *Neuroscience letters* 115: p. 195-200.
2. Ahlijanian MK, Westenbroek RE, and Catterall WA., 1990, Subunit structure and localization of dihydropyridine-sensitive calcium channels in mammalian brain, spinal cord, and retina. *Neuron* 4: p. 819-832.
3. Allen TG, and Brown DA., 2004, Modulation of the excitability of cholinergic basal forebrain neurones by KATP channels. *The Journal of physiology* 554: p. 353-370.
4. Amar AP, and Levy ML., 1999, Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury. *Neurosurgery* 44: 1027-1039; discussion p. 1039-1040.
5. Ankarcona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, and Nicotera P., 1995, Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15: p. 961-973.
6. Anwyl R., 1999, Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain research Brain research reviews* 29: p. 83-120.
7. Apps R, and Garwicz M., 2005, Anatomical and physiological foundations of cerebellar information processing. *Nat Rev Neurosci* 6: p. 297-311.
8. Arundine M, Aarts M, Lau A, and Tymianski M., 2004, Vulnerability of central neurons to secondary insults after in vitro mechanical stretch. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24:p. 8106-8123.
9. Atluri PP, and Regehr WG., 1996, Determinants of the time course of facilitation at the granule cell to Purkinje cell synapse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16: p. 5661-5671.
10. Avshalumov MV, and Rice ME., 2003, Activation of ATP-sensitive K⁺ (K(ATP)) channels by H₂O₂ underlies glutamate-dependent inhibition of striatal dopamine release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: p. 11729-11734.
11. Azevedo FA, Carvalho LR, Grinberg LT, Farfel JM, Ferretti RE, Leite RE, Jacob Filho W, Lent R, and Herculano-Houzel S., 2009, Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *The Journal of comparative neurology* 513: p. 532-541.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

12. Babenko AP, Aguilar-Bryan L, and Bryan J., 1998, A view of sur/KIR6.X, KATP channels. *Annual review of physiology* 60: p. 667-687.
13. Babu CS, and Ramanathan M., 2011, Post-ischemic administration of nimodipine following focal cerebral ischemic-reperfusion injury in rats alleviated excitotoxicity, neurobehavioural alterations and partially the bioenergetics. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 29: p. 93-105.
14. Baritaud M, Boujrad H, Lorenzo HK, Krantic S, and Susin SA., 2010, Histone H2AX: The missing link in AIF-mediated caspase-independent programmed necrosis. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 9: p. 3166-3173.
15. Bawa B, and Abbott LC., 2011, Alterations in intracellular calcium ion concentrations in cerebellar granule cells of the CACNA1A mutant mouse, leaner, during postnatal development. *Neurotoxicity research* 19: p. 123-127.
16. Bawa B, and Abbott LC., 2008, Analysis of calcium ion homeostasis and mitochondrial function in cerebellar granule cells of adult CaV 2.1 calcium ion channel mutant mice. *Neurotoxicity research* 13: p. 1-18.
17. Billups B, and Attwell D., 1996, Modulation of non-vesicular glutamate release by pH. *Nature* 379: p. 171-174.
18. Blondeau N, Plamondon H, Richelme C, Heurteaux C, and Lazdunski M., 2000, K(ATP) channel openers, adenosine agonists and epileptic preconditioning are stress signals inducing hippocampal neuroprotection. *Neuroscience* 100: p. 465-474.
19. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, and Lipton SA., 1995, Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: p. 7162-7166.
20. Bortner CD, Hughes FM, Jr., and Cidlowski JA., 1997, A primary role for K⁺ and Na⁺ efflux in the activation of apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 272: p. 32436-32442.
21. Breckenridge DG, Germain M, Mathai JP, Nguyen M, and Shore GC., 2003, Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* 22: p. 8608-8618.
22. Bruno V, Battaglia G, Copani A, Giffard RG, Raciti G, Raffaele R, Shinozaki H, and Nicoletti F., 1995, Activation of class II or III metabotropic glutamate receptors protects cultured cortical neurons against excitotoxic degeneration. *The European journal of neuroscience* 7: p. 1906-1913.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

