

T.C.
OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

115041

**GLUTAMAT TOKSİSİTESİ OLUŞTURULMUŞ GLİOMA HÜCRE
DİZİLERİNDE $MgSO_4$ VE LAZAROİD U-83836E’NİN HÜCRE
YAŞAM ORANINA ETKİSİ**

115041

DOKTORA TEZİ

SELDA KABADERE

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DURUMAN TACI ON MERKEZİ**

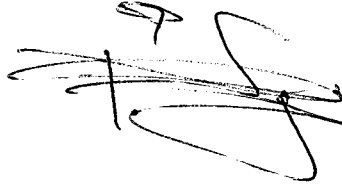
Danışman: Prof. Dr. Ruhi Uyar

HAZİRAN 2002

KABUL VE ONAY SAYFASI

Selda KABADERE'nin Doktora Tezi olarak hazırladığı "glutamat toksisitesi oluşturulmuş glioma hücre dizilerinde mgso₄ ve lazaroid u-83836'nin hücre yaşam oranına etkisi" başlıklı bu çalışma, jürimiz Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ruhi UYAR
ÜYE



Prof. Dr. Gönül Ö. PEKER
ÜYE



Prof. Dr. Neş'e TUNÇEL
ÜYE



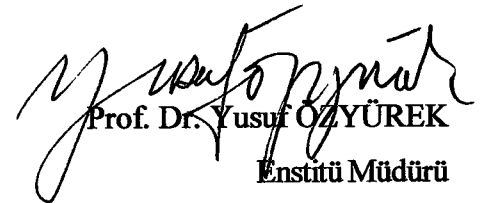
Prof. Dr. Kasım ÖZLÜK
ÜYE



Doç. Dr. Kubilay UZUNER
ÜYE



Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 20/06/2020
gün ve 549/1514 sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Yusuf ÖZYÜREK
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
ÖZET	iii
SUMMARY	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	x
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. GLİA HÜCRELERİ	3
2.2. GLUTAMAT	4
2.2.1. Glutamat ve reseptörleri	5
2.2.2. Glutamat sentezi	8
2.2.3. Astrositlerin glutamat alması	8
2.2.4. Glutamatın neden olduğu astroglial hücre şişmesi	10
2.2.5. Nörolojik fonksiyon bozukluğunda astrositler ve glutamat	12
2.2.6. Glioma hücrelerinde glutamat toksisitesi	14
2.3. GLİA HÜCRELERİNDE KALSİYUM DENGESİ	15
2.4. BEDENDE MAGNEZYUM DENGESİ	20
2.5. BEYİNDE TRAVMA SONRASI MAGNEZYUM	24
2.6. LAZAROİDLER	25
2.7. HÜCRE ÖLÜMÜ	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM	27

3.1. HÜCRELERİN ÜRETİLMESİ	27
3.1.2. İnsan glioblastoma multiforme hücrelerinin üretilmesi	27
3.2. HÜCRELERİN DENEYE ALINMASI	28
3.2.1. İlaçların hazırlanması ve MTT yöntemi	28
3.2.2. C6 ve insan glioma hücrelerinde kalsiyum ve magnezyum denemeleri	29
4. BULGULAR	31
4.1. IC ₅₀ DEĞERLERİ	33
4.2. MgSO ₄ DEĞERLERİ	37
4.3. U-83836E DEĞERLERİ	40
4.1. KALSİYUM VE MAGNEZYUM VERİLERİ	42
4.1.1. C6 glioma hücrelerinde kalsiyum ve magnezyum verileri	42
4.1.2. Birinci hastaya ait insan glioma hücrelerinde kalsiyum ve magnezyum verileri	45
4.1.3. İkinci hastaya ait insan glioma hücrelerinde kalsiyum ve magnezyum verileri	47
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	50
KAYNAKLAR DİZİNİ	56
ÖZGEÇMİŞ	65

ÖZET

L-glutamat merkezi sinir sisteminde ana uyarıcı nörotransmitter olmasına ek olarak aynı zamanda önemli bir nörotoksin ve glial toksindir. Hücre dışı ortamda glutamatın artması nöronlarda ölüme neden olduğu gibi astroglial hücrelerin şişmesine ve ardından parçalanmasına öncülük ederek bir dizi yıkıcı olayları başlatır. Nörodejeneratif hastalıklar sonrası, nöronların yaşamını sürdürmesi ve iyileşmesinde astrositlerin rolü giderek önem kazanmaktadır. Bir kez hasar oluşunca astrosit fonksiyonlarındaki azalma, merkezi sinir sistemindeki daha ileri kayıplara katılabilir. Bu nedenle astrosit yaşamının uzamasının daha ileri bir nöron korumaya olanak sağlayacağı düşünülmektedir.

Lazaroidler (21 aminosteroidler) lipid peroksidasyon inhibitörü olarak geliştirilen antioksidan ilaçlardır. Özellikle travma, subaraknoid hemoraji ve iskemiye maruz kalmış beyin dokusunda güçlü bir antioksidan kapasitelerinin olduğu gösterilmiştir. Yine MgSO₄'ün iskemi ve travma nedeniyle oluşan nöronal hasarı önlediği gösterilmiştir. Glial hücrelerde Mg'un ve lazaroidlerin glutamat toksisitesi üzerindeki etkisini gösteren herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Sıçan glioma hücre dizisinden elde edilen C6 hücreler, glia hücre özellik ve fonksiyonlarının tanımlanmasında kullanılmaktadır. C6 hücreleri ve iki adet insana ait glioblastoma multiforme hücreleri % 5 CO₂, 37 °C ve % 100 nem içeren inkübatörde çoğaltıldı. Öncelikle hücreler üzerinde L-glutamatın % 50 öldürücü dozu belirlendi. Elde edilen dozda L-glutamat 24 saat süreyle uygulandı ve ardından uzaklaştırılarak, MgSO₄ veya U-83836E dozları besiyerine eklendi. 24 saat sonra hücrelerin yaşama oranlarını gösteren 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue (MTT) testi uygulandı. Elde edilen veriler tek yönlü varyans analizi ve ardından Tukey'in çok yönlü karşılaştırma testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

Ayrıca L-glutamat ile birlikte ve ardından Ca²⁺ içermeyen besiyeri, inositol trifosfat (IP₃) kapılı kalsiyum kanallarını bloklayan heparin, hücre dışındaki Ca²⁺'u tutan

etilen diamin tetra asetikasit (EDTA), 10 veya 50 mM CaCl₂ kullanılarak L-glutamat toksisitesinde Ca²⁺ iyonlarının rolü ortaya konmaya çalışıldı. Yine L-glutamat ile birlikte ardından Mg²⁺ bulunmayan besiyeri ve 2, 5, 10, 50 veya 100 mM MgSO₄ kullanılarak, eksitotoksisitede Mg²⁺ iyonlarının rolü araştırıldı.

C6 ve insan glioma hücrelerinde sırasıyla 0.01 mM MgSO₄'ün % 17, % 15 ve % 5; 1 µM U-83836E'nin % 12, % 13 ve % 4.9 oranında hücre yaşam oranında artışa neden olduğu ortaya kondu. Üç hücrenin canlı hücre yoğunluğunda, Ca²⁺'suz besiyeri grubunda % 23, 17 ve 21, EDTA grubunda % 44, 30 ve 34, heparin grubunda %23, % 10 ve % 17, 10 mM CaCl₂ grubunda % 34, % 17 ve % 22, 50 mM CaCl₂ grubunda % 44, % 24 ve % 27 oranında azalma görüldü. Mg²⁺'suz besiyeri grubunda ise canlı hücre miktarında % 13, % 20 ve % 18'lik bir azalma belirlendi. Sadece 2 mM MgSO₄ hafif bir koruma sağlarken, besiyerine MgSO₄ 'ün artan dozlarda eklenmesi ise toksisiteyi daha da arttırdı.

Sonuç olarak, MgSO₄ ve U-83836E glutamatın neden olduğu hücre ölümünü tam olarak engelleyememesine rağmen, verilerimiz Mg²⁺ iyonları ve serbest radikal oluşumunun olayda küçük de olsa rolü olduğunu önermektedir. Oysa L-glutamat toksisitesi ile Ca²⁺ iyonları arasında doğrudan bir ilişki kurulamamıştır.

Anahtar kelimeler: L-glutamat, MgSO₄, lazaroid U-83836E, glioma, hücre çoğalması.

SUMMARY

L-glutamate is the major excitatory neurotransmitter as well as an important neurotoxin and gliotoxin in the central nervous system (CNS). Elevated extracellular L-glutamate levels have been shown to change astrocytic volume. Furthermore, L-glutamate induces a sequence of degenerative events that leads to the lysis of the cultured astrocytes. The role of astrocytes in promoting neuronal survival and recovery following cerebral insult is becoming increasingly appreciated. Once damaged, the resulting reductions in astrocyte function may further contribute to CNS losses. In concert with improving astrocyte survival, advanced neuroprotection would be expected.

The 21-aminosteroids, or lazaroids, are potent inhibitors of lipid peroxidation in neural tissue and have been developed for the acute treatment of CNS injury, ischemia or subarachnoid hemorrhage. It has been shown that MgSO₄ also improves neuronal injury after ischemia and trauma. The possible effect of MgSO₄ and lazaroids on glutamate toxicity on glial cells has not been studied yet.

C6 rat glioma and human glioblastoma multiforme cells were grown in an incubator atmosphere of 5 % CO₂, 37 °C and 100 % humidity. First, the determined IC₅₀ value of L-glutamate was given for 24 hours and removed, and then MgSO₄ or U-83836E doses were added to the culture medium. After 24 hours 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue (MTT) test was done. For the statistical analysis one-way ANOVA following Tukey's multiple comparison tests were used.

In addition we have tried to show the role of Ca²⁺ on L-glutamate toxicity by using Ca²⁺ free medium, heparin which blocks inositol triphosphate (IP₃) gated calcium channels, ethilendiamine tetraaceticacid (EDTA) which blocks extracellular Ca²⁺, 10 mM or 50 mM CaCl₂. We have also attempted to show the role of Mg²⁺ ions by using Mg²⁺ free medium, 2, 5, 10, 50 or 100 mM MgSO₄.

We have found that MgSO_4 at the dose of 0.01 mM increased C6 and human glioma cell growth by 17, 15 and 5 %, respectively. At the dose of 1 μM U-83836E also increased C6 and human glioma cell growth by 12, 13 and 4.9 %, respectively. The medium used without Ca^{2+} decreased the survival of C6 and two human glioma by 23, 17 and 21 %, respectively. EDTA decreased the cell survival of C6 and two human glioma by 44, 30 and 34 %, respectively. The heparin caused a decrease of the survival of C6 and two human glioma cell by 23, 10 and 17 %, respectively. 10 and 50 mM CaCl_2 decreased the cell survival of C6 and two human glioma cells by 34, 17 and 22 %, and by 44, 24 and 27 %, respectively. It is found that Mg^{2+} free medium declined the cell survival of the three sources by 13, 20 and 18 %, respectively. Although MgSO_4 at the dose of 2 mM slightly increased the cell survival, addition of increased amount of MgSO_4 to the cultures increased the toxicity.

In conclusion, although MgSO_4 and U-83836E do not strongly block glutamate-induced cell death, it is suggested that Mg^{2+} ions and free radical production may have a small role. It is also suggested that L-glutamate toxicity does not related directly with Ca^{2+} ions.

Key words: L-glutamate, MgSO_4 , lazardoid U-83836E, glioma, cell proliferation.

ŞEKİLLER DİZİNİ

2.1. Nöron ve astrositlerdeki glutamat sentezi	9
2.2 Glutamat-glutamin mekiği	10
2.3. Nöronda eksitotoksik hasar mekanizması	19
4.1. GFAP (+) insan glioblastoma multiforme hücrelerinin genel görüntüsü	31
4.2. C6 sıçan glioma hücre serisinin genel görüntüsü	31
4.3. Birinci hastaya ait insan glioblastoma multiforme hücrelerinin genel görüntüsü	32
4.4 İkinci hastaya ait insan glioblastoma multiforme hücrelerinin genel görüntüsü	32
4.5. C6 hücrelerinde 10-20 mM arası dozlardaki L-glutamatın hücre yaşam oranına etkisi	33
4.6. Birinci hastaya ait insan hücrelerinde 15-25 mM arası dozlardaki L-glutamatın hücre yaşam oranına etkisi	34
4.7. İkinci hastaya ait insan hücrelerinde 15-25 mM arası dozlardaki L-glutamatın hücre yaşam oranına etkisi	34
4.8. C6, birinci ve ikinci hastaya ait insan glioma hücrelerinin yaşam oranı üzerinde MgSO ₄ 'ın etkisi	35
4.9. C6, birinci ve ikinci hastaya ait insan glioma hücrelerinin yaşam oranı üzerinde U-83836E'nin etkisi	36

- 4.10. 16 mM L-glutamat uygulamasının ardından verilen üç dozdaki $MgSO_4$ 'ün C6 hücre yaşam oranı üzerindeki etkisi 37
- 4.11. 21 mM L-glutamat uygulamasının ardından verilen üç dozdaki $MgSO_4$ 'ün birinci hastaya ait glioma hücre yaşam oranı üzerindeki etkisi 38
- 4.12. 20 mM L-glutamat uygulamasının ardından verilen üç dozdaki $MgSO_4$ 'ün ikinci hastaya ait glioma hücre yaşam oranı üzerindeki etkisi 39
- 4.13. 16 mM L-glutamat uygulamasının ardından verilen iki dozdaki U-83836E'nin C6 hücre yaşam oranı üzerindeki etkisi 40
- 4.14. 21 mM L-glutamat uygulamasının ardından verilen iki dozdaki U-83836E'nin birinci hastaya ait glioma hücre yaşam oranı üzerindeki etkisi 41
- 4.15. 20 mM L-glutamat uygulamasının ardından verilen iki dozdaki U-83836E'nin ikinci hastaya ait glioma hücre yaşam oranı üzerindeki etkisi 42
- 4.16. Önce 24 saat 16 mM L-glutamat+EDTA, L-glutamat+ heparin, L-glutamat + Ca^{2+} 'suz besi yeri, L-glutamat+10 mM Ca^{2+} veya L-glutamat +50 mM Ca^{2+} uygulanan, ardından 24 saatlik iyileşme döneminde sadece Ca'suz besiyeri, EDTA, heparin, 10 mM Ca veya 50 mM Ca verilen gruplardaki C6 hücre yaşam oranları 43
- 4.17. Önce 24 saat 16 mM L-glutamat+ 2, 5, 10, 50 veya 100 mM $MgSO_4$, ardından L-glutamati uzaklaştırılmış $MgSO_4$ dozları uygulanmış C6 glioma hücrelerinin yaşam oranları 44

- 4.18. Önce 24 saat süreyle 21 mM L-glutamat+Ca'suz besiyeri, 21 mM L-glutamat+ EDTA, 21 mM L-glutamat + heparin, 21 mM L-glutamat + 10 mM Ca²⁺ veya 21 mM L-glutamat+ 50 mM Ca²⁺ uygulanan, ardından iyileşme döneminde sadece L-glutamati uzaklaştırılarak, Ca²⁺'suz besiyeri , EDTA, heparin, 10 mM Ca²⁺ veya 50 mM Ca²⁺ uygulanan gruplardaki birinci hastaya ait glioma hücre yaşam oranı 45
- 4.19. Önce 24 saat 16 mM L-glutamat+ 2, 5, 10, 50 veya 100 mM MgSO₄, ardından L- glutamati uzaklaştırılmış MgSO₄ dozları uygulanmış birinci hastaya ait glioma hücrelerinin yaşam oranları 46
- 4.20. Önce 24 saat süreyle 20 mM L-glutamat + Ca'suz besiyeri, 21 mM L-glutamat+ EDTA, 21 mM L-glutamat + heparin, 21 mM L-glutamat + 10 mM Ca²⁺ veya 21 mM L-glutamat + 50 mM Ca²⁺ uygulanan, ardından iyileşme döneminde sadece L-glutamati uzaklaştırılarak, Ca²⁺'suz besiyeri , EDTA, heparin, 10 mM Ca²⁺ veya 50 mM Ca²⁺ uygulanan gruplardaki ikinci hastaya ait glioma hücre yaşam oranı 47
- 4.21. Önce 24 saat 20 mM L-glutamat + 2, 5, 10, 50 veya 100 mM MgSO₄, ardından L-glutamati uzaklaştırılmış MgSO₄ dozları uygulanmış ikinci hastaya ait glioma hücrelerinin yaşam oranları 48

TABLÖLAR DİZİNİ

2.1. Glutamat reseptör alt gruplarının özellikleri	7
4.1. Tüm deneylerin sonucunda elde edilen absorpsiyon cinsinden rakamsal veriler	49



SİMGE VE KISALTMALAR

KISALTMALAR

iGluR

mGluR

MgSO₄

cAMP

cGMP

IC₅₀

α -amino-3-hidroksi-5-metil-
isoksazol-4-propionik asit

N-Metil-D-Aspartat

GABA

TCA

GSH

GFAP

IP₃

Casr

U-8383

DMEM

F-12

DMSO

PBS

AÇIKLAMALAR

İyonotropik glutamat reseptörleri

Metabotropik glutamat reseptörleri

Magnezyum sülfat

Döngüsel Adenozin Mono Fosfat

Döngüsel Guanozin Mono Fosfat

% 50 inhibitör konsantrasyon

AMPA

NMDA

γ amino bütirik asit

Trikarboksilik asit

Glutasyon

Glial fibriller asidik protein

İnositoltrifosfat

Ca²⁺/Mg²⁺ a duyarlı reseptör

[(-)-2-[[4-(2,6-di-1-pyrrolidinyl-
4-pyrimidinyl)-1-piperazinyl]-
methyl]- 3,4-dihydro-2,5,7,8-
tetramethyl-2H-1-benzopyran-6-
ol(dihydrochloride)]

Dulbecco's Modified Eagle's Medium

F-12 HAM Nutrient mixture

Dimetil sülfoksit

Fosfat tampon çözeltisi

EDTA	Etilendiamintetra asetik asit
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue
LDH	Laktat dehidrojenaz



1. GİRİŞ VE AMAÇ

L-glutamat merkezi sinir sisteminde ana uyarıcı nörotransmitter olmasına ek olarak aynı zamanda önemli bir nörotoksindir. Epilepsi, travma ve inme gibi beyin hastalıklarında hücre dışı ortama salınan glutamat ve aspartat gibi uyarıcı aminoasitler nöronal hasar ve dejenerasyondan sorumlu tutulmaktadır. Serebral iskemide glutamat miktarı % 800 oranında artış göstermektedir. Glutamat merkezi sinir sistemindeki iyonotropik (iGluR) ve metabotropik reseptörlerini (mGluR) kullanmaktadır (27).

L-glutamat, bir nörotoksin olmasının yanısıra aynı zamanda bir gliotoksindir. Hücre dışı ortamda L-glutamatın artması astroglial hücrelerin şişmesine neden olmaktadır (8). Ayrıca kültürdeki astrositlerin parçalanmasına öncülük ederek bir dizi yıkıcı olayları başlatmaktadır (5). Bu durum aşırı miktardaki L-glutamatın nöronlarda olduğu gibi astrositlerde de hasara neden olduğunu göstermektedir.

Nörodejeneratif hastalıklar sonrası, nöronların yaşamını sürdürmesi ve iyileşmesinde astrositlerin görevi giderek önem kazanmaktadır. Nöron koruma ile ilgili mevcut araştırmaların çoğu nöron yaşamını arttırmak konusunda yoğunlaşmasına rağmen, iskeminin göze çarpan diğer etkisi gliaların, özellikle astrositlerin ölümüdür. Bir kez hasar oluşunca, astrosit fonksiyonlarındaki azalma, merkezi sinir sistemindeki daha ileri kayıplara katılabilir. Bu nedenle kötü koşullardan sonra astrosit ölümünden sorumlu mekanizmaların belirlenmesi oldukça önemlidir ve özellikle astrosit yaşamını arttırma konusunda strateji geliştirilmesi son derece ilgi çekicidir. Çünkü astrosit yaşamının uzamasının daha ileri bir nöron korumaya olanak sağlayacağı umulmaktadır (9). Astrositler oldukça yüksek glutamat konsantrasyonlarını (5 mM üzeri) tolere edebilirken, oligodendrositler 200 µM glutamat konsantrasyonu ile ölmektedir (49). Bu durum astrositlerde bulunan iyonotropik α -amino-3-hidroksi-5-metil-isoksazol-4-propionik asit (AMPA) reseptörlerinin desensitizasyonu ile gerçekleştirilmektedir. Bu nedenle astrositler glutamat eksitotoksitesisi karşısında beyin doku savunmasının önemli parçalarından birini oluşturmaktadır (15).

Lazaroidler (21-aminosteroidler) oksijen radikallerinin indüklediği lipid peroksidasyon inhibitörü olarak geliştirilen non-glukokortikoid antioksidan ilaçlardır. Özellikle travma, subaraknoid hemoraji ve iskemiye maruz kalmış beyin dokusunda güçlü bir antioksidan kapasitelerinin olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda iskemi ve subaraknoid hemoraji modelinde kan-beyin engelini koruduğu ortaya konmuştur (25). Lazaroid U-83836E'nin etkili bir $\cdot\text{OH}$ radikali tutucusu olduğu bilinmektedir (45).