23. Cathala L, Brickley S, Cull-Candy S, and Farrant M., 2003, Maturation of EPSCs and intrinsic membrane properties enhances precision at a cerebellar synapse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23: p. 6074-6085.
24. Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C, and Perez JM., 2007, Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* 7: p. 3-18.
25. Chatton JY, Idle JR, Vagbo CB, and Magistretti PJ., 2001, Insights into the mechanisms of ifosfamide encephalopathy: drug metabolites have agonistic effects on alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA)/kainate receptors and induce cellular acidification in mouse cortical neurons. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 299: p. 1161-1168.
26. Chen M, Dong Y, and Simard JM., 2003, Functional coupling between sulfonylurea receptor type 1 and a nonselective cation channel in reactive astrocytes from adult rat brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23: p. 8568-8577.
27. Choi DW., 1987, Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 7:p. 369-379.
28. Collin T, Franconville R, Ehrlich BE, and Llano I., 2009, Activation of metabotropic glutamate receptors induces periodic burst firing and concomitant cytosolic Ca²⁺ oscillations in cerebellar interneurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29: p. 9281-9291.
29. Collingridge GL, and Singer W., 1990, Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *Trends in pharmacological sciences* 11: p. 290-296.
30. Contestabile A., 2002, Cerebellar granule cells as a model to study mechanisms of neuronal apoptosis or survival in vivo and in vitro. *Cerebellum (London, England)* 1: p. 41-55.
31. Contestabile A, Fila T, Bartesaghi R, and Ciani E., 2005, Cyclic AMP-mediated regulation of transcription factor Lot1 expression in cerebellar granule cells. *The Journal of biological chemistry* 280: p.33541-33551.
32. Cullen KJ, Yang Z, Schumaker L, and Guo Z., 2007, Mitochondria as a critical target of the chemotherapeutic agent cisplatin in head and neck cancer. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 39: p. 43-50.
33. Custodio JB, Cardoso CM, Santos MS, Almeida LM, Vicente JA, and Fernandes MA., 2009, Cisplatin impairs rat liver mitochondrial functions by inducing changes on membrane ion permeability: prevention by thiol group protecting agents. *Toxicology* 259: p. 18-24.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

34. D'Angelo E., 2012, The Cerebellar Granule Cell. In: Handbook of the cerebellum and cerebellar disorders, edited by Manto M. U. GDL, Schmahmann J. D., Koibuchi N. , Rossi F. . New York Springer, p. 765 - 791.
35. D'Angelo E, Rossi P, Gall D, Prestori F, Nieuws T, Maffei A, and Sola E., 2005, Long-term potentiation of synaptic transmission at the mossy fiber-granule cell relay of cerebellum. *Progress in brain research* 148: p. 69-80.
36. Danial NN, and Korsmeyer SJ. , 2004, Cell death: critical control points. *Cell* 116: p. 205-219.
37. Davare MA, Avdonin V, Hall DD, Peden EM, Burette A, Weinberg RJ, Horne MC, Hoshi T, and Hell JW. , 2001, A beta2 adrenergic receptor signaling complex assembled with the Ca²⁺ channel Cav1.2. *Science (New York, NY)* 293: p. 98-101.
38. Davis SM, Lees KR, Albers GW, Diener HC, Markabi S, Karlsson G, and Norris J. , 2000, Selfotel in acute ischemic stroke : possible neurotoxic effects of an NMDA antagonist. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 31: p. 347-354.
39. Deisseroth K, Mermelstein PG, Xia H, and Tsien RW., 2003, Signaling from synapse to nucleus: the logic behind the mechanisms. *Current opinion in neurobiology* 13: p.354-365.
40. Di Iorio P, Battaglia G, Ciccarelli R, Ballerini P, Giuliani P, Poli A, Nicoletti F, and Caciagli F. , 1996, Interaction between A1 adenosine and class II metabotropic glutamate receptors in the regulation of purine and glutamate release from rat hippocampal slices. *Journal of neurochemistry* 67: p. 302-309.
41. Dong XX, Wang Y, and Qin ZH., 2009, Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta pharmacologica Sinica* 30: p. 379-387.
42. Du Y, Bales KR, Dodel RC, Hamilton-Byrd E, Horn JW, Czilli DL, Simmons LK, Ni B, and Paul SM., 1997, Activation of a caspase 3-related cysteine protease is required for glutamate-mediated apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: p. 11657-11662.
43. Duchen MR., 2012, Mitochondria, calcium-dependent neuronal death and neurodegenerative disease. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 464: p. 111-121.
44. Ducoroy P, Micheau O, Perruche S, Dubrez-Daloz L, de Fornel D, Dutartre P, Saas P, and Solary E., 2003, LF 15-0195 immunosuppressive agent enhances activation-induced T-cell death by facilitating caspase-8 and caspase-10 activation at the DISC level. *Blood* 101: p. 194-201.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

45. Dulbecco R, and Freeman G., 1959, Plaque production by the polyoma virus. *Virology* 8: p.396-397.
46. Duzenli S, Bakuridze K, and Gepdiremen A., 2005, The effects of ruthenium red, dantrolene and nimodipine, alone or in combination, in NMDA induced neurotoxicity of cerebellar granular cell culture of rats. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 19: p. 589-594.
47. Estrada Sanchez AM, Mejia-Toiber J, and Massieu L., 2008, Excitotoxic neuronal death and the pathogenesis of Huntington's disease. *Archives of medical research* 39: p. 265-276.
48. Farrant M, and Nusser Z., 2005, Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci* 6: p. 215-229.
49. Fleming RA., 1997, An overview of cyclophosphamide and ifosfamide pharmacology. *Pharmacotherapy* 17: p. 146S-154S.
50. Forti L, and Pietrobon D., 1993, Functional diversity of L-type calcium channels in rat cerebellar neurons. *Neuron* 10: p. 437-450.
51. Freshney RI. , 2005, *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. Wiley. 800 p.
52. Fung ML., 2000, Role of voltage-gated Na⁺ channels in hypoxia-induced neuronal injuries. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 27: p. 569-574.
53. Gall D, Prestori F, Sola E, D'Errico A, Roussel C, Forti L, Rossi P, and D'Angelo E., 2005, Intracellular calcium regulation by burst discharge determines bidirectional long-term synaptic plasticity at the cerebellum input stage. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25: p. 4813-4822.
54. Garcia-Bereguian MA, Samhan-Arias AK, Martin-Romero FJ, and Gutierrez-Merino C., 2008, Hydrogen sulfide raises cytosolic calcium in neurons through activation of L-type Ca²⁺ channels. *Antioxidants & redox signaling* 10: p. 31-42.
55. Germano A. F. TF., 2001, Strategies For Pharmacological Intervention-Calcium Channel Blocker. In: *Blood-Brain Barrier Permeability Changes after Subarachnoid Haemorrhage: An Update: Clinical Implications, Experimental Findings, Challenges and Future Directions*. New York: Springer, p. 140.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

56. Giraud B, Hebert G, Deroussent A, Veal GJ, Vassal G, and Paci A., 2010, Oxazaphosphorines: new therapeutic strategies for an old class of drugs. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 6: p. 919-938.
57. Greenamyre JT, and Porter RH., 1994, Anatomy and physiology of glutamate in the CNS. *Neurology* 44: p. 7-13.
58. Ha BK, Vicini S, Rogers RC, Bresnahan JC, Burry RW, and Beattie MS., 2002, Kainate-induced excitotoxicity is dependent upon extracellular potassium concentrations that regulate the activity of AMPA/KA type glutamate receptors. *Journal of neurochemistry* 83: p. 934-945.
59. Haider S, Antcliff JF, Proks P, Sansom MS, and Ashcroft FM. , 2005, Focus on Kir6.2: a key component of the ATP-sensitive potassium channel. *Journal of molecular and cellular cardiology* 38: p. 927-936.
60. Hardingham GE. , 2009, Coupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events. *Biochemical Society transactions* 37: p. 1147-1160.
61. Harkany T, Dijkstra IM, Oosterink BJ, Horvath KM, Abraham I, Keijser J, Van der Zee EA, and Luiten PG., 2000, Increased amyloid precursor protein expression and serotonergic sprouting following excitotoxic lesion of the rat magnocellular nucleus basalis: neuroprotection by Ca(2+) antagonist nimodipine. *Neuroscience* 101: p. 101-114.
62. Hell JW, Westenbroek RE, Warner C, Ahljianian MK, Prystay W, Gilbert MM, Snutch TP, and Catterall WA., 1993, Identification and differential subcellular localization of the neuronal class C and class D L-type calcium channel alpha 1 subunits. *The Journal of cell biology* 123: p. 949-962.
63. Herculano-Houzel S, and Lent R., 2005, Isotropic fractionator: a simple, rapid method for the quantification of total cell and neuron numbers in the brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25: p. 2518-2521.
64. Heurteaux C, Bertaina V, Widmann C, and Lazdunski M., 1993, K⁺ channel openers prevent global ischemia-induced expression of c-fos, c-jun, heat shock protein, and amyloid beta-protein precursor genes and neuronal death in rat hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: p. 9431-9435.
65. Hivert B, Luvisetto S, Navangione A, Tottene A, and Pietrobon D., 1999, Anomalous L-type calcium channels of rat spinal motoneurons. *The Journal of general physiology* 113: p. 679-694.
66. Honig LS, and Rosenberg RN., 2000, Apoptosis and neurologic disease. *The American journal of medicine* 108: p. 317-330.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