Sıçanlarda beyin hasarının ardından hücreiçi serbest Mg^{2+} konsantrasyonu azalmaktadır (28). Hücreiçi serbest Mg^{2+} 'daki posttravmatik azalış, serebral ödem, nörolojik ve kognitif bozukluklarda da görülmektedir (29). Yapılan çalışmalarda hücreiçi Mg^{2+} eksikliğinin nörolojik disfonksiyonu ve sıçanlarda beyin hasarının ardından ölüm oranını arttırdığı ortaya konulmuştur. Mg^{2+} hem Ca^{2+} kanal blokeri hem de NMDA reseptör antagonisti olarak fonksiyon görmektedir. Magnezyum sülfatın (MgSO_4) iskemi ve travma nedeniyle oluşan nöronal hasarı önlediği gösterilmiştir (18,39,43). Deneysel omurilik iskemisinden sonra da Mg^{2+} tedavisi nörolojik disfonksiyonu iyileştirmiştir (51).

Glioma hücrelerinin glutamat toksisitesine duyarlı olduğu bilindiğinden (19), glutamat toksisitesini glioma hücrelerinde test etmeyi amaçladık. Kato ve arkadaşları C6 hücrelerinde 48 saat süreyle uygulanan L-glutamatın % 50 inhibitör konsantrasyonunu (IC_{50}) 3.5 mM olarak bulmuşlardır. 24 saat süreyle uygulanan 10 mM L-glutamat ise hücrelerin yaklaşık % 50'sini öldürmüştür (36). Sıçanlar üzerinde in vivo olarak yapılan çalışmalarda iskemik beyin hasarından sonra hem Mg^{2+} 'un (64), hem de bir lazaroid olan U-83836E'nin koruyucu olduğu ortaya konmuştur (17). Glutasyon sentez inhibisyonunun ardından U-83836E tedavisinin kültürü yapılmış sıçan mezensefalik nöronlarında ölümü engellediği gösterilmiştir (24). Oysa glial hücrelerde Mg^{2+} 'un ve U-83836E'nin glutamat toksisitesi üzerindeki etkisini gösteren in vitro herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle, kültürü yapılmış glial orijinli glioma hücre dizilerinde glutamat sitotoksitesisi oluşturulduktan sonra bu iki ajanın hücre yaşam oranına etkisini denemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. GLİA HÜCRELERİ

Merkezi sinir sistemi, fonksiyonlarının yanısıra içerdiği hücre türü açısından da heterojen bir yapıya sahiptir. Burada en geniş yer tutan hücre topluluğu glia hücreleridir ve nöronların 10-50 katını oluştururlar. Merkezi sinir sisteminde mikrogliya, oligodendrositler ve astrositler olmak üzere üç tip glia vardır. Periferik sinirlerde aksonları saran schwann hücreleri de glia olarak sınıflandırılmaktadır. Mikrogliya, kan damarlarından sinir sistemine giren hücreleri yok etmektedir. Oligodendrositler, miyelin yapımında görev almaktadır. Beynin her tarafında bulunan astrositler iki tiptir. Fibröz astrositler, birçok orta büyüklükte iplik içermekte ve esas olarak beyaz maddede bulunmaktadır. Astrositlerin bu tipinin morfolojik yapıları düzensizdir, genelde bir veya birkaç uzantısı diğerlerinden daha kalındır. Birçok iyon kanalı ve nörotransmitter bulundurmaktadır. Nöronlardakine benzer olarak kalsiyum, araşidonik asit, döngüsel adenozin mono fosfat (cAMP) ve döngüsel guanozin mono fosfat (cGMP) gibi haberci sistemlerini aktive etmektedir. Protoplazmik astrositler ise gri maddede bulunmaktadır; granüler sitoplazmaları vardır. Nöronal aktiviteyle ilgili süreçlerde yer almaktadır. Uyarıcı aminoasitler, γ amino bütirik asit (GABA) gibi nörotransmitterler için geri alım mekanizmaları vardır. Purinerjik ve kolinerjik reseptörlerle hücre içi kalsiyum düzeyini düzenlemektedir. Kılcal damarlarla daha yakın ilişkilidir. Her iki tip astrosit kan damarlarına uzantılar göndererek kılcal damarın sıkı bağlantılar oluşturmasını sağlamakta ve kan-beyin engelini yapmaktadır. Ayrıca sinapsları ve nöronların yüzeyini saran uzantılar yollar (3,19).

Uzun zamandan beri beyindeki sinyal sisteminin oluşumu ve kontrolünden sorumlu tek hücre grubunun nöronlar olduğu, onların çevreleyen gliaların ise nöronal fonksiyona yapısal ve metabolik destek sağladıkları düşünülmekteydi. Oysa son yıllarda elde edilen bulgulara dayanarak astrositlerin nöronal haberleşmede aktif rol oynadıkları görüşü ortaya çıkmıştır. Astrositler küçük somaları ve yaygın, dallı uzantıları olan glia hücreleridir. Bazıları sinaptik bölgeleri çevrelerken, bazıları da tipik sonlanmaları ile

kan damarlarının duvarı ile bağlantı kurmaktadır. Bu nedenle astrositler, nöronlar ile kılcal damarlar arasında stratejik olarak yer almıştır (63).

Beyin için birincil enerji kaynağı olan glukoz, astrositlerde glikojen şeklinde depolanmakta, daha sonra çeşitli nörotransmitterlerin uyarısına yanıt olarak mobilize olmaktadır. Astrositlerin asıl beyin hücre dışı sıvısının bileşimini düzenlemedeki görevi önemlidir. Bu düzenlemede K^+ iyonlarının, glutamat ve GABA gibi nörotransmitterlerin konsantrasyonu yer almaktadır. Hücre dışı K^+ konsantrasyonu çok iyi düzenlenmelidir. Çünkü K^+ artışı nöronları depolarize ederek ve anormal uyarılmalara neden olarak aksiyon potansiyelinin ilerlemesi engellenebilir. Astrositler sitoplazmik zarlarında bulunan çok geçirgen (içeri doğru) K^+ kanalları ve Na^+/K^+ pompası ile hücre içine K^+ 'u almakta; gap junctionlar ve difüzyon yolu ile K^+ 'u uzaklaştırabilmektedir (20,30). Ayrıca astrositlerin beyinde endotel hücrelerin bariyer özelliklerini düzenleyen birçok sinyalden sorumlu olduğu konusunda önemli deliller bulunmaktadır. Bu nedenle astrositler birçok nöropatolojik durumda önemli görevler üstlenmişlerdir (2). Glutamaterjik sinapslarda hücre dışından glutamatın alınımında da astrositler önemli görev almaktadır.

2.2 GLUTAMAT

Glutamat merkezi sinir sisteminde ana uyarıcı nörotransmitterdir ve beyindeki uyarıcı iletimin % 75'inden sorumludur. Merkezi sinir sisteminde hem nöronlar hem de glia hücreleri glutamat içermektedir. Glutamat, Krebs döngüsü ara ürünlerinden α -ketoglutaratın indirgeyici aminasyonu ile oluşmaktadır. Tepkime geri dönüşümlüdür ve daha sonraki metabolizma sitrik asit döngüsü ile meydana gelmektedir. Glutamaterjik nöronlar bilginin şifre edilmesi, belleğin oluşumu ve kullanılması, uzaysal tanıma ve bilincin sürdürülmesi gibi birçok yaşamsal olayda görev almaktadır. Glutamat aynı zamanda önemli bir nörotoksindir. Hipoksik hasar, hipoglisemi, inme ve epilepsi ile ilişkili durumlarda glutamat reseptörlerinin aşırı uyarımı söz konusudur. Hasar ve glutamat reseptörlerinin aşırı uyarımı arasında oldukça güçlü bir bağlantı vardır (15).

2.2.1 Glutamat ve Reseptörleri

Glutamat reseptörleri farmakolojik ve elektrofizyolojik özelliklerine göre iyonotropik (iGluR) ve metabotropik glutamat reseptörleri (mGluR) olarak iki gruba ayrılmaktadır. mGluR'leri G proteinleri ile ilişkilidir ve uyarılmaları glial hücrelerde hem elektriksel hem de metabolik olaylara neden olmaktadır. Günümüzde sekiz adet mGluR'ü klonlanmış olup, bunlar aminoasit benzerlikleri, farmakolojik özellikleri ve sinyal ileti sistemlerine göre üç gruba ayrılmıştır. Kısaca, mGluR 1 ve 5 (Grup I) fosfolipaz C ile ilişkilidir. Bunların uyarılması fosfoinositid hidrolizine ve zar depolarizasyonuna neden olur. Grup II (mGluR 2-3) ve III (mGluR 4, 6-8) ise iyon kanalları ve adenil siklazın inhibisyonu ile ilişkilidir (27).

Tüm iGluR'leri ligand kapılı, katyonik iyon kanallarıdır. N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörleri, α -amino-3-hidroksi-5-metil-isoksazol-4-propionik asit (AMPA) ve kainat reseptörleri olmak üzere üçe ayrılmaktadır. NMDA, AMPA ve kainat reseptörleri Na^+ 'un hücre içine girişine, K^+ 'un hücre dışına çıkışına, zar depolarizasyonuna ve/veya alt ünite kompozisyonuna göre hücre içine Ca^{2+} girişine neden olmaktadır. AMPA reseptörlerinin uyarımı hızlı oluşan ve çabuk sönen depolarizasyona neden olurken, kainat reseptörlerinin uyarılması, uzun süreli, desensitize olmayan yanıtlara neden olmaktadır (27).

NMDA reseptörü görece büyük miktarda Ca^{2+} geçişine izin vermektedir ve birçok yönden de özgündür. Önce glisin, NMDA reseptörünün işlevini kolaylaştırmak için ona bağlanmaktadır ve görüldüğü kadarıyla glisin, bunun glutamata karşı normal yanıtı için vazgeçilemezdir. İkinci olarak, glutamat bu reseptöre bağlandığında bu kanal açılmakta, fakat normal zar potansiyellerinde buna ait kanal Mg^{2+} iyonu tarafından bloke edilmektedir. Bu blokaj sadece, reseptörü içeren nöron AMPA'nın veya diğer kavşak devreleri üzerinden hızlı depolarizasyona neden olan diğer kanalların etkinleşmesi ile kısmen depolarize olduğunda ortadan kalkmaktadır. Üçüncü olarak, amneziye ve kişinin kendini çevreden soyutlamasına neden olan fensiklidin ve ketamin, kanal içinde başka bir yere bağlanmaktadır. Hipokampusta yüksek derişimde NMDA

reseptörü bulunmakta ve bu reseptörlerin baskılanması, nöral yolaklardaki iletimin yüksek sıklıklı kısa bir uyarılma evresinden sonra uzun süre devam eden uzun dönem potansiyelizasyonu engellemektedir. Yani, bu reseptörler bellek ve öğrenmede rol oynayabilir (19).

Glutamat reseptörlerinin varlığı in vitro ve in situ olarak çeşitli glial hücre örneklerinde gösterilmiştir. Voltaj kapılı K^+ , Na^+ , Cl^- ve Ca^{2+} gibi birçok iyon kanalları izole astrosit kültürlerinde tanımlanmıştır (27).

Astrositlerde hem iGluR'leri hem de mGluR'leri genellikle bulunmasına rağmen NMDA reseptörlerinin varlığı hala kesinleşmemiştir. NMDA'nın neden olduğu akımlar hipokampus ve neokortikal astrositlerde gözlenmiş, ancak fonksiyonel NMDA reseptörlerinin gliada olup olmadığı tam olarak bilinmemekteydi. Fakat son yıllarda Schipke ve arkadaşlarınca yapılan bir çalışmada fare neokorteks astrositlerinde fonksiyonel NMDA reseptörlerinin bulunduğu gösterilmiştir (53). Glial hücrelerde glutamatın hacim değişimlerini uyarması ve astrositlerden glutamat salınımını azaltması, glutamat reseptörlerinin merkezi sinir sisteminde fizyolojik ve patofizyolojik olaylarda önemli bir role sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

Glutamat reseptörleri glial gelişim sırasında önemlidir. Glial hücrelerin gelişimi, hücre çoğalması, hücre göçü ve farklılaşma olaylarını içermektedir. Astrositlerde mGluR'lerinin aktivasyonu G_1/S geçişini engelleyerek hücre çoğalmasını baskılamakta ve farklılaşmayı uyarılmaktadır. Astrositlere özgü bir enzim olan glutamin sentetazda artışa neden olmaktadır. İnsan retinasındaki Müller glia hücrelerinde NMDA reseptör agonistleri hücre çoğalmasını uyarırken, mGluR agonistleri mitojenin uyardığı hücre bölünmesini engellemektedir (47).

Glutamat reseptörlerinin agonist ve antagonistleri Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1: Glutamat reseptör alt gruplarının özellikleri (27).

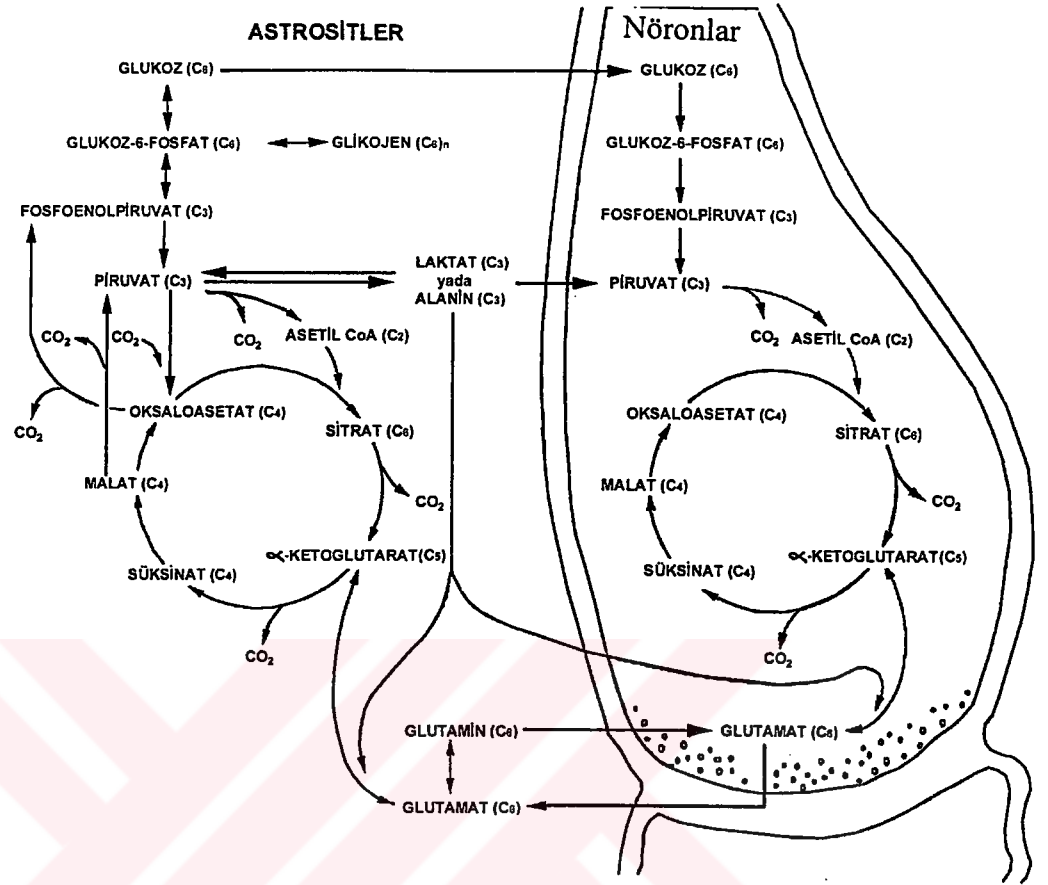
Reseptör	Mekanizma	Bağlanma	Agonist	Antagonist
AMPA	Na ⁺ ve Ca ²⁺ kanal açılması Ca ²⁺ girişi Zar uyarımı Hızlı desensitize	Ligand kapılı iyon kanalı	AMPA Quiskalate	CNQX DNQX
Kainat	Katyonik kanal açılması Ca ²⁺ girişi Zar uyarımı Desensitize olmaz	Ligand kapılı iyon kanalı	Kainik asit Domoik asit	CNQX DNQX
NMDA	Katyonik kanal açılması Ca ²⁺ girişi	Ligand kapılı iyon kanalı	NMDA Cis-ACBD	D-AP5 MK-801 CNQX
mGluR I (1,5)	Fosfolipaz C uyarımı IP ₃ aracılı Ca ²⁺ salınımı	Gq proteini	CHPG (R,S)-3,5-DHPG	AIDA L-AP3 (5)-4-CPG
mGluR II (2,3)	Adenil siklaz inhibisyonu cAMP üretiminin azalması	Gi/Go proteini	QA DCG-IV	EGLU PCCG-IV MCCG
mGluR III (4, 6-8)	Adenil siklaz inhibisyonu cAMP üretiminin azalması	Gi/Go proteini	L-AP4 L-SOP L-CCG-I	CPPG MAP4 MSOP

2.2.2 Glutamat Sentezi

Kan-beyin engeli, beyni kandan ayırarak beynin hücre dışı ortamının içeriğini kontrol altında tutmaktadır. Beynin damar endotel hücreleri bir çok solüte geçirgen değildir ve aktif taşıma mekanizmaları da çok sınırlıdır. Normal yetişkinlerde sistemik dolaşımda yüksek oranda bulunan glukoz tek enerji kaynağıdır ve kolayca kan-beyin engelini geçebilmektedir. Serumda bulunan glutamat ise merkezi sinir sistemine giremez. Bunun sonucu olarak, merkezi sinir sisteminde bulunan tüm glutamat burada sentezlenmektedir. Nöron ve astrositlerin her ikisi de glukozu glikoliz olayı ile piruvata dönüştürebilmektedir. Sonra piruvattan asetil Co-A elde edilmektedir. Asetil Co-A trikarboksilik asit (TCA) döngüsü ile CO₂ ve suya kadar indirgenebilir. TCA döngüsü sırasında oluşan α -ketoglutarat alanin ile transamine edilerek glutamat elde edilmektedir (30, Şekil 2.1).

2.2.3 Astrositlerin glutamat alması

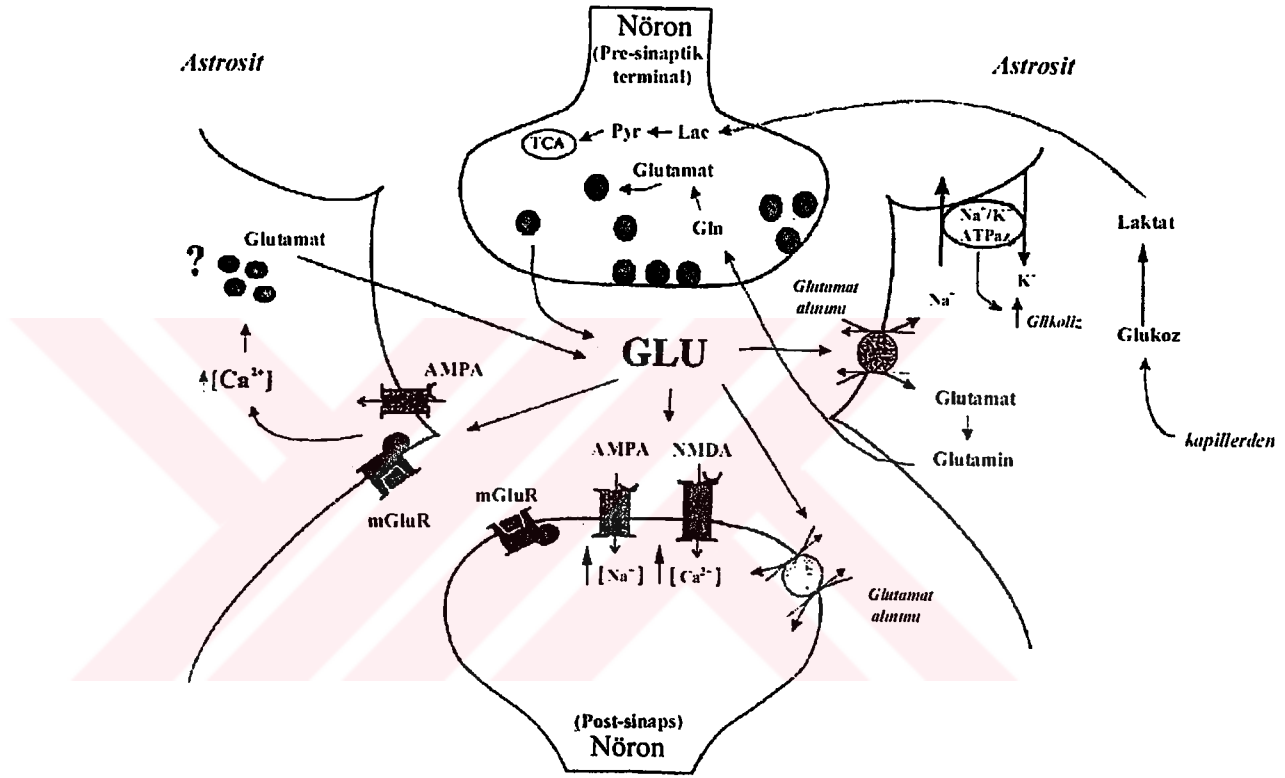
Glutamaterjik kavşaklarda hücre dışı boşluktan nörotransmitterin geri alınmasında astrositler önemli rol oynamaktadır. Sinaptik vesiküllerde depolanan glutamat Ca²⁺ bağımlı ekzositoz ile presinaptik terminallerden salınmaktadır (47). İlk önce, postsinaptik AMPA/Kainate reseptörlerini aktive ederek ilgili katyon kanallarını açmakta ve uyarıcı bir potansiyele neden olmaktadır. Bu başlangıç depolarizasyonu ile NMDA reseptörlerinde Mg²⁺,un neden olduğu voltaj bağımlı blok kaldırılmakta ve Ca²⁺,un hücre içine girişi ile daha ileri depolarizasyon gerçekleştirilmektedir. Glutamat, reseptörü ile etkileştikten sonra sinaptik aralıktan uzaklaştırılmalıdır, çünkü reseptörün aşırı uyarılması (özellikle de NMDA reseptörünün) nöronal hasara neden olmaktadır. Glutamatın geri alınımı, hücreler arasına diffüzyonu, nöron ve astrositlerin zarlarında bulunan taşıyıcı proteinler ile gerçekleştirilmektedir.



Şekil 2.1 Nöron ve astrositlerdeki glutamat sentezi (30).

Şekil 2.2' de sağdaki astrositte, alınan glutamat, glutamine dönüştürülerek salınmakta ve nöron sonlarında geri alınmaktadır. Nöronda glutamin tekrar glutamata çevrilerek nörotransmitterin vesiküler havuzu yeniden doldurulmaktadır. Bu döngü glutamat/glutamin mekiği adını almaktadır. Glutamatın glial alınımı, glutamat ve sodyumun birlikte transportu tarafından aktive edilen Na^+/K^+ ATPaz pompası aracılığıyla glikoliz ile bağlantılıdır. Beyin kılcal damarları ile bağlantı kurmuş astrositik son uçlardan alınan glukoz, laktata çevrilerek salınır ve sonuçta ATP'ye dönüştürülmektedir.

Şekilde solda bulunan astrositte, sinaptik olarak salınan glutamat nöronal reseptörlerin yanı sıra, astrositlerde bulunan AMPA ve metabotropik reseptörleri aktive etmektedir. Bu reseptörlerin birlikte aktivasyonu hücreiçi Ca^{2+} artmasına ve ardından astrositlerden psödoeksositoz mekanizması ile glutamat salınmasına neden olmaktadır (63).



Şekil 2.2 Glutamat-glutamin mekiği (63).

2.2.4 Glutamatın neden olduğu astroglial hücre şişmesi:

Glutamatın hücreiçi konsantrasyonu astrositlerde 50 μ M iken, glutamaterjik nöronlarda 10 mM'dır. Normal glutamaterjik iletimin gerçekleştirilmesi ve eksitotoksisiteden korunabilmesi için hücre dışı glutamat konsantrasyonu yaklaşık 1-3 μ M düzeyinde tutulmalıdır (47).

Hücre dışı glutamat miktarındaki artış astroglial hücre şişmesinde son derece önemli bir etkidir. Beyindeki dolaşım sal bir sıkıntıdan sonra etkilenen bölgedeki astrositler birkaç dakika içinde hücre hacmini arttırarak yanıt vermektedirler. Hücre dışı ortamın çok küçük hacimde olması nedeniyle astroglial şişme nöroaktif maddelerin miktarında değişimlere neden olmakta ve bu durum nöronal fonksiyonu etkilemektedir. Astrositlerin depolarizasyonu hem glutamatın salınmasına hem de hücre dışı boşluktan glutamatın alınma yeteneğinin azalmasına neden olmaktadır. Sonuçta anormal glutamaterjik ileti ve nörotoksisite gelişmektedir. Astrositlerin şişmesi aynı zamanda lezyon bölgesinden glutamatın difüzyonunu da engellemektedir. Hücre hacmindeki artış hasar görmüş dokuda metabolik bozulmayla sonuçlanmakta ve nöronlar için zararlı olmaktadır. Astrositlerin de hasar görmesine neden olabilir. Glutamat ile astrositlerin şişmesi hücre içinde aminoasitlerin birikimine neden olmaktadır. Glutamatın neden olduğu astroglial şişmenin altında yatan mekanizmayı ortaya koymak amacıyla pek çok çalışma yapılmıştır. Fakat bunların hiçbiri olayı tam olarak açıklamaya yeterli değildir (27).

Hücre zarından glutamatın taşınması ve hücre hacim değişimleri arasında bir ilişki bulunmaktadır. Glutamatın hücre içine alınması 3 Na⁺ ve 1 H⁺ iyonu ile kotransport şeklindedir ve bir K⁺ iyonu hücre dışına verilmektedir. Günümüzde 5 farklı glutamat taşıyıcısı klonlanmıştır. GLAST, GLT-1, EAAC1, EAAT4 ve EAAT5. Bu taşıyıcılar, farklı beyin bölgeleri ve hücre tiplerinde ayrı dağılım göstermektedirler. GLAST ve GLT-1 gliaya özgü taşıyıcılar iken diğerleri nöron spesifiktir. GLT-1 hipokampus ve serebral kortekste en yüksek düzeyde bulunmakta iken, GLAST öncelikle serebellumun moleküler tabakasında bulunmaktadır. Yetişkin beynindeki astrositik zarlarda glutamat taşıyıcıları bol bulunmaktadır. Bu durum sinaptik iletiden sonra glutamatın hücre dışı boşluktan alınımında astrositik taşıyıcıların önemli olduğunu düşündürmektedir. Glutamatın uyardığı astroglial şişmenin en azından kısmen glutamat taşıyıcılarının bloklanması ile azalması, glutamat taşıyıcıları ile hücre hacminin düzenlenmesi arasında bir ilişkinin varlığını ortaya koymaktadır. Glutamat klerensi ve nörodejenerasyonun engellenmesinde astrositik taşıyıcıların rolünü göstermeye çalışan araştırmalarda, sıçanda GLT-1 ve GLAST glial taşıyıcılarının

kaybının hücre dışı glutamat miktarını yükselttiği ve nörodejenerasyona yol açtığı saptanmıştır.

Birçok etkenin glutamat taşıyıcılarının aktivitesini ve sunulumunu etkilediği görülmüştür. Farklı glutamat taşıyıcılarının aktivitesi aynı faktörlerle farklı şekilde düzenlenebilmektedir. Örneğin, GLT-1 proteinkinaz C'nin fosforilasyonu ile uyarılırken, GLAST baskılanmaktadır. Bununla beraber, şüphesiz hücre-hacim düzenlenmesinde glutamat taşıyıcılarının dışında diğer mekanizmalar da önemlidir. Na^+ ve glutamatın hücre içine girişinin neden olduğu hücreiçi osmolaritedeki net artış glial şişmeden sorumlu tek mekanizma olarak sunulmuştur. Na^+/K^+ ATPazın ouabain ile baskılanması, Na^+ taşınmasını ya da enerji desteğini ortadan kaldıracağı için glutamatın neden olduğu astroglial şişmeyi engellediği görülmüştür. Yine Ca^{2+} 'un da farklı hücre tiplerinde hücre-hacim düzenlenmesini etkilediği gösterilmiştir (27).

2.2.5 Nörolojik fonksiyon bozukluğunda astrositler ve glutamat

Merkezi sinir sistemindeki travmatik ya da iskemik hasar sonrası glutamatın nöronlar ve astrositlerden patolojik salınımı söz konusudur. Bu salınım daha yoğun eksitotoksik nöronal dejenerasyona neden olmaktadır. Hücre dışı glutamat miktarının artması, hem iGluR hem de mGluR'lerinin kontrolsüz uyarımı sonucu eksitotoksik kaskadın oluşumuna neden olmaktadır. Bu toksik etkilerin arkasında yatan moleküler mekanizmalar bilinmemekle beraber, hücreiçi Ca^{2+} artışının ve Na^+ 'un hücre içine girişinin etkisi olduğu düşünülmektedir. Glutamat reseptörleri, voltaj kapılı Ca^{2+} kanallarından ve hücreiçi depolardan salınan Ca^{2+} 'un, nöronal protein kinazların, proteazların ve nitrik oksit sentazın kontrolsüz uyarılmasına neden olmaktadır. Ardından proteoliz, lipid peroksidasyonu ve serbest radikal oluşumu ile nöronların dejenerasyonu görülmektedir. Bu nedenle glutamat salınımının düzenlenmesi, glutamat reseptör antagonizmi ya da lipid peroksidasyonunun engellenmesi gibi eksitotoksik nöronal hasarı engelleyici olasılıklar üzerindeki ilgi yoğun bir şekilde devam etmektedir.

Bu olaylara astrositler nasıl katılmaktadır? Astrositler, beyin dokusunda dış uyaranlara yanıt verebilen, nöronlar ve diğer glial hücrelerle iyon konsantrasyonlarını modüle ederek oluklu bağlantılar (gap junction) yoluyla haberleşebilen hücrelerdir. Bu özellikler astrositlerin sinir sisteminde birçok girdiye yanıt verdiğini düşündürmektedir. Eksitotoksik değişimler ile astrositler homeostasisi sağlama yeteneğini kaybedebilmekte ve hasarı daha da ileriye götürebilmektedir. Glutamat alınımı, K^+ 'un tamponlanması, substrat üretimi ve serbest radikallerin elimine edilmesi gibi koruyucu görevleri azalmakta veya tersine dönebilmektedir. Sonuçta, hücre içi ATP miktarı azaldığı zaman glutamat alınımı azalmaktadır. İskemi veya anoksida beyin ATP miktarının azalması Na^+/K^+ ATPaz pompasının yavaşlamasına ve Na^+ , K^+ gradientlerinin tersine dönmesine neden olmaktadır. Bu değişim, glutamat taşıyıcılarının tersine çalışmasına ve hücre dışına glutamat salınımına neden olmaktadır. Sonuç, nöronal ölümdür.

Akut bir hasarda oluşan erken yanıt astroglial şişmedir. Şişme, glutamat ve K^+ gibi maddelerle suyun ikincil olarak alınımı nedeniyle oluşmaktadır. Şişme iki olaya neden olmaktadır. Birincisi, beyin içi basıncı arttırması ve damar perfüzyonunu azaltmasıdır. Böylece hücre dışına salınan glutamat miktarı artmaktadır. Glutamat, NMDA reseptörlerini aktive ederek eksitotoksisiteye katılmaktadır. İkincisi, iskemik durumların astroglial Ca^{2+} miktarında artışa neden olmasıdır. Hücre içi Ca^{2+} miktarındaki artışa yanıt olarak astrositler glutamat salgılamaktadır. Salınan glutamat komşu nöronları depolarize ederek, NMDA reseptörlerinin fazla uyarılmasına neden olmaktadır. Bu açıklamaların ışığı altında, astrositlerin nöronal hasara katıldığı ve glutamat eksitotoksitesine karşı oluşan nöronal yanıtı düzenlediklerini söylemek mümkündür (8).

Kültürdeki astrositlerde L-glutamatın toksik etkisi iki safhada özetlenebilir. L-glutamat uygulanmasının ardından 4-6 saat içinde mikroskopik olarak gözlenebilen hücre şişmesi ilk etkidir. Bu dönemde hücreler morfolojik yapılarını korurlar, fakat çekirdekte bir değişim söz konusudur. Çekirdekler şişmiştir, çekirdekçikler göze çarpar ve çekirdek zarı belirgindir. İkinci etki hücre ölümüdür. Hücre ölümünün morfolojik ya

da biyokimyasal işaretleri daha sonra başlamakta (16-18 saat) ve L-glutamat uygulanmasından 24-30 saat sonra hemen hemen tüm hücreler ölmektedir (9).

In vitro çalışmalarda glutamat sitotoksitesinden sorumlu iki mekanizmadan söz edilmektedir: eksitotoksite ve oksidatif stres ile ilişkili sistin taşınmasının baskılanması. Sistin taşınmasının baskılanması ve oksijen türevlerinin artması sonucu glutamat sitotoksitesinin oksidatif stres yolu ortaya çıkmaktadır. Hücreiçi glutatyon (GSH) sentezi için sistein gereklidir. Kararsız olması nedeniyle, hücre dışı sisteinin hemen hemen tamamı okside sistin durumunda bulunur. Yani, GSH sentezi için gerekli olan hücreiçi sisteinin en önemli kaynağı hücre dışındaki sistindir. Glutamat ve sistin aynı amino asit taşıyıcıyı kullandıklarından hücre içine girmek için yarışmaktadırlar. Hücre dışı glutamat miktarı arttığında, sistin taşınımı baskılanmakta ve hücreiçi GSH miktarı azalmaktadır. En önemli hücre sel antioksidan olan GSH'nın azalması, hücrenin oksidatif strese olan duyarlılığını arttırmaktadır (26). Hücreye dışarıdan GSH verilmesi, L-glutamat toksitesini iyileştirmektedir. Ayrıca L-glutamat uygulanması glioma hücrelerinde oksijen türevlerinin birikimini arttırmaktadır. Sinir sisteminde L-glutamatın etkisiyle hücre içine Ca^{2+} girişi nitrik oksit sentezi uyararak, nitrik oksiti ve fosfolipaz A₂ ile de araşidonik asidi üretebilir. Bu durum oksijen türevlerinin oluşumunu ve olasılıkla nöron ölümünü kolaylaştırmaktadır. Astrositlerde L-glutamatın etkisi ile oksijen türevlerinin oluşumunun ayrıntılı mekanizması henüz tam olarak ortaya konabilmiş değildir. Tüm bu verilere dayanarak, astrositleri L-glutamat toksitesinden korumada hücre içi radikalleri temizlemek önemli olabilir (9).

2.2.6 Glioma hücrelerinde glutamat toksitesi:

Glia hücreleri, nöronlardan farklı olarak postnatal dönemde bölünme yeteneklerini sürdürmektedirler. Glial çoğalma, reaktif gliosis, beyin travmaya cevabı ve glial hücrelerin malignant transformasyonunda görülmektedir (4). Glial kökenli tümörler toplu olarak glioma şeklinde isimlendirilmektedirler. Gliomaların çoğunluğu astrositik hücrelerde görülmektedir. Transforme hücreler hala astrositlerle aynı özellikleri paylaşmaktadır. Örneğin, glial fibriller asidik protein (GFAP), S100 ve

büyüme faktör reseptörlerini içermektedir (36). Bu durum özellikle düşük dereceli astrositomalar için doğrudur. Gliadan glioma oluşumunu sağlayan faktörler iyi anlaşılammıştır. Bununla birlikte bu dönüşüm çok sayıda genetik değişimler, gen delesyonları ve gen amplifikasyonları ile birlikte olmaktadır (4).

C6 sıçan glioma hücre serisinin glial hücre özelliklerinin araştırılması ve kültürdeki glia hücrelerinin cevaplarının belirlenmesi, ayrıca glutamatın neden olduğu gliotoksisitede hücreyel olayların anlaşılması için uygun bir model oluşturduğu gösterilmiştir (23,36). Kato ve arkadaşları, C6 glioma hücrelerinde glutamat toksisitesinin mekanizmasını ortaya koymak için yaptıkları çalışmada, i. glutamatın etkili konsantrasyonunun milimolar düzeyde ve çok yüksek olduğu, ii. hücrelere NMDA ya da AMPA değil quisqualatın toksik olduğu, iii. toksisitenin glutamat reseptör antagonisti ya da glutamat alımın inhibitörü ile azaltılamadığı sonucuna vararak, glutamat toksisitesinin glutamat reseptörleri ile ilişkili olmadığını göstermişlerdir. Ayrıca C6 hücrelerinde glutamatın oluşturduğu hücre ölümünün önce antiporter sistem yolu ile sistin alımının baskılanması, ardından glutatyon eksikliğinin oksidatif strese neden olması ile meydana geldiğini ortaya koymuşlardır (36). Lipoksijenaz tarafından oluşturulan peroksitler GSH'sı azalmış hücrelerde ölüme neden olmaktadır (26).

2.3 GLİA VE NÖRONDA KALSİYUM DENGESİ

Tüm ökaryotik hücrelerde Ca^{2+} dengesinin düzenlenme mekanizması benzerdir. Hücreiçi Ca^{2+} miktarı, zardaki Ca^{2+} taşıyıcıları ve sitoplazmadaki Ca^{2+} tamponlarının etkileşimi ile belirlenmektedir. Ca^{2+} taşıyıcıları denildiğinde, Ca^{2+} 'a geçirgen kanallar, ATP kullanan Ca^{2+} pompaları ve elektrokimyasal olarak idare edilen Ca^{2+} değişimcileri anlaşılmmaktadır. Sonuçta, Ca^{2+} ya sitoplazmadan uzaklaştırılmakta yada sitoplazma içine dağıtılmaktadır. Sitoplazma içindeki Ca^{2+} 'un çoğu, Ca^{2+} bağlayıcı proteinler ile bağlanmaktadır. Bu özellik hücrenin Ca^{2+} tamponlama kapasitesini göstermektedir. Ca^{2+} taşıyıcıları, hücreiçi ve dışı arasındaki Ca^{2+} değişimini sağlamak üzere hücre zarı, endoplazmik retikulum, mitokondri, Golgi aygıtı ve çekirdek gibi hücreiçi organellerin zarlarında bulunmaktadırlar. Bu organeller Ca biriktiren hücreiçi

Ca^{2+} depolarıdır. Birikmiş Ca^{2+} proteinlere bağlanır ve Ca^{2+} kanalları yolu ile salınmaktadır (62).

Glia hücrelerinde toplam Ca^{2+} 'ın sadece çok az bir kısmı (% 0.001'den azı) serbest sitoplazmik Ca^{2+} 'dır. Çoğu endoplazmik retikulum ve Golgi aygıtı gibi hücreiçi organellere bağlıdır. Dinlenim durumunda glia hücrelerindeki hücreiçi Ca^{2+} konsantrasyonu 30-40 ile 200-400 nM arasında değişmektedir (37). C6 glioma hücrelerinde ise 75-200 nM arasında değişmektedir (41). Bu değişkenlik sadece glia hücrelerinin alt gruplarında değil, aynı hücre gruplarında da görülmektedir. Bu durum, Ca^{2+} ölçümü için kullanılan yöntemin sağlıklı olmayabileceğini yada hücreiçi Ca^{2+} dengesinin çok esnek olduğunu gösterebilir.

Başlangıçtaki elektrofizyolojik ölçümler glia hücrelerinde voltaja duyarlı Ca^{2+} kanallarını gösteremedi. Daha sonraki gelişmiş teknikler glia hücrelerinin de voltaj kapılı iyon kanallarını içerdiğini ortaya koydu. Daha önce sadece elektriksel olarak uyarılabilir hücrelerde bulunduğu düşünülüyordu. Astrosit, oligodendrosit ve schwann hücrelerinde voltaj kapılı kanallar ile Ca^{2+} 'ın hücre içine girişinin hücreiçi Ca^{2+} konsantrasyonunu anlamlı olarak arttırdığı görülmüştür (61). Bununla beraber, tüm glia hücreleri voltaja duyarlı Ca^{2+} kanalları içermemektedir. Örneğin, Bergmann glia hücreleri, mikroglia ve astrogliomaların bazı türleri voltaja duyarlı Ca^{2+} kanalları içermemektedir. Bu durumda Ca^{2+} iyonları glia sitoplazmasına ligand kapılı kanallar yolu ile girebilir. Ligand kapılı iyon kanalları hemen hemen tüm glia hücrelerinde bol miktarda bulunmaktadır. Kültür ortamında bulunan astrositler de Ca^{2+} geçirebilen nonspesifik katyon kanallarını bulundurmaktadırlar (61).

Glia hücrelerindeki Ca^{2+} depolayan organeller hakkında az şey bilinmektedir. Çoğu glia ayrıntılı bir endoplazmik retikulum içerir ki Ca^{2+} depolarını hızla değiştirmek için ana substrat olarak görev yapmaktadır. Mitokondri diğer büyük Ca^{2+} depo bölgesidir. Glia hücrelerinde Ca^{2+} dengesindeki rolleri hakkında çok az şey bilinmektedir. Fizyolojik koşullarda Ca^{2+} sinyal sisteminde mitokondrideki Ca^{2+}

birikimi önemli rol oynamazken, patolojik koşullarda mitokondride hasar olduğundan glia Ca^{2+} homeostasisi anlamlı olarak etkilenmektedir.

Hücre içi düşük Ca^{2+} yoğunluğunun sürdürülmesi reseptör/kanal uyarılması sonucu hücre içi Ca^{2+} miktarındaki artışın tekrar eski haline dönmesi Ca^{2+} pompaları ve elektrokimyasal etkili Na^+/Ca^{2+} değişimi ile gerçekleştirilmektedir. Glia hücre Ca^{2+} pompalarının özellikleri hakkında çok az bilgimiz vardır. Glia hücrelerinde yapılan deneylerde Na^+/Ca^{2+} değişiminin olduğu konusundaki deliller, zarı geçen Ca^{2+} akımlarının hücre dışı Na^+ konsantrasyonu ile kontrol edildiğini ortaya koymuştur. Çeşitli astrositik preparatlarda hücre dışı Na^+ konsantrasyonu azaltılarak Na^+ gradiyentinin azaltılması, Ca^{2+} 'un hücre dışına çıkma oranını azaltarak, hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunu arttırmıştır. Astrositlere özgü Na^+/Ca^{2+} değişimi, interstisyumdaki iyonik bileşimin düzenlenmesi için önemlidir. Nöronlar elektriksel olarak uyarıldıklarında sinaptik aralıktaki hem Ca^{2+} , hem de Na^+ 'u azaltmaktadırlar. Hücre dışı Na^+ konsantrasyonunun azaldığı durumlarda Na^+/Ca^{2+} değişimcisi ters çalışarak, komşu astrositlerden Ca^{2+} 'u kovarak interstisyuma Ca^{2+} sağlamaktadır. Sonuçta, Na^+/Ca^{2+} değişimi patolojik durumlarda Ca^{2+} eksitotoksitesine katılabilir. Özellikle, Ca^{2+} 'un azalma dönemlerinden sonra Ca^{2+} 'un yeniden eski konsantrasyonuna dönmesi nedeniyle Na^+/Ca^{2+} pompasının ters çalışması astrositik hasarda önemli rol oynamaktadır (64).