67. Jabaudon D, Scanziani M, Gahwiler BH, and Gerber U., 2000, Acute decrease in net glutamate uptake during energy deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: p. 5610-5615.
68. Jiang C, Xia Y, and Haddad GG., 1992, Role of ATP-sensitive K⁺ channels during anoxia: major differences between rat (newborn and adult) and turtle neurons. *The Journal of physiology* 448: p. 599-612.
69. Jing Zhang QTaS-FZ., 2006, *Clinical Pharmacology of Cyclophosphamide and Ifosfamide. Current Drug Therapy* p. 55-84.
70. Kalia LV, Kalia SK, and Salter MW., 2008, NMDA receptors in clinical neurology: excitatory times ahead. *Lancet neurology* 7: p. 742-755.
71. Kane GC, Liu XK, Yamada S, Olson TM, and Terzic A., 2005, Cardiac KATP channels in health and disease. *Journal of molecular and cellular cardiology* 38: p. 937-943.
72. Karschin C, Ecke C, Ashcroft FM, and Karschin A., 1997, Overlapping distribution of K(ATP) channel-forming Kir6.2 subunit and the sulfonylurea receptor SUR1 in rodent brain. *FEBS letters* 401: p. 59-64.
73. Kauer JA, Malenka RC, and Nicoll RA., 1988, NMDA application potentiates synaptic transmission in the hippocampus. *Nature* 334: p. 250-252.
74. Kaufmann T, Strasser A, and Jost PJ., 2012, Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. *Cell death and differentiation* 19: p. 42-50.
75. Koschak A, Obermair GJ, Pivotto F, Sinnegger-Brauns MJ, Striessnig J, and Pietrobon D., 2007, Molecular nature of anomalous L-type calcium channels in mouse cerebellar granule cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27: p. 3855-3863.
76. Küpfer A, Aeschlimann C, Wermuth B, and Cerny T., 1994, Prophylaxis and reversal of ifosfamide encephalopathy with methylene-blue. *The Lancet* 343: p. 763-764.
77. Lalier L, Cartron PF, Juin P, Nedelkina S, Manon S, Bechinger B, and Vallette FM., 2007, Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 12: p. 887-896.
78. Lan JY, Skeberdis VA, Jover T, Zheng X, Bennett MV, and Zukin RS., 2001, Activation of metabotropic glutamate receptor 1 accelerates NMDA receptor trafficking. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21: p. 6058-6068.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