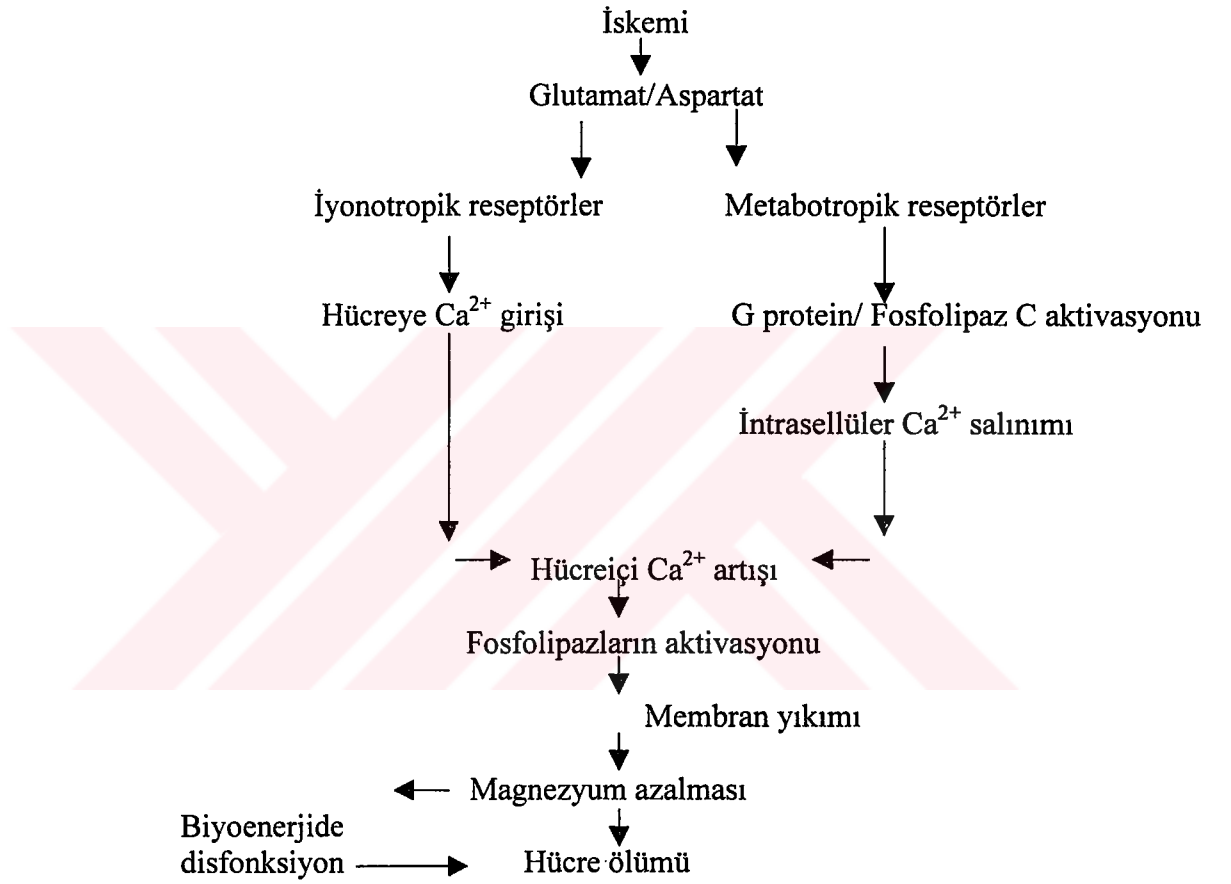
Ca^{2+} sitoplazma içine girdikten sonra hücre içi sinyal ileti yollarını tetikleyerek çeşitli proteinlere bağlanmaktadır. En iyi bilinen Ca^{2+} sensörü kalmodulindir ve kalmodulin-bağımlı protein kinazlar, protein fosfatazlar ve adenil siklaz olmak üzere en az üç sınıf enzimin aktivitesini düzenlemektedirler. Adenil siklaz enzimi ya sitoplazmik enzimler ile etkileşmekte ya da gen sunulumundan sorumlu diğer yolları başlatarak, çekirdeğe kadar götürmektedir. Ca^{2+} sinyalleri ve gen sunulumunu bağlayan alternatif bir yol Ras proteinleri (küçük guanin nukleotidi bağlayan proteinler) ile ilgilidir. Ras proteinleri Ca^{2+} ile uyarıldıktan sonra fosforilasyon olaylarını tetiklemekte ve gen ekspresyonunun düzenlenmesine neden olmaktadır. Glia hücrelerinde bu sistemlerin rolü hakkında çok az bilgi bulunmaktadır (64).

Beyinde bir hasar söz konusu olduğunda, beyin savunmasının önemli bir kısmını oluşturan astrositler ve mikroglialar kompleks reaksiyonlar oluşturmaktadırlar. Astrositler birçok biyokimyasal, yapısal ve çoğalma değişimleri göstererek “aktif astrositler” adını almaktadırlar. Beyin hasarında glia hücrelerinin yanıt oluşturmasını sağlayan elementin Ca^{2+} olduğu konusunda veriler bulunmaktadır. İskemik hasarı araştıran in vitro ve in vivo deneysel modellerde astrositler kısa bir süre hipoksik ya da hipoglisemik şartlarda tutulduğunda hem voltaj kapılı Ca^{2+} kanallarının uyarılması, hem de iç havuzlardan Ca^{2+} 'un salıverilmesi ile hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunun yükseldiği görülmüştür. Beyincikte bulunan Bergmann glia hücreleri 1 mM glutamata maruz bırakıldıklarında hücre içi Ca^{2+} miktarında artış gözlenmiştir. Ca^{2+} 'daki bu artıştan AMPA/Kainat reseptörlerinin çok az role sahip olduğu, esas etkinin mGluR-IP₃ sinyal yolu ile gerçekleştiği ortaya konmuştur (38).

Hücrelerdeki Ca^{2+} 'un aşırı artmasının hücre ölümüne neden olduğu ortaya konmuştur (11, 12). Nöronlarda Ca^{2+} toksisitesi hakkında çok şey bilmemize rağmen glia hücrelerinde Ca^{2+} 'un oluşturduğu hasar konusunda oldukça az çalışılmıştır. Kültürü yapılmış oligodendrositler ve schwann hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda Ca^{2+} fazlalığının hücrede ciddi hasara, hatta ölüme neden olduğu gösterilmiştir (54). Astrositlerin ise eksitotoksik uyarılara karşı daha dirençli olduğu düşünülmektedir.

İskemik durumlarda hücre dışı ortama salınan glutamat nöron zarında bulunan iGluR ve mGluR'leri ile etkileşmektedir. NMDA reseptör kanallarının açılması Mg^{2+} ve zar potansiyeli bağımlıdır. Kanalın açılması hücre dışındaki kalsiyumun hücre içinde birikimi ile sonuçlanmaktadır. Bu birikim, fosfolipazlar, protein kinaz C gibi enzimlerin aktifleşmesine ve nitrik oksit oluşumuna neden olmaktadır. Bu olayların yeterli miktarda enerji olmadığında gerçekleştiği düşünülmektedir. Metabotropik yol ise enerji olsa da olmasa da aktifleşmektedir. Glutamat, fosfolipaz C ile ilişkili reseptörle etkileşmekte ve inositoltrifosfat (IP₃) ikinci haberci yolunu başlatmaktadır. Fosfolipaz C'nin aktivasyonu ile zar yıkımı ve serbest yağ asidi birikimi sonucu Mg^{2+} konsantrasyonu aniden azalmaktadır. Hücre içi serbest Mg^{2+} konsantrasyonunun azalması hücre içi depolardan Ca^{2+} salınımını arttırmakta ve kalsiyum kaskadını aktive

etmektedir. Burada Mg^{2+} konsantrasyonunun azalmasına neden olan başlangıçtaki fosfolipaz C'nin aktivasyonudur. Bu mekanizmaya eksitotoksik mekanizma denir (48, Şekil 2.3).



Şekil 2.3: Nöronda eksitotoksik hasar mekanizması.

Rothman hipokampusteki nöronların glutamat, kainat ve NMDA nörotoksitesine Ca^{2+} iyonları ortamda yokken de duyarlı olduklarını gözlemiştir. Bunun yerine hücre dışı klorun ortamda olmamasının koruyucu olduğunu saptamış ve glutamat nörotoksitesinin pasif klorun hücre içine girmesinin ardından görülen depolarizasyon ile açıklanabileceği hipotezini ortaya koymuştur. Katyonların hücre içine sürüklenmesini hücreye su girmesi ve ardından hücre ölümü takip edecektir (52). Bu hipotez, nörodejenerasyon olayında Ca^{2+} iyonlarının anahtar rolü oynadığı görüşüne

ters düşmektedir (11). 1993 yılında Goldberg ve Choi sıçan neokorteks nöron kültüründe yaptıkları araştırmada hücre hasarını hücre dışı Ca^{2+} 'dan bağımsız ve hücre dışı Ca^{2+} 'a bağımlı olmak üzere iki kısma ayırmışlardır. Birincisi olan akut nöron şişmesi, Ca^{2+} ortamdan uzaklaştırıldığında artış göstermektedir. Nedeni ise hücre dışındaki Na^+ ve Cl^- iyonlarıdır. İkincisi ise gecikmiş hücre ölümüdür ve primer olarak Ca^{2+} 'un hücre içine girmesi ile ilişkilidir (22). Lee ve arkadaşları ise iskemik koşullarda akut olarak eksitotoksik Ca^{2+} birikiminin baskın olduğunu fakat iskemi sonrası geç dönemde Ca^{2+} 'un aşırı azalması ile hücrenin Ca^{2+} açlığına girdiğini düşünmektedirler. Bu nedenle geleneksel tedavi yöntemlerinin yanı sıra geç dönemde hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunu yükseltecek ilaçların kullanılmasının yararlı olabileceğini belirtmektedirler (40). Bu alternatif görüşü destekleyen bir araştırmada geçici global iskemi uygulandıktan üç gün sonra CA1 hipokampus nöronlarında hücre içi Ca^{2+} miktarının yüksek olmadığı ve voltaj kapılı Ca^{2+} kanal akımlarının azaldığı gösterilmiştir (14). Nörotoksisiteden sorumlu mekanizmaları ortaya koymak için yapılan çalışmalarda Ca^{2+} akımının yönü ile ilişkili molekülleri belirlemek üzere daha yeni tekniklere gereksinim olduğu açıktır.

2. 4 BEDENDE MAGNEZYUM DENGESİ

Mg^{2+} hücre içinde en çok bulunan ikinci katyondur. Birçok hücrel enzim ve homeostatik olaylar için gerekli bir kofaktördür. Özellikle ATPaz, fosfataz ve kinazlar gibi enzimlerin fosfat gruplarının transferinde görev almaktadır. DNA, RNA ve protein sentezindeki biyokimyasal reaksiyonlara katılmaktadır. Trombosit agregasyonunu azaltıcı etkisi vardır. İyon kanalları ve taşıyıcıların çalışmasını düzenlemektedir. Bedendeki en önemli dört katyondan biri olmasına rağmen serum ve doku Mg^{2+} düzeyleri arasında bir benzerlik olmaması, rutin serum Mg^{2+} ölçümlerine olan ilginin azalmasına neden olmuştur (44).

Bedendeki toplam Mg^{2+} miktarı 24 g (2000 mEq/L), serumdaki normal miktarı 2.5 mg/dl (2.1 mEq/L) dir. Bedendeki Mg^{2+} 'un % 53'ü kemikte, % 27'si kasta, % 19'u yumuşak dokularda, % 0.05'i eritrositlerde ve % 0.03'ü serumda bulunur. Serumda

bulunan hücre dışı Mg^{2+} 'un 33'ü proteine bağlı, % 12'si anyonlar ile bileşik halinde, % 55'i ise serbest iyonize formdadır (44).

Bedendeki Mg^{2+} dengesi gastrointestinal emilim ve renal atılım üzerindeki metabolik ve hormonal etkilerle düzenlenmektedir. Mg^{2+} 'un gastrointestinal emilimi diyetle ilişkilidir. Emilimi ileum ve jejunumdadır. Jejunumdaki emilimi D vitaminine bağımlıdır (13).

Mg^{2+} dengesinde diğer önemli organ böbreklerdir. Toplam plazma Mg^{2+} 'unun yaklaşık % 80'i glomerulustan süzülür. Filtrattaki Mg^{2+} 'un % 5-15'i proksimal tübülün düz ve kıvrımlı kısmında emilir. Henle kulpunun çıkan kalın kolunda Mg^{2+} 'un yaklaşık % 70'i korunur. Filtre edilmiş Mg^{2+} 'un % 10-15'i henle kulpunun distalinde (bunun % 70-80'i distal tubulde) emilir. Kıvrımlı distal tübülde sonra önemli bir Mg^{2+} emilimine rastlanmamıştır. Tübülün herhangi bir bölgesinde anlamlı bir salgılanma olduğu konusunda rapor bulunmadığından böbrek Mg^{2+} dengesinin emilimdeki değişimlerle sağlandığı düşünülmektedir. Sonuçta idrarda % 5'ten az Mg^{2+} atılımı görülür (44).

Hücre dışı Ca^{2+}/Mg^{2+} a duyarlı reseptör (Casr) Mg^{2+} taşınmasını düzenler. Hipermagnezemi ve hiperkalseminin idrar ile Ca^{2+} ve Mg^{2+} atılımını arttırdığı uzun süredir bilinmektedir. Bu olayda çıkan kalın kolun bazolateral zarında bulunan hücre dışı Ca^{2+}/Mg^{2+} a duyarlı reseptörün, tuz taşınmasını ve pasif Ca^{2+} , Mg^{2+} emilimini inhibe ettiği ortaya konmuştur (44).

Hücresel düzeyde Mg^{2+} , kalsiyum kanalları ve iyon taşınma mekanizmaları ile etkileşerek çeşitli hücrelerin zar özelliklerini değiştirebilmektedir. Kasta Mg^{2+} , çeşitli yollarla hücre içi Ca^{2+} miktarını etkileyebilir. Bunlar, sarkolemmal zarlardan Ca^{2+} akışının baskılanması, aktin üzerindeki bağlanma bölgeleri için Ca^{2+} ile yarışma ve adenil siklaz-cAMP sisteminin modülasyonudur. Mg^{2+} , damar ve kalp düz kasında hücre içinde veya zar kanalları üzerinde Ca^{2+} antagonisti olarak görev yapmaktadır. Ayrıca Na^+/K^+ ATPaz sistemi aracılığı ile özel olarak K^+ ile ilişki halindedir. Mg^{2+} bu önemli enzim sistemi için kofaktör olarak görev yapmaktadır. Böylece hücre zarındaki

Na^+ ve K^+ akışını etkilemektedir. Bu nedenle Mg^{2+} transmembran Na^+ ve K^+ gradientlerini sürdürmeye yardım eder ve zarın elektriksel potansiyelini belirlemektedir. Mg^{2+} ile ilişkili hastalıklarda Na^+/K^+ gradientleri ve transmembran potansiyelleri değişeceği için nöromusküler uyarılabilirlik değişebilmekte, hatta K^+ azalmasına neden olabilmektedir. Sonuçta, hücre içi Mg^{2+} azalması Na^+/K^+ ATPaz aktivitesi, $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ kotransportunu bozar ve K^+ kanallarından K^+ 'un hücre dışına çıkışını arttırmaktadır (13).

Sıçan astrositlerinde dijital görüntü mikroskopisi ile ölçüldüğünde hücre içi Mg^{2+} 'un bazal seviyesi $125 \mu\text{M}$ iken, beyin damar kasları, nöronlar, kalp miyositleri ve endotel hücreleri $400-800 \text{ mM}$ düzeyinde Mg^{2+} içermektedirler. Bu durumda astrositler, diğer hücre tiplerinin $1/4$ 'ü kadar düşük miktarda Mg^{2+} içermektedir. Mg^{2+} 'un düzenlediği 325 enzimin çoğu $400-1.000 \mu\text{M}$ hücre içi Mg^{2+} miktarında optimal olarak çalışmaktadır. Astrositlerdeki enzim-substrat etkileşimleri ya bedende diğer hücrelere göre daha etkili olan sitozolik serbest Mg^{2+} 'un kullanımı ile gerçekleştirilmekte ya da bu hücre tipinde farklı formdaki Mg^{2+} 'un birkaç katını içermelidirler (2). Diğer araştırmadan farklı olarak Tholey ve arkadaşları tavuk beyin korteks glia hücrelerinde Mg^{2+} miktarını atomik absorpsiyon spektroskopisiyle 7 mM olarak bulmuşlardır (58). Nöropil glia hücrelerinde yapılan bir araştırmada da hücre içi Mg^{2+} miktarını düzenleyen mekanizmanın $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ antiportu olduğu bulunmuştur (31).

Sıçan beyninden izole edilmiş $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ değişimcisinin cDNA'sı aktarılmış CCL39 fibroblastlarında yapılan bir çalışmada, hücre dışı Mg^{2+} miktarı 10 mM 'a yükseltildiğinde hücre içine doğru Mg^{2+} akışı görüntülenmiş ve $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ değişiminin Mg^{2+} 'u da taşıyabileceği ve Mg^{2+} 'un hücreden dışarı çıkışında rolü olabileceği ortaya konmuştur (57).

Uyarılabilen hücrelerde zar Mg^{2+} taşınmasını inceleyen bir derlemede şu sonuçlara varılmıştır:

- 1-Hücre içi K^+ ve Cl^- iyonlarının dengesi için Na_i/Mg_0 değişimi gereklidir.
- 2-Uyarılabilen hücrelerde K_i ve Cl_i , Na_i ile eşit miktarlarda birlikte taşınım şeklinde taşınmaktadırlar.

3-Hücre dışındaki Na^+ 'a bağımlı Mg^{2+} çıkışı voltaja duyarsızdır ve ATP'ye ihtiyaç duymaktadır.

4-Hücre dışı Mg^{2+} 'a bağımlı Na^+ girişi de vardır.

Ardından tüm bu iyonları içeren $2\text{Na}^++2\text{K}^++2\text{Cl}^-: 1 \text{Mg}^{2+}$ değişim modeli oluşturmuşlardır (50).

2.5 BEYİNDE TRAVMA SONRASI MAGNEZYUM

Beyin travması çalışmalarında manyetik rezonans spektroskopi ile yapılan ölçümlerde travma sonrası serbest Mg^{2+} konsantrasyonu ortalama olarak $0.8 \pm 0.1 \text{mM}$ olarak belirlenmiştir. Travmatik beyin hasarından sonra serbest Mg^{2+} konsantrasyonu yaklaşık % 60 oranında azalmaktadır. Bu çalışmalarda travma sonrası 6 saat içerisinde Mg^{2+} miktarında herhangi bir artış belirlenememiş, ancak 7. günden itibaren travma öncesi düzeyine yükseldiği görülmüştür. Toplam doku Mg^{2+} miktarındaki azalmanın derecesinin nörolojik sonuç ile doğrudan ilişkili olduğu ortaya konmuştur. Diyet sonucu beyin serbest Mg^{2+} konsantrasyonu azaldığında orta derecede travma sonrası aşırı bir hasarın oluştuğu, zıt olarak hasardan önce Mg^{2+} konsantrasyonu artırıldığında nöron koruma sağladığı belirlenmiştir (48).

Bedendeki 300'den fazla enzim yaklaşık 1mM Mg^{2+} konsantrasyonunda optimum aktivite göstermektedir. Bu nedenle serbest Mg^{2+} konsantrasyonundaki herhangi bir değişim metabolik kontrolün yitirilmesine neden olabilmektedir. Bu enzimler arasında glikoliz, Krebs döngüsü ve iyon dengesini düzenleyen enzimler yer almaktadır. Mg^{2+} miktarının 0.25mM 'ın altına düşmesi durumunda DNA transkripsiyonu, RNA oluşumu ve protein sentezi de baskılanacaktır. Mg^{2+} aynı zamanda kalsiyum kanallarının doğal antagonistidir ve Mg^{2+} konsantrasyonundaki her azalma kalsiyum konsantrasyonunda artışa neden olacaktır. Böyle bir etki beyindeki vazospastik cevapta artışın ve kan akımındaki bölgesel azalmaların kaynağını oluşturmaktadır (48).

Travma sonrası Mg^{2+} miktarında ciddi azalma varsa, sitozolik fosforilasyon yeteneği yaklaşık % 40 oranında azalmaktadır. Bu azalma Na^+/K^+ ATPaz fonksiyonu gibi son derece önemli olayları etkilemektedir. Sonuçta, Mg^{2+} miktarındaki azalma zar bütünlüğünü ve geçirgenliğini bozmaktadır. Normal koşullarda, fosfolipid yıkımı ve sentezi arasında mükemmel bir denge vardır. Patofizyolojik koşullarda ise bu denge bozulmakta ve sentez azalırken, yıkım artmaktadır. Sentez miktarı, Mg^{2+} miktarı ile doğrudan ilişkilidir. Mg^{2+} 'da herhangi bir azalma durumunda serbest yağ asitleri ve serbest radikallerin miktarı artış göstermektedir (48).

$MgSO_4$ 'ın iskemi ve travma nedeniyle oluşan nöronal hasarı önlediği gösterilmiştir (18,39,43). Deneysel omurilik iskemisinden sonra da Mg^{2+} tedavisi nörolojik disfonksiyonu iyileştirmiştir (51). Mg^{2+} 'un nöroprotektif etkisi çeşitli mekanizmalarla açıklanabilir. Birincisi, kan akımı üzerine etkisidir. Damar düz kasında Ca^{2+} akışını azaltarak doz bağımlı bir vazodilatasyon yapmaktadır. Bunun dışında Ca^{2+} ile yarışarak hücre içindeki Ca^{2+} birikimini ve böylece hücre ölümünü engellemektedir. Ayrıca trombosit agregasyonunu azaltarak, dolaşımı sağlamaktadır. Mg^{2+} 'un hiperglisemik etkisi de nöron koruma özelliğini artırabilir (43).

İskemi ve anoksi sırasında hücre içine Ca^{2+} girişinin arttığı gösterilmesi üzerine Kass ve arkadaşları hipokampal kesit modelinde, nöronlar üzerinde anoksik hasar oluşturmuşlardır (35). Bu modelde, nöron içine Ca^{2+} girişini engelleyen nimodipin, Mg^{2+} ve kobalt kullanarak, bu maddelerin koruyuculuk oranlarını araştırmışlardır. 2 mM kobalt ve 10 mM Mg^{2+} hipokampusteki nöronal iletinin normale dönmesini hızlandırırken, nimodipin herhangi bir etki oluşturamamıştır. Anoksi sırasında ATP miktarındaki azalma, ortamda Mg^{2+} bulunurken iyileşme göstermiş; oysa nimodipin hücre ATP miktarı üzerinde de koruyucu bir etki oluşturamamıştır. V79 ve BAL/3T3 fibroblastları üzerinde yapılan bir araştırmada Mg^{2+} 'un nikelin uyardığı sitotoksiteyi ve reaktif oksijen türevlerini azalttığı gösterilmiştir (32). Kültürü yapılmış endotel hücrelerinde de Mg^{2+} eksikliğinin H_2O_2 salınımını artırarak, GSH'ı ve katalaz aktivitesini azaltarak, hücre içi antioksidan sistemini kötü yönde etkilediği bulunmuştur (65).

2.6 LAZAROİDLER

İskemi ya da travma sonrası oluşan eksitotoksik mekanizma sonucunda hücreiçi Ca^{2+} miktarı artış göstermektedir. Bu artış, fosfolipaz A_2 'nin aktifleşmesine, araşidonik asit birikimine ve araşidonik asidin lipoksijenaz ve siklooksijenaz metabolizması ile serbest radikal üretimine neden olmaktadır. Yine Ca^{2+} 'un aktifleştirdiği proteoliz ile ksantin dehidrojenazı ksantin oksidaza dönüşümü, ardından hipoksantin ya da ksantinin ürikaside okside olması ile süperoksit radikali oluşmaktadır. Ca^{2+} -kalmodulin ile nitrik oksit (NO) oluşumu, NO'nun süperoksit anyonu ile reaksiyona girmesi, oldukça hasar verici radikal olan peroksinitrit oluşumuna neden olmaktadır (48). Lazaroidler (21-aminosteroidler) lipid peroksidasyon inhibitörü olan antioksidan ilaçlardır. Son yıllarda lazaroidlerin hücre koruyucu mekanizmalarını belirlemek ve tedavi edici yönlerini değerlendirmek üzere birçok çalışma yapılmıştır. Karaciğer hasarı ve kalp kası değişimlerinde koruyucu oluşu, NMDA toksisitesi, iskemi ve siyanid toksisitesini engellediği bu çalışmalarla ortaya konmuştur. Antioksidan özellikleri geliştirilmiş yeni lazaroid bileşikleri geliştirilmiştir. Bunun için diğer 21-aminosteroidlerin bis-pyrrolidinyl-pyrimidinyl piperazine kısmına alfa-tokoferol halkası eklenmiş ve tirilazad sentezlenmiştir. Beklendiği üzere bu bileşikler (U-78517F ve onun stereoizomerleri olan U-83836E ve U-83836F) MSS hasarında E vitaminine göre çok daha güçlü bir etki oluşturmuşlardır (55). Lazaroidlerin bir grubu beyin kapiller endotelinde lokalize olma özelliğine sahipken, daha sonra geliştirilen bir grubu kan beyin engelini geçebilme özelliğine sahiptir (örneğin, U-83836E) (45). [(-)-2-[[4-(2,6-di-1-pyrrolidinyl-4-pyrimidinyl)-1-piperazinyl]]-methyl]-3,4-dihydro-2,5,7,8-tetramethyl-2H-1-benzopyran-6-ol(dihydrochloride)] lazaroid U-83836E etkili bir $\cdot OH$ radikali tutucusudur. Hipoksi/yeniden oksijenlendirmeye maruz bırakılan endotel hücrelerinde U-83836E radikallerin indüklediği zar lipid peroksidasyonunu engellemektedir (45). Yaptığımız bir araştırmada, lazaroidlerin (U-83836E ve U-74389G) düşük dozlarda koruyucu iken, 10 μM 'dan daha yüksek dozlarda antiproliferatif etkiye sahip olduğunu ortaya koyduk (16).

Sıçan embriyonik mezensefalik nöronları üzerinde in vitro yapılan bir çalışmada U-83836E'nin glutatyon sentez inhibisyonunun ardından ölümü engellediği gösterilmiştir (24). Sıçan beyincik granül hücrelerinde de glutamat toksisitesinin ardından U-83836E reaktif oksijen türevlerinin oluşumunu azaltırken, eksitotoksisite karşısında ancak kısmi koruyuculuk sağlamıştır (55). Diğer bir hücre kültürü çalışmasında U-83836E ve U-74389G sıçanlara implante edilen dopaminerjik nöronların yaşam süresini kontrole göre % 265 oranında arttırmıştır (34).

2.7 HÜCRE ÖLÜMÜ

Organizmadaki hücrelerde iki tip hücre ölümü tanımlanmıştır. Akut bir hasar sonucu kaza ile ölen hücrelerin genellikle önce şiştiği ve ardından parçalandığı bildirilmiştir. Ayrıca içeriklerini hücre dışı ortama salarak inflamasyona neden olmaktadır. Bu şekilde meydana gelen ölüm nekroz olarak isimlendirilmektedir. Programlı hücre ölümü ise embriyonik gelişimde ve ergin dokuların devamlılığında önemli rol oynayan, hücre ölümünün fizyolojik şeklini oluşturmaktadır. Yetişkinlerde programlı hücre ölümü, hücre döngüsü devam eden dokularda sabit hücre sayısının sürdürülmesi ve hücre çoğalmasının dengelenmesinden sorumlu olan ölüm tipini oluşturmaktadır. Örneğin, insanda günlük 5×10^{11} kan hücresi elimine edilmekte ve kemik iliğindeki üretimi dengelenmektedir. Ayrıca programlı hücre ölümü ile hasar görmüş ve zarar oluşturabilecek hücreler yok edilerek, organizmanın bir bütün olarak korunması sağlanmaktadır. Virüs ile enfekte hücreler sıklıkla programlı hücre ölümü altında bulunmaktadır. DNA hasarı geçirmek suretiyle, potansiyel olarak zararlı mutasyonlar taşıyan hücreler yok olmaktadır. Programlı hücre ölümünün diğer iyi tanımlanmış örneği ise memeli sinir sisteminde bulunmaktadır. Organizmada nöronlar çok fazla sayıda üretilmekte ve % 50'den fazlası programlı hücre ölümü ile yok edilmektedir. Hücrelerin akut bir hasar ile ölümünden zıt olarak programlı hücre ölümü aktif bir olaydır ve apoptoz olarak bilinen morfolojik değişim göstermektedir. Apoptoz sırasında DNA genellikle parçalanmakta, kromatin yoğunlaşmakta ve çekirdek apoptotik cisimler denen zar ile çevrelenmiş parçalara ayrılmaktadır. Apoptoz geçiren hücreler ve hücre parçaları böylece kolayca tanınmakta ve fagosite edilmektedirler (19).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 HÜCRELERİN ÜRETİLMESİ

3.1.1 C6 hücrelerinin üretilmesi

Sıvı nitrojen içinde dondurulmuş olarak saklanan C6 hücreleri, oda sıcaklığında çözüldükten sonra 1:1 oranında Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, Sigma) : nutrient mixture (F-12, Sigma), % 10 fetal dana serumu (Sigma) ve % 1 penisilin+streptomisin (Sigma) karışımını içeren santrifüj tüpü içinde 1000 devir/dk, 4 °C'de 5 dk santrifüj edildi. Üstteki süpernatant atılarak dondurma işleminde kullanılan dimetil sülfoksit (DMSO) uzaklaştırıldı. Dipteki hücreler, yukarıda belirtilen besiyeri bulunan 75 cm² flasklar içerisinde % 5 CO₂, 37 °C ve % 100 nem içeren inkübatörde çoğaltıldı ve hücreler flask tabanını % 85-90 oranında kaplayınca (ortalama 3 gün) deneye alındı.

3.1.2 İnsan glioblastoma multiforme hücrelerinin üretilmesi

Beyin ameliyatı sırasında elde edilen iki hastaya ait glioblastoma multiforme tümör örnekleri histopatolojik olarak değerlendirildi ve kalan tümör dokuları hücre kültürü yapmak üzere kullanıldı. Tümör örnekleri steril bir petri içinde, Ca²⁺ ve Mg²⁺ içermeyen sodyum fosfat tamponu (PBS, Sigma) ile yıkandıktan sonra bistüri ile parçalandı ve enzimatik ayrıştırma için Chen ve Mealey'in yöntemi izlendi (10). Bu amaçla hücre kümeleri % 0.25'lik tripsin-etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) sıvısı (Sigma) ile 37 °C'de 10-15 dk inkübe edildikten sonra 10 ml'lik pipet içine çekip bırakarak hücreler ayrıştırıldı. Tripsinin etkisi ortama besiyeri eklenerek yok edildi ve hücreler 4 °C, 1000 devir /dk'da 5 dk santrifüj edildi. Üstteki sıvı kısım atıldıktan sonra kalan hücreler 75 cm²'lik flasklar içine ekildi. İçinde 1:1 oranında DMEM ile F-12, % 10 fetal dana serumu ve % 1 penisilin+streptomisin bulunan besiyeri ile beslendi (59). Kùltürler % 5 CO₂, 37 °C ve % 100 nem içeren inkübatörde, hücreler flaskın tabanını kaplayıncaya kadar (13-18 gün) inkübe edildi ve haftada 2-3 kez beslendi.

Lamel üzerinde çoğaltılan tek sıralı hücrelerin glial kökenli olup olmadıkları, GFAP antikoru (Sigma) ile boyanarak ispatlandı (21). Elde edilen hücrelerin bir kısmı deneye alınırken, kalanı daha sonraki deneylerde kullanılmak üzere sıvı nitrojende donduruldu. Deneylerimizde dondurulmuş olarak saklanan bu hücreler, yukarıda anlatılan yöntemle çözülüp, aynı besiyeri içerisinde üretilerek elde edildi.

3.2 HÜCRELERİN DENEYE ALINMASI

Gerek C6 gerekse glioblastoma multiforme monolayer kültürleri, Ca^{2+} ve Mg^{2+} içermeyen Hank's Balanced Salt Solusyonu (HBSS, Sigma) ile yıkandı ve % 0.25 tripsin-EDTA uygulanarak tabandan kopmaları sağlandı. Hücreler $4^{\circ}C$, 1000 devir /dk'da 5 dk santrifüj edilerek Coulter marka sayıcı ile sayıldı. Hücrelerin canlı olup olmadıkları tripan mavisini kullanılarak belirlendi ve % 98'den fazlasının canlı olduğu bulundu. Hücreler 96 gözenekli kültür kapları içine, her bir gözeneğe 2×10^4 hücre denk gelecek şekilde ve on gözenekte kontrol, on gözenekte her bir ilaç dozu olacak şekilde ekildi. 24 saat inkübasyon süresinin ardından hücreler çalışmamızda kullandığımız ilaçlarla muamele edildi.

3.2.1 İlaçların hazırlanması ve MTT yöntemi

L-glutamat PBS içinde çözüldü ve hesaplanan miktarlarda doğrudan stok çözeltiden alınarak hücreler üzerine eklendi. U-83836E'nin 20 mM stok solüsyonunu elde etmek için DMSO içinde çözüldü. Sonra 2.5 mM stok solüsyon oluşturacak şekilde yağ asidi içermeyen 30 mg/ml bovine serum albumin (Sigma) ile seyreltildi. Yine bovine serum albumin kullanılarak, stok solüsyondan 1:10 oranında seri seyreltiler yapıldı ve 250 μ l besiyerine eklendiğinde U-83836E'nin 0.1 ve 1 μ M'lık dozları elde edildi (25). $MgSO_4$ F-12 içinde çözüldü ve seyreltiler yapıldı. Kullanılan tüm çözeltiler her deneyden önce kesinlikle taze olarak hazırlandı.

Deney grupları:

1. Kontrol grubu: Sadece besiyeri verilen grup.
2. L-glutamat grubu: % 50 öldürücü dozunu belirlemek üzere 10-25 mM arası dozlarda denendi.

3. L-glutamat + MgSO₄ grubu: L-glutamatın % 50 öldürücü dozu ile birlikte 0.01, 0.1 ve 1 mM dozlarında MgSO₄ kullanıldı (65).
4. L-glutamat + U-83836E grubu: L-glutamatın % 50 öldürücü dozu ile birlikte 0.1 ve 1 µM dozlarında kullanıldı (16).

Öncelikle hücreler üzerinde L-glutamatın % 50 öldürücü dozu belirlendi. L-glutamatın IC₅₀ (inhibitory concentration) değeri tüm ara dozların denenmesi ile bulundu. Elde edilen dozda L-glutamat 24 saat süreyle uygulandı, ardından uzaklaştırıldı ve MgSO₄ veya U-83836E dozları besiyerine eklendi. 24 saatin sonunda, ilaçların hücreler üzerindeki sitotoksitesisi Mosmann tarafından tanımlanan ve Alley tarafından geliştirilen 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue (MTT, Sigma) spektrofotometrik yöntemi ile belirlendi (1, 46). MTT her deneyden önce taze olarak 5 mg/ml PBS içinde hazırlandı ve 0.22 µm filtre kullanılarak steril filtre edildi. Her 250 µl besiyeri içine 25 µl MTT solüsyonu eklenerek 37 °C'de 4 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresinin ardından tüm besiyeri 96 gözenekli kültür kabınının her gözeneğinden alındı ve 100 µl DMSO her gözeneğe eklenerek, kültür kapları çalkalanarak 2-3 dk bekletildi. Oluşan formazan boya absorbansı kültür kabı okuyucusu (Biological Instruments) ile 550 nm'de okundu. Yapılan tüm deney grupları en az 3 kez tekrar edildi.

Canlı hücrelerin mitokondrisinde oluşan ve MTT'nin ürünü olan formazan yaşayan hücre sayısı ile korelasyon gösterdiğinden (7, 46), MTT analizi kontrol gözeneklerinde hücre büyümesinin yoğunluk sınırlaması gerçekleşmeden önce yapıldı. İlaç verilen gözeneklerde okunan optik yoğunluk kontrole göre yaşayan hücrelerin yüzdesine çevrildi. Bu işlem için aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\text{Her bir gözenekteki ilaç verilen hücre absorbansı} \times 100$$

Kontrol hücrelerinin ortalama absorbansı

Elde edilen veriler kontrolün ortalama % fraksiyonu \pm standart hata şeklinde ifade edildi. İstatistiksel değerlendirme tek yönlü varyans analizi ve ardından Tukey'in çok yönlü karşılaştırma testi ile gerçekleştirildi.

3.2.2 C6 ve insan glioma hücrelerinde kalsiyum ve magnezyum denemeleri

Glioma hücreleri üzerinde Ca^{2+} ve Mg^{2+} ,un etkilerini daha iyi irdeleyebilmek için yeni bir strateji geliştirdik. Bu amaçla içeriğinde Ca^{2+} veya Mg^{2+} bulunmayan DMEM-F-12 besiyeri kullandık. Ca^{2+} denemeleri için, hücreler deneye alındıktan ve 24 saat inkübasyon süresinin sonunda, 24 saat süreyle % 50 öldürücü dozda L-glutamat+ Ca^{2+} 'suz besiyeri (içine Mg^{2+} eklendi), L-glutamat+EDTA, L-glutamat+heparin, L-glutamat+10 mM Ca^{2+} ve L-glutamat+50 mM Ca^{2+} uygulaması yapıldı. 24 saatin sonunda ortamdan sadece L-glutamat uzaklaştırıldı ve 24 saat daha Ca^{2+} 'suz besiyeri, EDTA, heparin, 10 mM Ca^{2+} ve 50 mM Ca^{2+} uygulamasına devam edildi. 24 saatin sonunda MTT testine alındı. Heparin, inositol 1,4,5 trifosfat kapılı kalsiyum kanal antagonisti ve EDTA hücre dışındaki kalsiyumun tutucusu olduğu için kullanıldı (38).

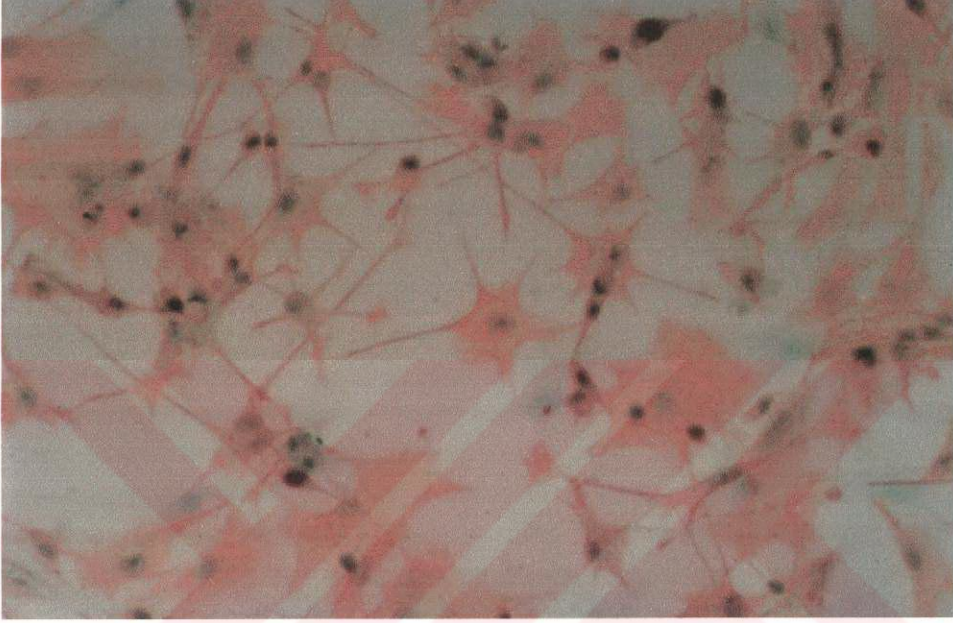
İlk 24 saat	İkinci 24 saat
L-glutamat + Ca^{2+} 'suz besiyeri (Mg^{2+} var)	Ca^{2+} 'suz besiyeri (Mg^{2+} var)
L-glutamat + EDTA	EDTA
L-glutamat + Heparin	Heparin
L-glutamat + 10 mM Ca^{2+}	10 mM Ca^{2+}
L-glutamat + 50 mM Ca^{2+}	50 mM Ca^{2+}

Mg^{2+} denemeleri için, içinde Mg^{2+} bulunmayan (Ca^{2+} eklendi) DMEM/F-12 kullanıldı. Hücreler deneye alındıktan ve 24 saatlik inkübasyon periyodunun ardından, 24 saat % 50 öldürücü dozda L-glutamat+ Mg^{2+} 'suz besiyeri, L-glutamat+farklı $MgSO_4$ dozları uygulandı. Sonraki 2 saatte sadece L-glutamat besiyerinden uzaklaştırıldı ve Mg^{2+} 'suz besiyeri veya $MgSO_4$ uygulamasına devam edildi. Deneyin sonunda MTT testine alındı.