79. Lauritzen I, De Weille JR, and Lazdunski M., 1997, The potassium channel opener (-)-cromakalim prevents glutamate-induced cell death in hippocampal neurons. *Journal of neurochemistry* 69: p. 1570-1579.
80. Lauterburg BH, Nguyen T, Hartmann B, Junker E, Kupfer A, and Cerny T., 1994, Depletion of total cysteine, glutathione, and homocysteine in plasma by ifosfamide/mesna therapy. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 35: p. 132-136.
81. Lees KR, Asplund K, Carolei A, Davis SM, Diener HC, Kaste M, Orgogozo JM, and Whitehead J., 2000, Glycine antagonist (gavestinel) in neuroprotection (GAIN International) in patients with acute stroke: a randomised controlled trial. GAIN International Investigators. *Lancet* 355: p. 1949-1954.
82. Leslie Iversen SI, Floyd Bloom & Robert Roth., 2009, *Introduction to Neuropsychopharmacology*. Oxford: Oxford University Press, p. 85-127.
83. Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, and Stamler JS., 1993, A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364: p. 626-632.
84. Lipton SA, and Rosenberg PA., 1994, Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *The New England journal of medicine* 330: p. 613-622.
85. Liss B, and Roeper J., 2001, Molecular physiology of neuronal K-ATP channels (review). *Molecular membrane biology* 18: p. 117-127.
86. Liu X, Kim CN, Pohl J, and Wang X., 1996, Purification and characterization of an interleukin-1beta-converting enzyme family protease that activates cysteine protease P32 (CPP32). *The Journal of biological chemistry* 271: 13371-13376.
87. Manto M, and De Zeeuw CI., 2012, Diversity and complexity of roles of granule cells in the cerebellar cortex. Editorial. *Cerebellum (London, England)* 11: p. 1-4.
88. Marklund L, Andersson B, Behnam-Motlagh P, Sandstrom PE, Henriksson R, and Grankvist K., 2004, Cellular potassium ion deprivation enhances apoptosis induced by cisplatin. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 94: p. 245-251.
89. Mathie A, Clarke CE, Ranatunga KM, and Veale EL., 2003, What are the roles of the many different types of potassium channel expressed in cerebellar granule cells? *Cerebellum (London, England)* 2: p. 11-25.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

90. Mattson MP., 2003, Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders. *Neuromolecular medicine* 3: p. 65-94.
91. Mattsson P, Aldskogius H, and Svensson M., 1999, Nimodipine-induced improved survival rate of facial motor neurons following intracranial transection of the facial nerve in the adult rat. *Journal of neurosurgery* 90: p. 760-765.
92. McEntee WJ, and Crook TH., 1993, Glutamate: its role in learning, memory, and the aging brain. *Psychopharmacology* 111: p. 391-401.
93. Miki T, Liss B, Minami K, Shiuchi T, Saraya A, Kashima Y, Horiuchi M, Ashcroft F, Minokoshi Y, Roeper J, and Seino S., 2001, ATP-sensitive K⁺ channels in the hypothalamus are essential for the maintenance of glucose homeostasis. *Nature neuroscience* 4: p. 507-512.
94. Miki T, and Seino S., 2005, Roles of KATP channels as metabolic sensors in acute metabolic changes. *Journal of molecular and cellular cardiology* 38: p. 917-925.
95. Monti B, Marri L, and Contestabile A., 2002, NMDA receptor-dependent CREB activation in survival of cerebellar granule cells during in vivo and in vitro development. *The European journal of neuroscience* 16: p. 1490-1498.
96. Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, and Seeburg PH., 1994, Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12: p. 529-540.
97. Mosmann T., 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* 65: 55-63.
98. Moulton PR., 2009, Neuronal glutamate and GABA_A receptor function in health and disease. *Biochemical Society transactions* 37: p. 1317-1322.
99. Nakanishi S, and Okazawa M., 2006, Membrane potential-regulated Ca²⁺ signalling in development and maturation of mammalian cerebellar granule cells. *The Journal of physiology* 575: p. 389-395.
100. Nicholls DG., 2004, Mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity studied in primary neuronal cultures. *Current molecular medicine* 4: p. 149-177.
101. Nicholls DG, and Ward MW., 2000, Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: mortality and millivolts. *Trends in neurosciences* 23: p. 166-174.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

102. Northington FJ, Graham EM, and Martin LJ., 2005, Apoptosis in perinatal hypoxic–ischemic brain injury: How important is it and should it be inhibited? *Brain Research Reviews* 50: p. 244-257.
103. Obermair GJ, Szabo Z, Bourinet E, and Flucher BE., 2004, Differential targeting of the L-type Ca²⁺ channel alpha 1C (CaV1.2) to synaptic and extrasynaptic compartments in hippocampal neurons. *The European journal of neuroscience* 19: p. 2109-2122.
104. Parri HR, and Lansman JB., 1996, Multiple components of Ca²⁺ channel facilitation in cerebellar granule cells: expression of facilitation during development in culture. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16:p. 4890-4902.
105. Penn RD, and Loewenstein WR., 1966, Uncoupling of a nerve cell membrane junction by calcium-ion removal. *Science (New York, NY)* 151: p. 88-89.
106. Pinheiro PS, and Mulle C., 2008, Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanisms of action. *Nat Rev Neurosci* 9: p. 423-436.
107. Price PM, Safirstein RL, and Megyesi J., 2004, Protection of renal cells from cisplatin toxicity by cell cycle inhibitors. *American journal of physiology Renal physiology* 286: p. F378-384.
108. Ramirez-Camacho R, Garcia-Berrocal JR, Trinidad A, Verdaguer JM, and Nevado J., 2008, Blebs in inner and outer hair cells: a pathophysiological hypothesis. *The Journal of laryngology and otology* 122: p. 1151-1155.
109. Randall A, and Tsien RW., 1995, Pharmacological dissection of multiple types of Ca²⁺ channel currents in rat cerebellar granule neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15: p. 2995-3012.
110. Rebillard A, Lagadic-Gossmann D, and Dimanche-Boitrel MT., 2008, Cisplatin cytotoxicity: DNA and plasma membrane targets. *Current medicinal chemistry* 15: p. 2656-2663.
111. Rzeski W, Pruskil S, Macke A, Felderhoff-Mueser U, Reiher AK, Hoerster F, Jansma C, Jarosz B, Stefovska V, Bittigau P, and Ikonomidou C., 2004, Anticancer agents are potent neurotoxins in vitro and in vivo. *Annals of neurology* 56: p. 351-360.
112. Sancho-Martinez SM, Piedrafita FJ, Cannata-Andia JB, Lopez-Novoa JM, and Lopez-Hernandez FJ., 2011, Necrotic concentrations of cisplatin activate the apoptotic machinery but inhibit effector caspases and interfere with the execution of apoptosis. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 122: p. 73-85.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

113. Sancho-Martinez SM, Prieto-Garcia L, Prieto M, Lopez-Novoa JM, and Lopez-Hernandez FJ., 2012, Subcellular targets of cisplatin cytotoxicity: an integrated view. *Pharmacology & therapeutics* 136: p. 35-55.
114. Santandreu FM, Roca P, and Oliver J., 2010, Uncoupling protein-2 knockdown mediates the cytotoxic effects of cisplatin. *Free radical biology & medicine* 49: p. 658-666.
115. Saris CP, van de Vaart PJ, Rietbroek RC, and Blommaert FA., 1996, In vitro formation of DNA adducts by cisplatin, lobaplatin and oxaliplatin in calf thymus DNA in solution and in cultured human cells. *Carcinogenesis* 17: p. 2763-2769.
116. Sato K, Kusaka Y, Chiba Y, and Okada K., 2001, Effect of platinum coordination complex (PtCx) on citrate uptake by rat renal brush border membrane vesicles (BBMV): cisplatin-intoxicated rats. *Industrial health* 39: p. 317-321.
117. Sato M, Suzuki K, Yamazaki H, and Nakanishi S., 2005, A pivotal role of calcineurin signaling in development and maturation of postnatal cerebellar granule cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: p. 5874-5879.
118. Schwappach B, Zerangue N, Jan YN, and Jan LY., 2000, Molecular basis for K(ATP) assembly: transmembrane interactions mediate association of a K⁺ channel with an ABC transporter. *Neuron* 26: p. 155-167.
119. Segui B, and Legembre P. , 2010, Redistribution of CD95 into the lipid rafts to treat cancer cells? *Recent patents on anti-cancer drug discovery* 5: p. 22-28.
120. Simard JM, Woo SK, Schwartzbauer GT, and Gerzanich V., 2012, Sulfonylurea receptor 1 in central nervous system injury: a focused review. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 32: p. 1699-1717.
121. Simon RP, Griffiths T, Evans MC, Swan JH, and Meldrum BS., 1984, Calcium overload in selectively vulnerable neurons of the hippocampus during and after ischemia: an electron microscopy study in the rat. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 4: p. 350-361.
122. Sinnegger-Brauns MJ, Hetzenauer A, Huber IG, Renstrom E, Wietzorrek G, Berjukov S, Cavalli M, Walter D, Koschak A, Waldschutz R, Hering S, Bova S, Rorsman P, Pongs O, Singewald N, and Striessnig JJ., 2004, Isoform-specific regulation of mood behavior and pancreatic beta cell and cardiovascular function by L-type Ca²⁺ channels. *The Journal of clinical investigation* 113: p. 1430-1439.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