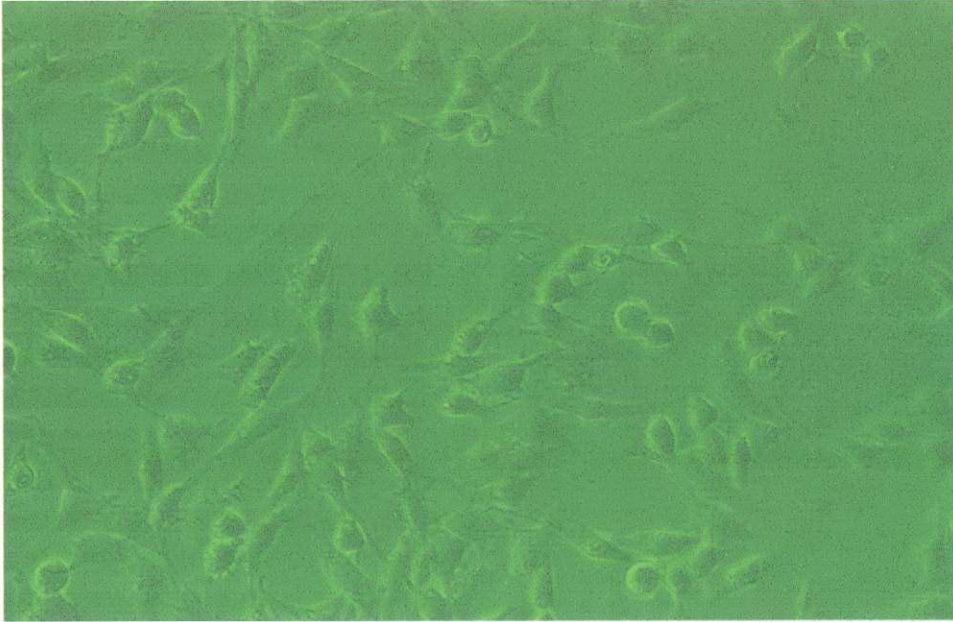
İlk 24 saat	İkinci 24 saat
L-glutamat + Mg^{2+} 'suz besiyeri (Ca^{2+} var)	Mg^{2+} 'suz besiyeri (Ca^{2+} var)
L-glutamat + 2 mM $MgSO_4$	2 mM $MgSO_4$
L-glutamat + 5 mM $MgSO_4$	5 mM $MgSO_4$
L-glutamat + 10 mM $MgSO_4$	10 mM $MgSO_4$
L-glutamat + 50 mM $MgSO_4$	50 mM $MgSO_4$
L-glutamat +100 mM $MgSO_4$	100 mM $MgSO_4$

4. BULGULAR

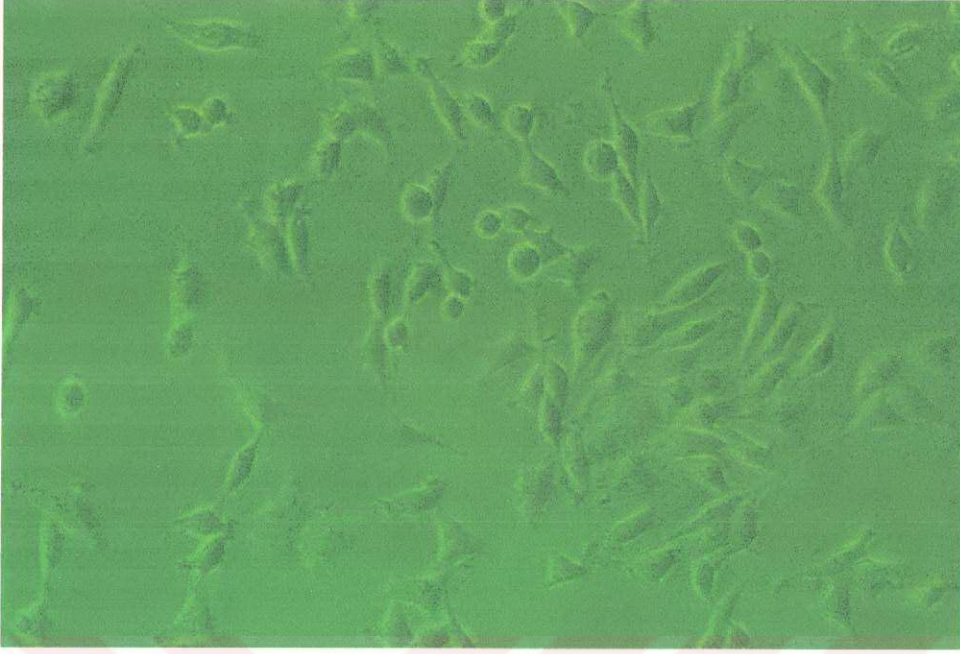
Hücrelerin glial kökenli olup olmadıkları GFAP'a karşı oluşturulan monoklonal antikör kullanılarak immunoperoksidaz boyamasıyla belirlendi ve % 80'den fazla hücrede pozitif bulundu (Şekil 4.1). C6 ve iki hastaya ait glioma hücrelerinin görüntüsü şekildeki gibiydi (Şekil 4.2, 4.3, 4.4).



Şekil 4.1: GFAP (+) insan glioblastoma multiforme hücrelerinin genel görüntüsü (20x).



Şekil 4.2: C6 sıçan glioma hücrelerinin genel görüntüsü (20x).



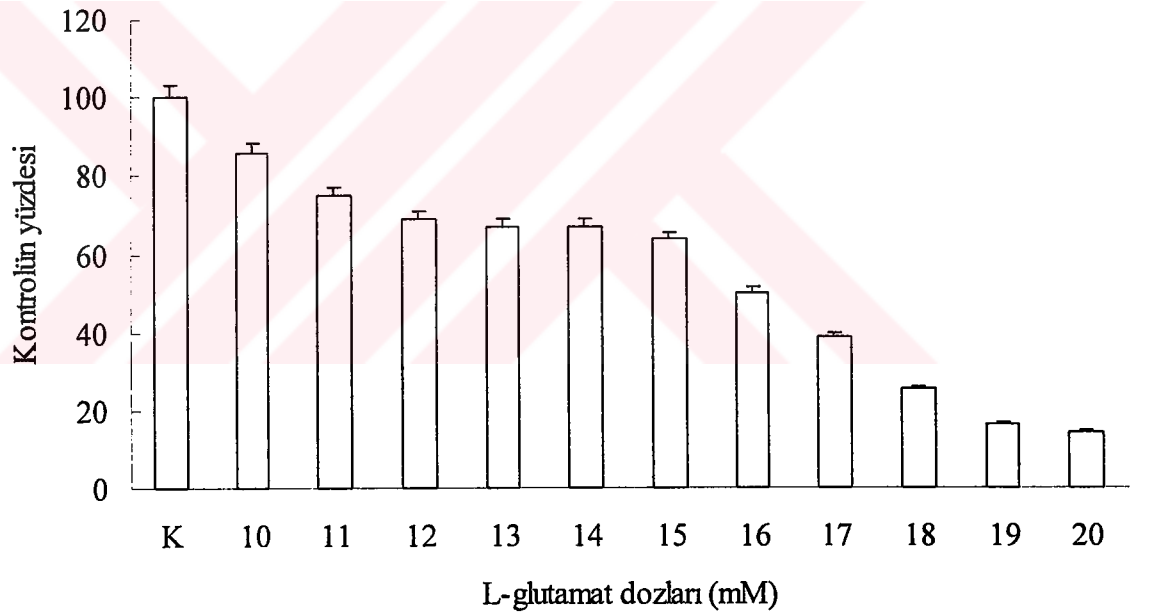
Şekil 4.3: Birinci hastaya ait insan glioblastoma multiforme hücrelerinin genel görüntüsü (20x).



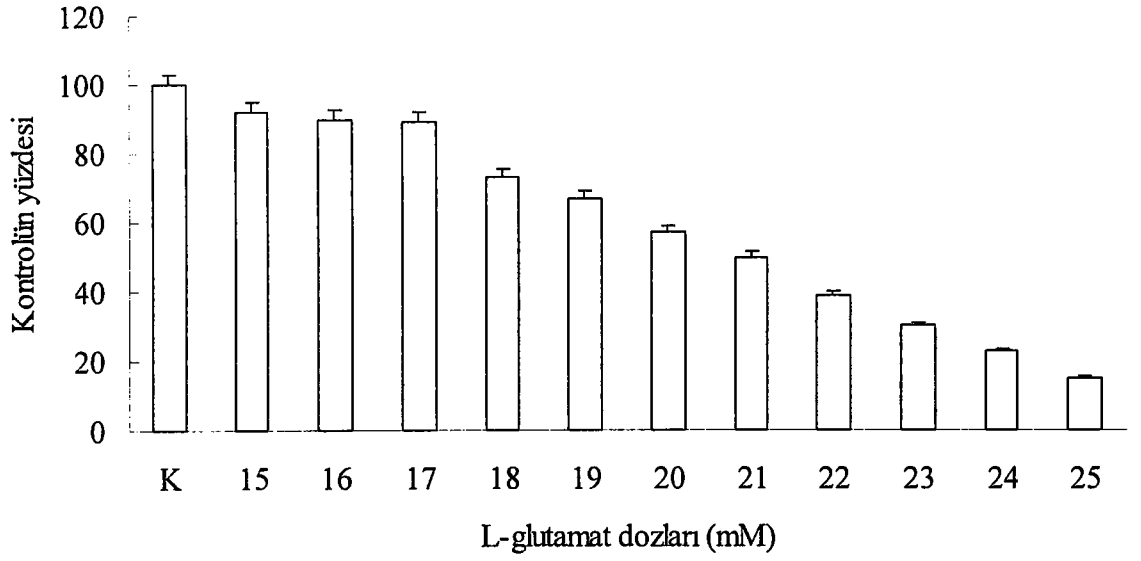
Şekil 4.4: İkinci hastaya ait insan glioblastoma multiforme hücrelerinin genel görüntüsü (20x).

4.1. L-GLUTAMAT IC₅₀ DEĞERLERİ

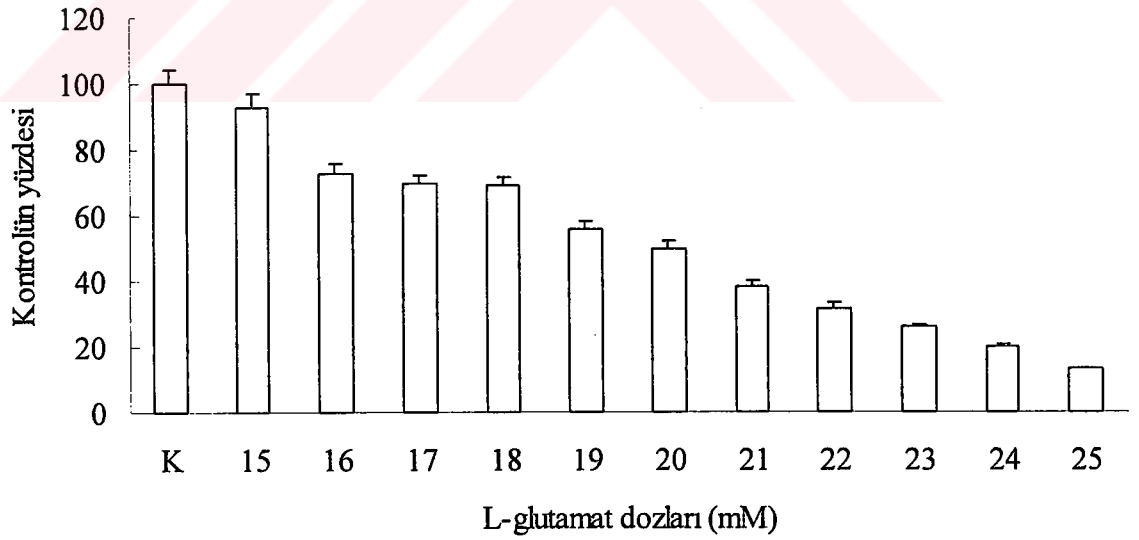
Farklı hücrelerin glutamat toksisitesine verdikleri yanıt değişim göstermekteydi. Hücrelerin % 50'sini öldüren L-glutamat konsantrasyonunu belirlemek için 10-25 mM arası L-glutamat dozları birer mM aralıklarla hücreler üzerinde denendi. C6 hücreleri üzerinde glutamatın % 50 öldürücü dozu (IC₅₀) 16 mM, birinci hastaya ait insan glioma hücrelerinde 21 mM, ikinci hastaya ait insan glioma hücrelerinde ise 20 mM olarak belirlendi. IC₅₀ dozundaki glutamat grupları ile kontrol kıyaslandığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır (p<0.001, Şekil 4.5, 4.6, 4.7).



Şekil 4.5: C6 hücrelerinde 10-20 mM arası dozlardaki L-glutamatın hücre yaşam oranına etkisi (n=24). Kontrol % 100 olarak kabul edilmiştir. IC₅₀ = 16 mM. K: Kontrol.

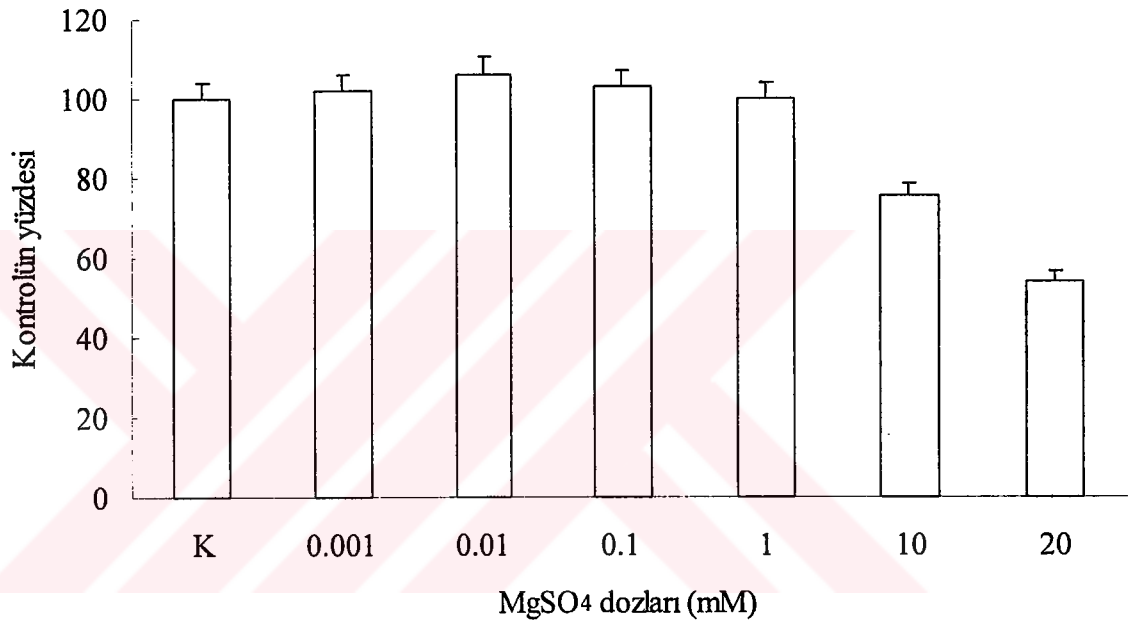


Şekil 4.6: Birinci hastaya ait insan hücrelerinde 15-25 mM arası dazlardaki L-glutamatın hücre yaşam oranına etkisi (n=24). Kontrol % 100 olarak kabul edilmiştir. $IC_{50} = 21$ mM. K: Kontrol.



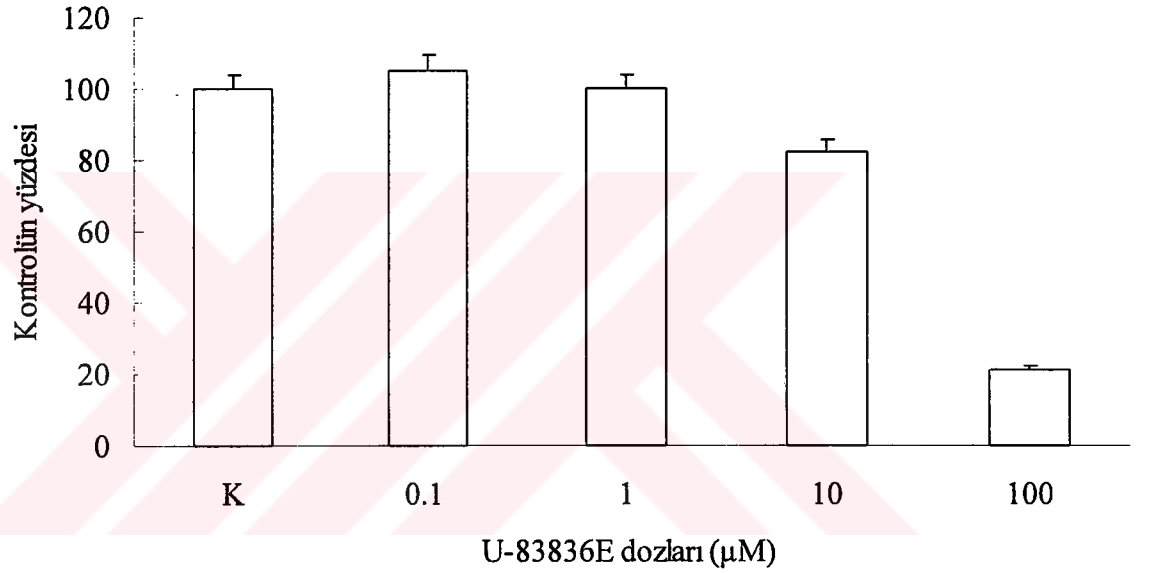
Şekil 4.7 : İkinci hastaya ait insan hücrelerinde 15-25 mM arası dazlardaki L-glutamatın hücre yaşam oranına etkisi (n=24). Kontrol % 100 olarak kabul edilmiştir. $IC_{50} = 20$ mM. K: Kontrol.

L-glutamat ile birlikte $MgSO_4$ uygulamasına geçilmeden önce üç hücre üzerinde de $MgSO_4$ 'ın tek başına hücre yaşam oranı üzerindeki etkisi test edildi. Sonuçlar üç farklı hücrede benzerdi. $MgSO_4$ 10 ve 20 mM dozlarında hücre çoğalmasını baskılayıcı yönde etki ettiğinden deney dışı bırakıldı. 0.01 ve 0.1 mM $MgSO_4$ 'ın hafif de olsa proliferatif etkisi gözlemlendi. Bu bulgulara bakılarak $MgSO_4$ 'ın 0.01, 0.1 ve $1\mu M$ dozlarının denenmesine karar verildi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: C6, birinci ve ikinci hastaya ait insan glioma hücrelerinin yaşam oranı üzerinde $MgSO_4$ 'ın etkisi. Kontrol grubu % 100 olarak kabul edilmiştir (n=24). K: Kontrol.

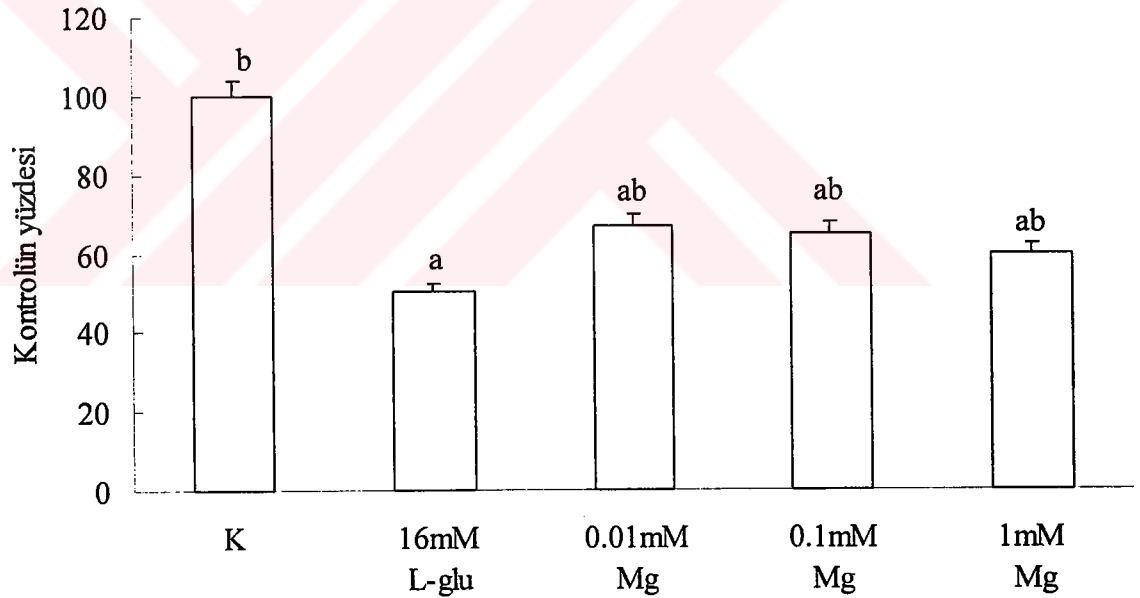
L-glutamat ile birlikte lazaroid U-83836E uygulamasına geçmeden önce, U-83836E'nin hücre yaşam oranları üzerindeki etkisini belirledik. Sonuçlarımız önceki lazaroidlerle ilgili makalemizde elde ettiğimiz sonuçlar ile uyumlu ve üç hücre serisinde de benzerdi (16). 0.1 μM 'da hafif proliferatif etkili, 1 μM 'da etkisiz, 10 μM 'da hafif toksik ve 100 μM 'da çok toksik etkili olduğu ortaya kondu. Bunun üzerine lazaroidin 0.1 ve 1 μM olmak üzere antioksidan etkili iki dozun denenmesine karar verildi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9: C6, birinci ve ikinci hastaya ait insan glioma hücrelerinin yaşam oranı üzerinde U-83836E'nin etkisi. Kontrol grubu % 100 olarak kabul edilmiştir (n=24). K: Kontrol.

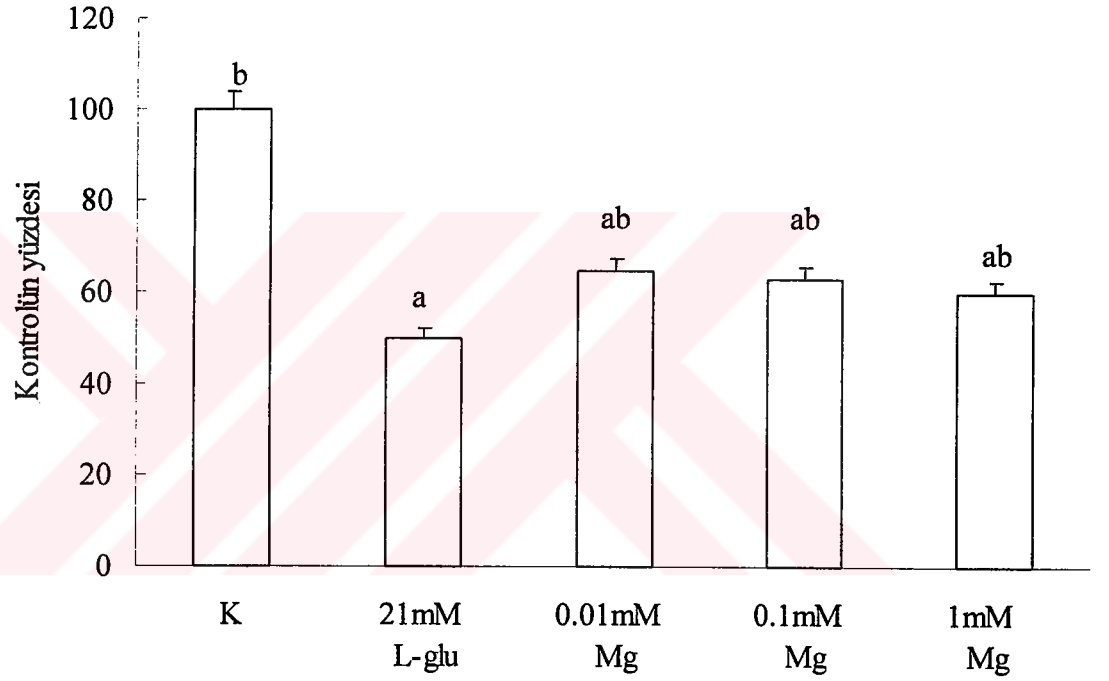
4.2. MgSO₄ SONUÇLARI

L-glutamatın IC₅₀ dozu 24 saat süreyle hücelere uygulandıktan sonra glutamat ortamdan uzaklaştırıldı ve 24 saat süreyle koruyucu amaçlı olarak 0.01, 0.1 ve 1 mM dozlarında MgSO₄ uygulaması yapıldı. 1 mM konsantrasyondaki MgSO₄, C6 hücrelerindeki yaşam oranını % 50'den % 60'a, 0.1 mM dozunda % 65'e ve 0.01 mM dozunda % 67'ye yükseltti. Bu değerler hem kontrol grubu, hem de glutamat grubuna göre anlamlı bir fark göstermekteydi ($p < 0.001$, Şekil 4.10). 0.01 mM ve 0.1 mM MgSO₄ grupları karşılaştırıldığında aralarında herhangi bir fark yokken ($p > 0.05$); 1 mM MgSO₄ grubu, 0.1 mM MgSO₄ grubundan ($p < 0.05$) ve 0.01 mM MgSO₄ grubundan farklılık göstermektedir ($p < 0.001$).



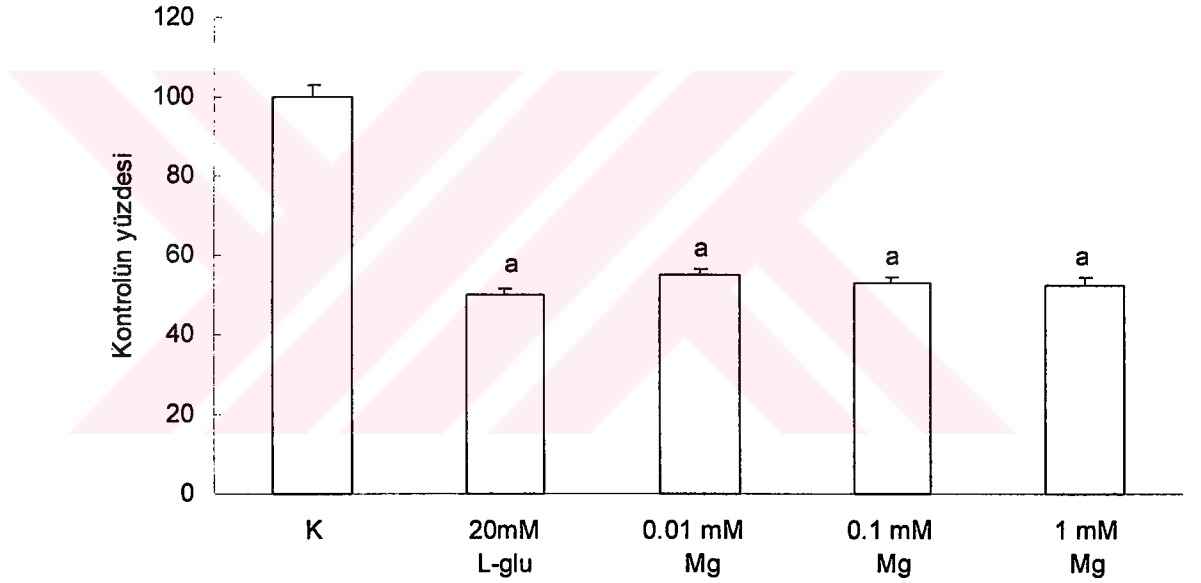
Şekil 4.10: 16 mM L-glutamat uygulamasının ardından verilen üç dozdaki MgSO₄'ün C6 hücre yaşam oranı üzerindeki etkisi. Kontrol % 100 olarak kabul edilmiştir. a: $p < 0.001$, tüm gruplar kontrol grubu ile, b: $p < 0.001$, tüm gruplar L-glutamat grubu ile kıyaslandığında. Tüm deney grupları için $n=24$. K: Kontrol.

MgSO₄ birinci hastaya ait glioma hücrelerinde, 1 mM dozunda hücre yaşam oranını % 50'den % 60'a, 0.1 mM dozunda % 63'e ve 0.01 mM dozunda % 65'e yükseltti. Elde edilen bu değerler hem kontrol hem de sadece glutamat uygulanan grup ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gösterdi (p<0.001, Şekil 4.11). Oysa MgSO₄'ün üç dozu kendi aralarında karşılaştırıldığında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (p>0.05).



Şekil 4.11: 21 mM L-glutamat uygulamasının ardından verilen üç dozdaki MgSO₄'ün birinci hastaya ait glioma hücre yaşam oranı üzerindeki etkisi. Kontrol % 100 olarak kabul edilmiştir. a: p<0.001, tüm gruplar kontrol grubu ile, b: p<0.001, tüm gruplar L-glutamat grubu ile kıyaslandığında. Tüm deney grupları için n=24. K: Kontrol.

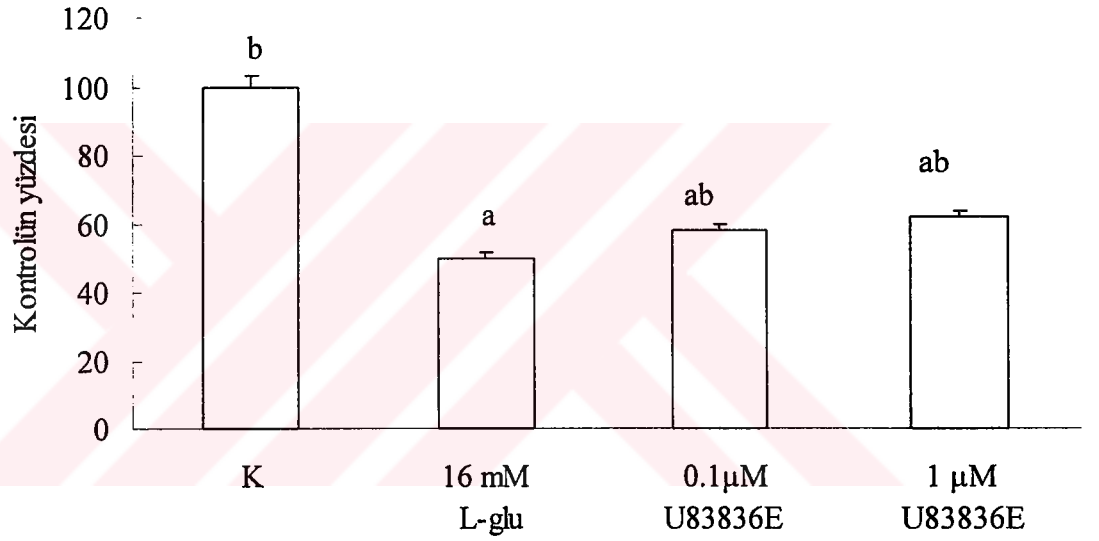
MgSO₄ ikinci hastaya ait glioma hücrelerinde, 1 mM dozunda hücre yaşam oranını % 50'den % 52.7'ye, 0.1 mM dozunda % 52.9'a ve 0.01 mM dozunda % 55'e yükseltti. Üç MgSO₄ grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdi (p<0.001). Tüm MgSO₄ grupları sadece L-glutamat uygulanan grup ile karşılaştırıldığında, hücre yaşam yüzdesinde bir artış olmasına rağmen, aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (p>0.05). Yine MgSO₄'ın üç dozu kendi aralarında karşılaştırıldığında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (p>0.05, Şekil 4.12).



Şekil 4.12: 20 mM L-glutamat uygulamasının ardından verilen üç dozda MgSO₄'ün ikinci hastaya ait glioma hücre yaşam oranı üzerindeki etkisi. Kontrol % 100 olarak kabul edilmiştir. a: p<0.001, tüm gruplar kontrol grubu ile kıyaslandığında. Tüm deney grupları için n=24. K: Kontrol.

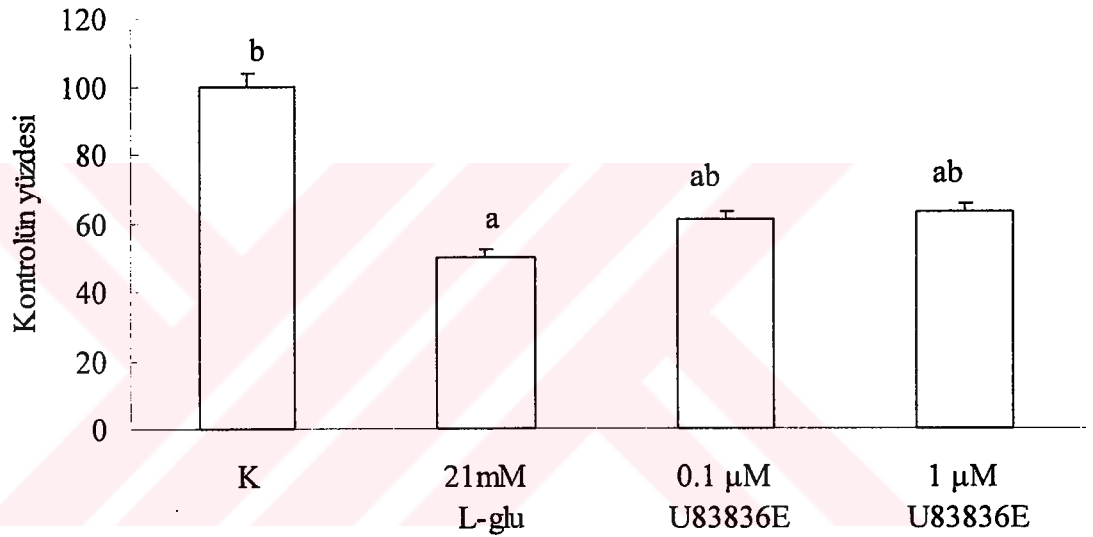
4.3 U-83836E SONUÇLARI

24 saat IC_{50} dozundaki glutamat uygulamasının ardından 24 saat süreyle verilen U-83836E, C6 yaşam oranını 0.1 μ M dozunda, % 8 ve 1 μ M dozunda ise % 12 oranında arttırdı. Bu değerler kontrol ve glutamat grubuna göre anlamlı farklılık gösterirken ($p < 0.001$); 0.1 ve 1 μ M U-83836E grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$, Şekil 4.13).



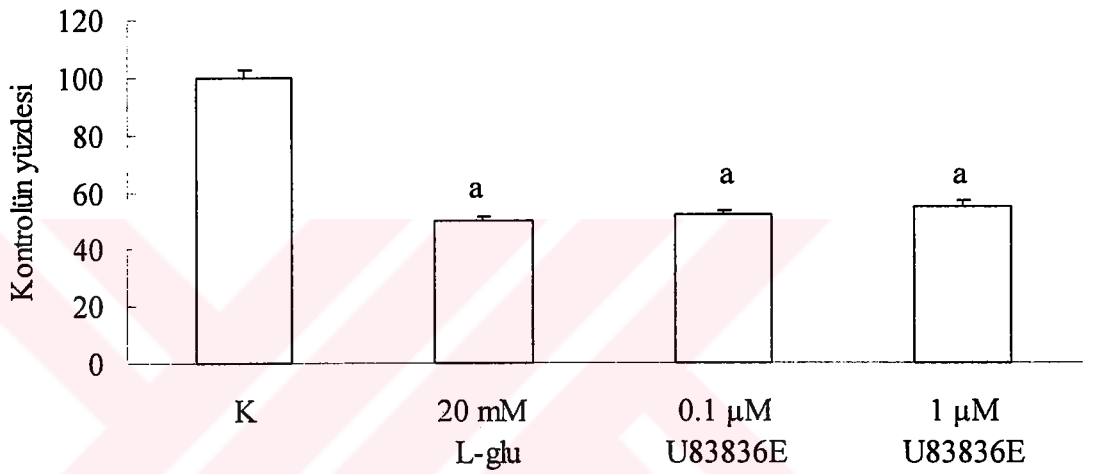
Şekil 4.13: 16 mM L-glutamat uygulamasının ardından verilen iki dozdaki U-83836E'nin C6 hücre yaşam oranı üzerindeki etkisi. Kontrol % 100 olarak kabul edilmiştir. a: $p < 0.001$, tüm gruplar kontrol grubu ile b: $p < 0.001$, tüm gruplar L-glutamat grubu ile kıyaslandığında. Tüm deney grupları için $n=24$. K: Kontrol.

Birinci hastaya ait glioma hücrelerinin yaşam oranını U-83836E, 0.1 μ M dozunda % 11 ve 1 μ M dozunda % 13 oranında arttırmıştır. Her iki dozdaki U-83836E'nin birinci hastaya ait insan glioma hücreleri üzerindeki etkisi, kontrol ve glutamat grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gösterirken ($p < 0.001$), iki doz birbiri ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemektedir ($p > 0.05$, Şekil 4.14).



Şekil 4.14: 21mM L-glutamat uygulamasının ardından verilen iki dozdaki U-83836E'nin birinci hastaya ait glioma hücre yaşam oranı üzerindeki etkisi. Kontrol % 100 olarak kabul edilmiştir. a: $p < 0.001$, tüm gruplar kontrol grubu ile b: $p < 0.001$, tüm gruplar L-glutamat grubu ile kıyaslandığında. Tüm deney grupları için $n=24$. K: Kontrol.

İkinci hastaya ait glioma hücrelerinin yaşam oranını U-83836E, 0.1 μ M dozunda % 2 ve 1 μ M dozunda % 4.9 oranında arttırmıştır. Her iki dozdaki U-83836E'nin ikinci hastaya ait insan glioma hücreleri üzerindeki etkisi, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gösterirken ($p < 0.001$), 20 mM L-glutamat grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemektedir ($p > 0.05$, Şekil 4.15). İki lazaroïd dozu birbiri ile karşılaştırıldığında, aralarında anlamlı bir fark mevcut değildir ($p > 0.05$).



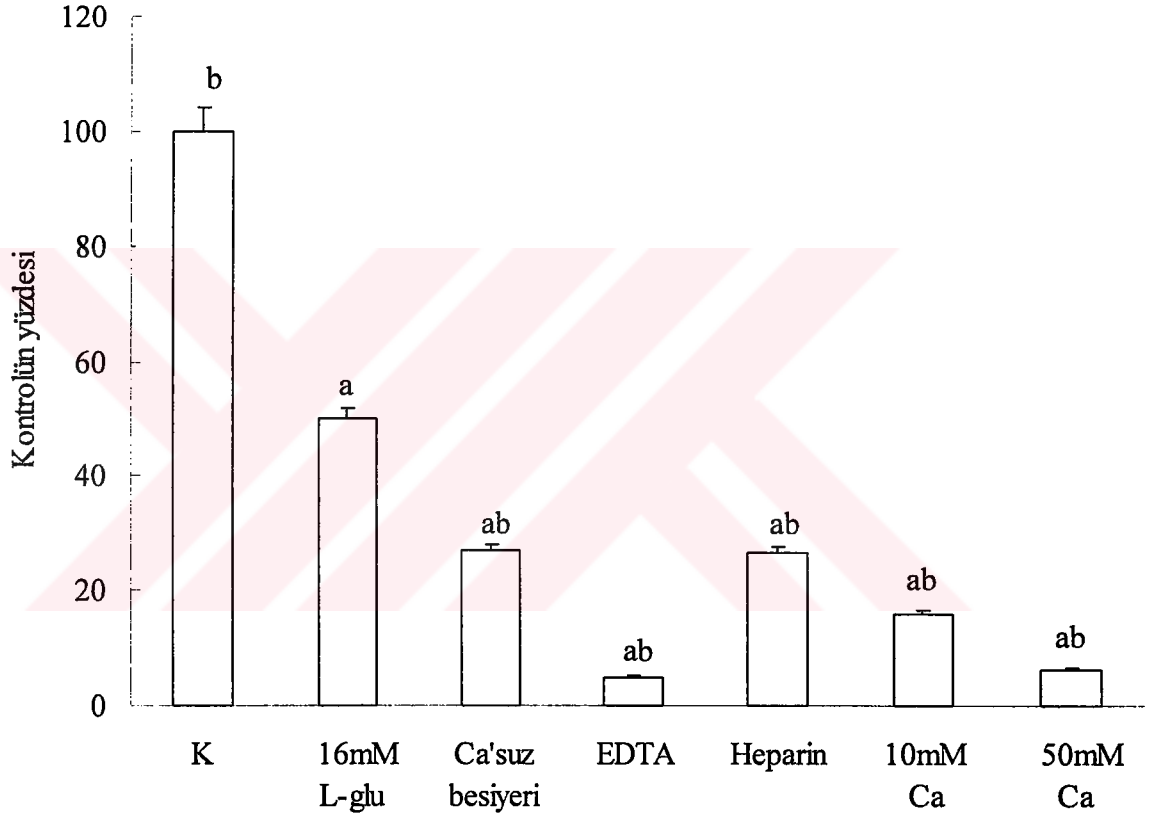
Şekil 4.15: 20mM L-glutamat uygulamasının ardından verilen iki dozdaki U-83836E'nin ikinci hastaya ait glioma hücre yaşam oranı üzerindeki etkisi. Kontrol % 100 olarak kabul edilmiştir. a: $p < 0.001$, tüm gruplar kontrol grubu ile kıyaslandığında. Tüm deney grupları için $n=24$. K: Kontrol.

4.1 KALSİYUM VE MAGNEZYUM VERİLERİ

4.1.1 C6 glioma hücrelerinde kalsiyum ve magnezyum verileri

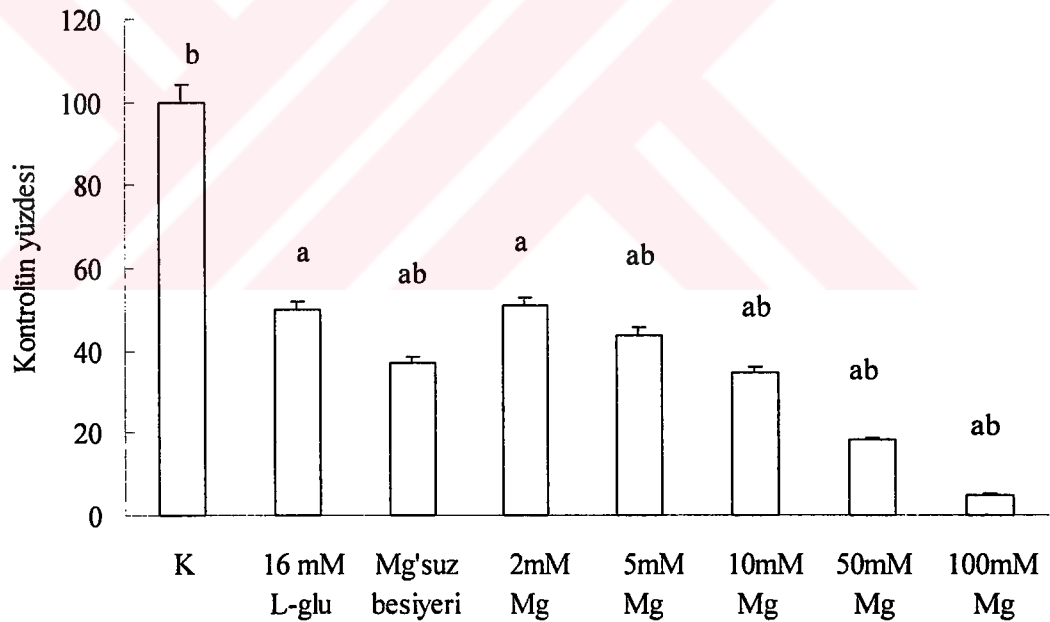
C6 sıçan glioma hücrelerinde Ca^{2+} 'un etkisini daha net gözleyebilmek için Ca^{2+} içermeyen DMEM/F-12 besi yeri kullanıldı. Sadece 16 mM L-glutamat uygulanan hücrelerin % 50'si yaşarken, L-glutamat+ Ca^{2+} içermeyen DMEM/F-12 besi yeri kullanılan grupta % 27, L-glutamat+EDTA grubunda % 5, L-glutamat+heparin grubunda % 26.5, L-glutamat+10 mM Ca^{2+} grubunda % 16, L-glutamat+50 mM Ca^{2+}

grubunda ise % 6.3'ünün yaşadığı görüldü. (Şekil 4.16). Kontrol grubu tüm gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p<0.001$). Tüm gruplar 16 mM L-glutamat uygulanan gruptan anlamlı olarak farklıdır ($p<0.001$). L-glutamat+ Ca^{2+} 'suz besi yeri grubu ile L-glutamat+heparin grupları birbiriyle ve L-glutamat+EDTA ile L-glutamat+50 mM Ca^{2+} grupları birbiriyle kıyaslandığında aralarında anlamlı bir fark yoktur ($p>0.05$). Bunun dışında diğer tüm gruplar arasında istatistiksel olarak fark vardır ($p<0.001$).