123. Sorenson CM, and Eastman A., 1988, Mechanism of cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced cytotoxicity: role of G2 arrest and DNA double-strand breaks. *Cancer research* 48: p. 4484-4488.
124. Soundarapandian MM, Zhong X, Peng L, Wu D, and Lu Y., 2007, Role of K(ATP) channels in protection against neuronal excitatory insults. *Journal of neurochemistry* 103: p. 1721-1729.
125. Srinivasula SM, Fernandes-Alnemri T, Zangrilli J, Robertson N, Armstrong RC, Wang L, Trapani JA, Tomaselli KJ, Litwack G, and Alnemri ES., 1996, The Ced-3/interleukin 1beta converting enzyme-like homolog Mch6 and the lamin-cleaving enzyme Mch2alpha are substrates for the apoptotic mediator CPP32. *The Journal of biological chemistry* 271: p. 27099-27106.
126. Sullivan PG, Rabchevsky AG, Waldmeier PC, and Springer JE., 2005, Mitochondrial permeability transition in CNS trauma: cause or effect of neuronal cell death? *Journal of neuroscience research* 79: p. 231-239.
127. Sun XL, Zeng XN, Zhou F, Dai CP, Ding JH, and Hu G., 2008, KATP channel openers facilitate glutamate uptake by GluTs in rat primary cultured astrocytes. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 33: p. 1336-1342.
128. Szatkowski M, and Attwell D., 1994, Triggering and execution of neuronal death in brain ischaemia: two phases of glutamate release by different mechanisms. *Trends in neurosciences* 17: p. 359-365.
129. Szydlowska K, and Tymianski M., 2010, Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell calcium* 47: p. 122-129.
130. Teshima Y, Akao M, Li RA, Chong TH, Baumgartner WA, Johnston MV, and Marban E., 2003, Mitochondrial ATP-sensitive potassium channel activation protects cerebellar granule neurons from apoptosis induced by oxidative stress. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 34: p. 1796-1802.
131. Toulorge D, Guerreiro S, Hirsch EC, and Michel PP., 2010, KATP channel blockade protects midbrain dopamine neurons by repressing a glia-to-neuron signaling cascade that ultimately disrupts mitochondrial calcium homeostasis. *Journal of neurochemistry* 114: p. 553-564.
132. Tymianski M, and Tator CH., 1996, Normal and abnormal calcium homeostasis in neurons: a basis for the pathophysiology of traumatic and ischemic central nervous system injury. *Neurosurgery* 38: p. 1176-1195.
133. Uchida S, Yamada S, Nagai K, Deguchi Y, and Kimura R., 1997, Brain pharmacokinetics and in vivo receptor binding of 1,4-dihydropyridine calcium channel antagonists. *Life sciences* 61: p. 2083-2090.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

134. Verhagen AM, and Vaux DL., 2002, Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 7: p. 163-166.
135. Verkhatsky A, and Toescu EC., 2003, Endoplasmic reticulum Ca(2+) homeostasis and neuronal death. *Journal of cellular and molecular medicine* 7: p. 351-361.
136. Visarius TM, Bahler H, Kupfer A, Cerny T, and Lauterburg BH., 1998, Thiodiglycolic acid is excreted by humans receiving ifosfamide and inhibits mitochondrial function in rats. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 26: p. 193-196.
137. Visarius TM, Stucki JW, and Lauterburg BH., 1999, Inhibition and stimulation of long-chain fatty acid oxidation by chloroacetaldehyde and methylene blue in rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 289: p. 820-824.
138. Wang X, Olberding KE, White C, and Li C., 2011, Bcl-2 proteins regulate ER membrane permeability to luminal proteins during ER stress-induced apoptosis. *Cell death and differentiation* 18: p. 38-47.
139. Wang Y, and Qin ZH., 2010, Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 15: p. 1382-1402.
140. Weiss JH, Pike CJ, and Cotman CW., 1994, Ca²⁺ channel blockers attenuate beta-amyloid peptide toxicity to cortical neurons in culture. *Journal of neurochemistry* 62: p. 372-375.
141. Wick A, Wick W, Hirrlinger J, Gerhardt E, Dringen R, Dichgans J, Weller M, and Schulz JB., 2004, Chemotherapy-induced cell death in primary cerebellar granule neurons but not in astrocytes: in vitro paradigm of differential neurotoxicity. *Journal of neurochemistry* 91: p. 1067-1074.
142. Wu J, Hu J, Chen YP, Takeo T, Suga S, Dechon J, Liu Q, Yang KC, St John PA, Hu G, Wang H, and Wakui M., 2006, Iptakalim modulates ATP-sensitive K(+) channels in dopamine neurons from rat substantia nigra pars compacta. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 319: p. 155-164.
143. Xia Y, and Haddad GG., 1991, Major differences in CNS sulfonylurea receptor distribution between the rat (newborn, adult) and turtle. *The Journal of comparative neurology* 314: p. 278-289.
144. Xie J, Duan L, Qian X, Huang X, Ding J, and Hu G., 2010, K(ATP) channel openers protect mesencephalic neurons against MPP⁺-induced cytotoxicity via inhibition of ROS production. *Journal of neuroscience research* 88: p. 428-437.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

145. Yamauchi M, Omote K, and Ninomiya T., 1998, Direct evidence for the role of nitric oxide on the glutamate-induced neuronal death in cultured cortical neurons. *Brain research* 780: p. 253-259.
146. Yu SP., 2003, Regulation and critical role of potassium homeostasis in apoptosis. *Progress in neurobiology* 70: p. 363-386.
147. Zhong J, Deng J, Huang S, Yang X, and Lee WH., 2004, High K⁺ and IGF-1 protect cerebellar granule neurons via distinct signaling pathways. *Journal of neuroscience research* 75: p. 794-806.
148. <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-equipment/laminar-flow-hood.html> (2013. 28. 05)

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Çiğdem Çengelli
Doğum tarihi ve yeri : 05.01.1986, Eskişehir
Uyruğu : T.C.
Medeni durumu : Bekar
İletişim adresleri : cigdemcengelli@gmail.com
ccengelli@ogu.edu.tr

Eğitim Durumu:

Eskişehir Fatih Anadolu Lisesi 1996-2004
İstanbul Koç Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya ve Biyoloji Müh.
Bölümü Lisans Eğitimi 2004-2009

Yabancı Dil:

İngilizce

Yayımlar:

6th. European Congress of Pharmacology EPHAR (2012)

1. Effects of resveratrol on 4-vinylcyclohexene diepoxide induced testicular germ cell toxicity in mice ((Erol, K., Özatik F. Y., Özatik O., Yiğitaslan S., Çengelli Ç.) (Poster Bildiri)
 2. Estrogenic effects of quercetin in rats (Yiğitaslan S., Erol, K., Özatik F. Y., Özatik O., Çengelli Ç.) (Poster Bildiri)
 3. Evaluation of cisplatin neurotoxicity in cultured rat dorsal root ganglia via cytosolic calcium accumulation (K Erol, S Yiğitaslan, C Cengelli, E Yıldırım, B Kaygısız) (Poster Bildiri)
21. Ulusal Farmakoloji Kongresi (2011)
P-glikoprotein aktivasyonu ve inhibisyonunun takrolimusun intestinal absorpsiyonuna etkisi (Yiğitaslan S., Erol, K., Çengelli Ç.) (Poster Bildiri)

Bilimsel Etkinlikler

Katılan kurslar ve eğitim

Programları :

1. II. Hücre Ölümü Araştırma Teknikleri Teorik Kursu, Eskişehir 2012
2. I. International Certificate Program on Predictive, Personalized, Medicine/Healthcare In Daily Modern Medicine and Pharmacy (P4), Anadolu Üniversitesi Eskişehir 2012
3. I. Uludağ Şok Toplantısı kapsamında yer alan “Deneysel Şok Modelleri Kursu” Uludağ Üniversitesi, Bursa 2011
4. 10. Ulusal Sinirbilim Kongresi kapsamında “Nöroglia” kursu, Yeditepe Üniversitesi İstanbul, 2011
5. Tıbbi ve Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi (TİCAM) “Deney Hayvanları Kullanımı ile İlgili Eğitim Programı” Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir 2010