Şekil 4.16: Önce 24 saat 16 mM L-glutamat+EDTA, L-glutamat+ heparin, L-glutamat+ Ca^{2+} 'suz besi yeri, L-glutamat+10 mM Ca^{2+} veya L-glutamat +50 mM Ca^{2+} uygulanan, ardından 24 saatlik iyileşme döneminde sadece Ca'suz besiyeri, EDTA, heparin, 10 mM Ca veya 50 mM Ca verilen gruplardaki C6 hücre yaşam oranları. Kontrol grubu % 100 olarak kabul edilmiştir. a: $p<0.001$, tüm gruplar kontrol grubu ile b: $p<0.001$, tüm gruplar L-glutamat grubu ile kıyaslandığında. Tüm deney gruplarında en az n=24. K: Kontrol.

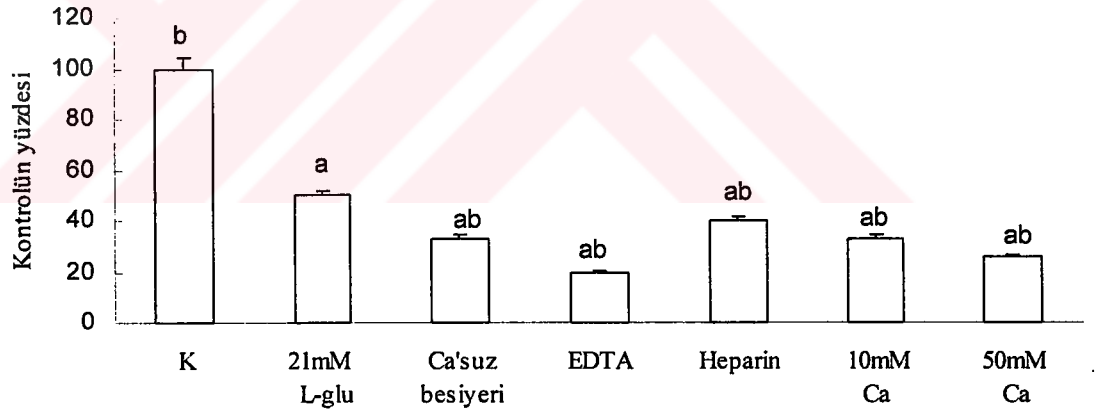
C6 hücrelerinde Mg^{2+} denemeleri için içeriğinde Mg^{2+} bulunmayan DMEM/F-12 kullanıldı. Sadece 16 mM L-glutamat uygulanan hücrelerin % 50'si yaşarken, L-glutamat+ Mg^{2+} içermeyen DMEM/F-12 besi yeri kullanılan grupta % 36.8, L-glutamat+2 mM $MgSO_4$ grubunda % 50.7, L-glutamat+5 mM $MgSO_4$ grubunda % 43.9, L-glutamat+10 mM $MgSO_4$ grubunda % 34.4, L-glutamat+50 mM $MgSO_4$ grubunda % 18.1, L-glutamat+100 mM $MgSO_4$ grubunda ise %4.9'unun yaşadığı görüldü. (Şekil 4.17). Kontrol grubu tüm gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p<0.001$). Tüm gruplar sadece 16 mM L-glutamat uygulanan gruptan 2 mM $MgSO_4$ grubu hariç anlamlı olarak farklıdır ($p<0.001$). L-glutamat+ Mg^{2+} 'suz besi yeri grubu ile L-glutamat+ 10 mM $MgSO_4$ grubu kıyaslandığında aralarında anlamlı bir fark yoktur ($p>0.05$). Bunun dışında diğer tüm gruplar arasında istatistiksel olarak fark vardır ($p<0.001$).



Şekil 4.17: Önce 24 saat 16 mM L-glutamat+ 2, 5, 10, 50, 100 mM $MgSO_4$, ardından L-glutamati uzaklaştırılmış $MgSO_4$ dozları uygulanmış C6 glioma hücrelerinin yaşam oranları. a: $p<0.001$, tüm gruplar kontrol grubu ile b: $p<0.001$, tüm gruplar L-glutamat grubu ile kıyaslandığında. Kontrol grubu % 100 olarak kabul edilmiştir. Tüm deney gruplarında en az $n=24$. K: Kontrol.

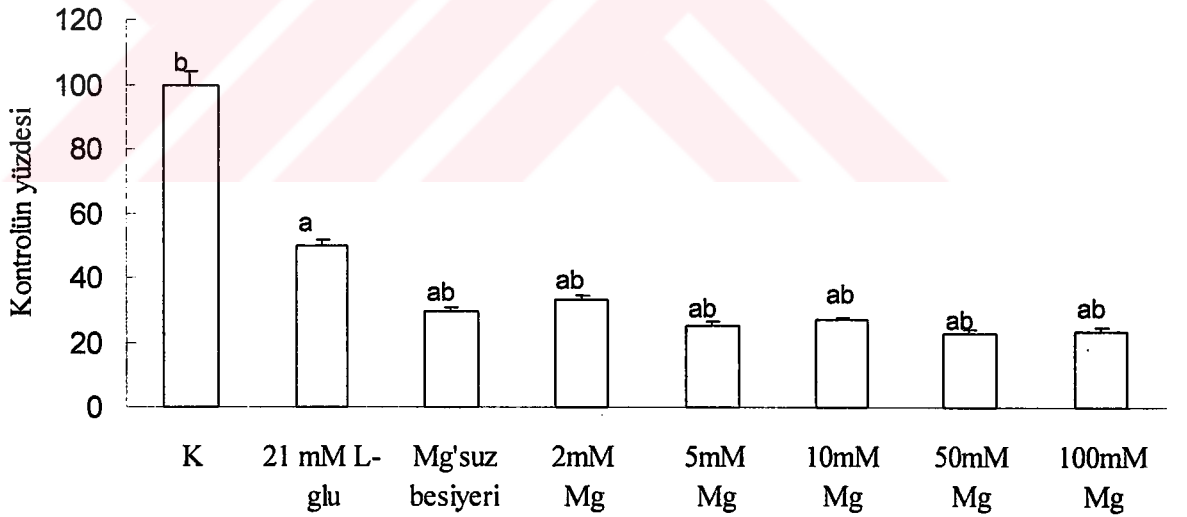
4.1.2 Birinci hastaya ait insan glioma hücrelerinde kalsiyum ve magnezyum verileri

Birinci hastaya ait insan glioma hücrelerinde Ca^{2+} denemelerine devam edildi. Sadece 21 mM L-glutamat uygulanan hücrelerin % 50'si yaşarken, L-glutamat+ Ca^{2+} içermeyen DMEM/F-12 besi yeri kullanılan grupta % 33, L-glutamat+EDTA grubunda % 19.4, L-glutamat+heparin grubunda % 40, L-glutamat+10 mM Ca^{2+} grubunda % 33.1, L-glutamat+50 mM Ca^{2+} grubunda ise % 25.7'sinin yaşadığı görüldü. (Şekil 4.18). Kontrol grubu tüm gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p<0.001$). Tüm gruplar sadece 21 mM L-glutamat uygulanan gruptan anlamlı olarak farklıdır ($p<0.001$). L-glutamat+ Ca^{2+} suz besiyeri grubu ile L-glutamat+10 mM Ca^{2+} grubu aralarında karşılaştırıldıklarında herhangi bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$). Bunun dışında diğer tüm gruplar arasında istatistiksel olarak fark vardır ($p<0.001$).



Şekil 4.18: Önce 24 saat süreyle 21 mM L-glutamat+Ca'suz besi yeri, 21 mM L-glutamat+EDTA, 21 mM L-glutamat+heparin, 21 mM L-glutamat+10 mM Ca^{2+} , 21 mM L-glutamat+ 50 mM Ca^{2+} uygulanan, ardından iyileşme döneminde sadece L-glutamatı uzaklaştırılarak, Ca^{2+} suz besiyeri , EDTA, heparin, 10 mM Ca^{2+} , 50 mM Ca^{2+} uygulanan gruplardaki birinci hastaya ait glioma hücre yaşam oranı. a: $p<0.001$, tüm gruplar kontrol grubu ile b: $p<0.001$, tüm gruplar L-glutamat grubu ile kıyaslandığında. Kontrol % 100 olarak kabul edilmiştir. Tüm deney gruplarında en az $n=24$. K: Kontrol.

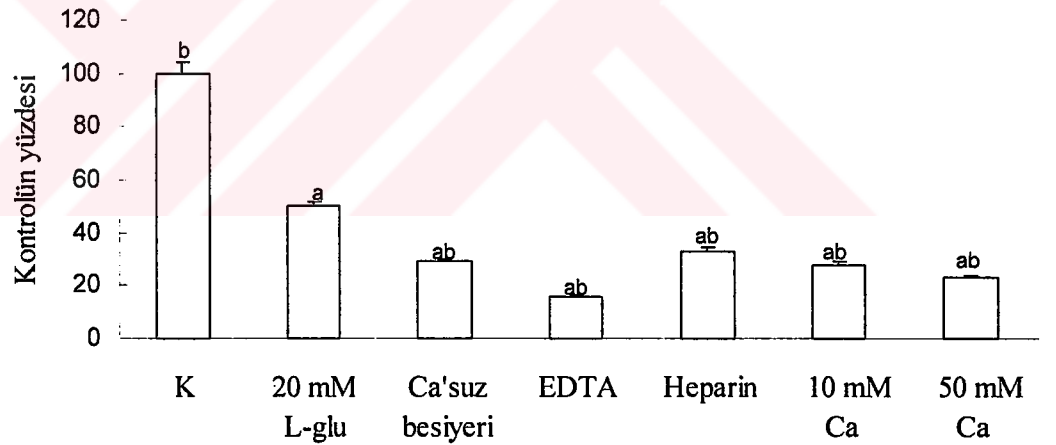
Mg²⁺ denemeleri için yine, içinde Mg²⁺ bulunmayan DMEM/F-12 kullanıldı. Sadece 21 mM L-glutamat uygulanan hücrelerin % 50'si yaşarken, L-glutamat+ Mg²⁺ içermeyen DMEM/F-12 besiyeri kullanılan grupta % 29.8, L-glutamat+2 mM MgSO₄ grubunda % 33.3, L-glutamat+5 mM MgSO₄ grubunda % 25.5, L-glutamat+10 mM MgSO₄ grubunda % 26.9, L-glutamat+50 mM MgSO₄ grubunda % 22.9, L-glutamat+100 mM MgSO₄ grubunda ise % 23.6 oranında hücrenin yaşadığı görüldü. (Şekil 4.19). Kontrol grubu tüm gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (p<0.001). Tüm gruplar sadece 21 mM L-glutamat uygulanan gruptan anlamlı olarak farklıdır (p<0.001). L-glutamat+ Mg²⁺,suz besiyeri grubu ile L-glutamat+ 5 mM MgSO₄ grubu ve L-glutamat+ 10 mM MgSO₄ grubu aralarında karşılaştırıldıklarında anlamlı bir fark mevcut değildir (p>0.05). Yine L-glutamat+ 5 mM MgSO₄ grubu, L-glutamat+ 10 mM MgSO₄ grubu, L-glutamat+ 50 mM MgSO₄ grubu ve L-glutamat+ 100 mM MgSO₄ grubu aralarında karşılaştırıldıklarında farklılık bulunamamıştır (p>0.05).



Şekil 4.19: Önce 24 saat süreyle 21 mM L-glutamat+2, 5, 10, 50 veya 100 mM MgSO₄, ardından L-glutamati uzaklaştırılmış MgSO₄ dozları uygulanan gruplardaki birinci hastaya ait glioma hücre yaşam oranları. a: p<0.001, tüm gruplar kontrol grubu ile b: p<0.001, tüm gruplar L-glutamat grubu ile kıyaslandığında. Kontrol grubu % 100 olarak kabul edilmiştir. Tüm deney gruplarında en az n=24. K: Kontrol.

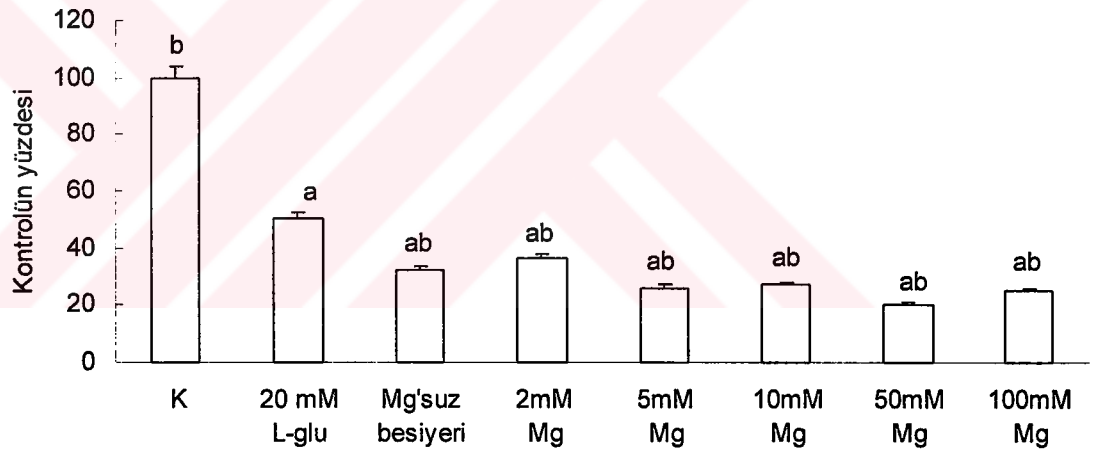
4.1.3 İkinci hastaya ait insan glioma hücrelerinde kalsiyum ve magnezyum denemeleri

İkinci hastaya ait insan glioma hücrelerinde Ca^{2+} denemelerinde, sadece 20 mM L-glutamat uygulanan hücrelerin % 50'si yaşarken, L-glutamat+ Ca^{2+} içermeyen DMEM/F-12 besiyeri kullanılan grupta % 29, L-glutamat+EDTA grubunda % 16, L-glutamat+heparin grubunda % 33, L-glutamat+10 mM Ca^{2+} grubunda % 28, L-glutamat+50 mM Ca^{2+} grubunda ise % 23'ünün yaşadığı görüldü. (Şekil 4.20). Kontrol grubu tüm gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p<0.001$). Tüm gruplar sadece 20 mM L-glutamat uygulanan gruptan anlamlı olarak farklıdır ($p<0.001$). L-glutamat+ Ca^{2+} ,suz besiyeri grubu ile L-glutamat+10 mM Ca^{2+} grubu aralarında karşılaştırıldıklarında herhangi bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$). Bunun dışında diğer tüm gruplar arasında istatistiksel olarak fark mevcuttur ($p<0.001$).



Şekil 4.20: Önce 24 saat süreyle 20 mM L-glutamat+Ca'suz besiyeri, 20 mM L-glutamat+EDTA, 20 mM L-glutamat+heparin, 20 mM L-glutamat+10 mM Ca^{2+} veya 20mM L-glutamat+ 50 mM Ca^{2+} uygulanan, ardından iyileşme döneminde sadece L-glutamati uzaklaştırılarak, Ca^{2+} ,suz besiyeri , EDTA, heparin, 10 mM Ca^{2+} veya 50 mM Ca^{2+} uygulanan gruplardaki ikinci hastaya ait glioma yaşam oranları. a: $p<0.001$, tüm gruplar kontrol grubu ile b: $p<0.001$, tüm gruplar L-glutamat grubu ile kıyaslandığında. Kontrol % 100 olarak kabul edilmiştir. Tüm deney gruplarında en az n=24. K: Kontrol.

Mg²⁺ denemeleri için yine, içinde Mg²⁺ bulunmayan DMEM/F-12 kullanıldı. Sadece 20 mM L-glutamat uygulanan hücrelerin % 50'si yaşarken, L-glutamat+ Mg²⁺ içermeyen DMEM/F-12 besiyeri kullanılan grupta % 32, L-glutamat+2 mM MgSO₄ grubunda % 36, L-glutamat+5 mM MgSO₄ grubunda % 26, L-glutamat+10 mM MgSO₄ grubunda % 27, L-glutamat+50 mM MgSO₄ grubunda % 20, L-glutamat+100 mM MgSO₄ grubunda ise % 25 oranında hücrenin yaşadığı görüldü. (Şekil 4.21). Kontrol grubu tüm gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (p<0.001). Tüm gruplar sadece 20 mM L-glutamat uygulanan gruptan anlamlı olarak farklıdır (p<0.001). L-glutamat+ 5 mM MgSO₄ grubu, L-glutamat+ 10 mM MgSO₄ grubu ve L-glutamat+ 100 mM MgSO₄ grubu aralarında karşılaştırıldıklarında farklılık bulunamamıştır (p>0.05). Diğer tüm gruplar birbirlerinden farklı bulunmuştur (p<0.001).



Şekil 4.21: Önce 24 saat süreyle 20 mM L-glutamat+2, 5, 10, 50 veya 100 mM MgSO₄, ardından L-glutamatı uzaklaştırılmış MgSO₄ dozları uygulanan gruplardaki ikinci hastaya ait glioma hücre yaşam oranları. a: p<0.001, tüm gruplar kontrol grubu ile b: p<0.001, tüm gruplar L-glutamat grubu ile kıyaslandığında. Kontrol grubu % 100 olarak kabul edilmiştir. Tüm deney gruplarında en az n=24. K: Kontrol.

Deneyler sonucunda elde edilen verilerin rakamsal değerleri Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1: Tüm deneylerin sonucunda elde edilen absorbands cinsinden rakamsal veriler. Veriler ortalama absorbands \pm standart hata şeklinde verilmiştir (n=24).

	C6	1. HASTA	2. HASTA
Kontrol	2.228 \pm 0.1594	2.145 \pm 0.0547	2.065 \pm 0.0829
Glutamat	1.110 \pm 0.1111	1.044 \pm 0.1521	1.050 \pm 0.1105
Glutamat+0.01mM MgSO ₄	1.486 \pm 0.1062	1.390 \pm 0.1438	1.136 \pm 0.0727
Glutamat+0.1 mM MgSO ₄	1.448 \pm 0.1049	1.348 \pm 0.0977	1.093 \pm 0.0485
Glutamat+1 mM MgSO ₄	1.340 \pm 0.1120	1.284 \pm 0.0828	1.090 \pm 0.0704
Glutamat+0.1 μ M U-83836E	1.292 \pm 0.0472	1.310 \pm 0.0408	1.076 \pm 0.0510
Glutamat+1 μ M U-83836E	1.375 \pm 0.0798	1.351 \pm 0.0675	1.135 \pm 0.0589
Glutamat+Ca'suz besiyeri	0.610 \pm 0.0392	0.715 \pm 0.0442	0.598 \pm 0.0315
Glutamat+EDTA	0.116 \pm 0.0157	0.418 \pm 0.0475	0.330 \pm 0.0324
Glutamat+Heparin	0.595 \pm 0.0445	0.859 \pm 0.0530	0.681 \pm 0.0418
Glutamat+ 10 mM Ca	0.357 \pm 0.0333	0.716 \pm 0.0436	0.578 \pm 0.0290
Glutamat+ 50 mM Ca	0.141 \pm 0.0239	0.552 \pm 0.0575	0.474 \pm 0.0356
Glutamat+Mg'suz besi yeri	0.820 \pm 0.0241	0.639 \pm 0.0841	0.660 \pm 0.0260
Glutamat+2 mM MgSO ₄	1.130 \pm 0.0715	0.714 \pm 0.0325	0.743 \pm 0.0331
Glutamat+5 mM MgSO ₄	0.979 \pm 0.0715	0.546 \pm 0.0296	0.536 \pm 0.0290
Glutamat+10 mM MgSO ₄	0.768 \pm 0.0611	0.577 \pm 0.0644	0.557 \pm 0.0210
Glutamat+50 mM MgSO ₄	0.408 \pm 0.0137	0.491 \pm 0.0366	0.413 \pm 0.0251
Glutamat+100mMMgSO ₄	0.110 \pm 0.0609	0.506 \pm 0.0313	0.516 \pm 0.0236

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bulgularımız glioma hücrelerinde L-glutamatın % 50 öldürücü dozunun türe bağlı olarak farklı olabileceğini göstermektedir. Tür farklılığına ilaveten glutamatın hücreler üzerindeki inhibitör dozu süreye ve kullanılan besiyerine bağımlı olarak da değişiklik göstermektedir. C6 hücrelerinde glutamat sitotoksitesisi üzerindeki tiol antioksidanlarının koruyuculuğunu gösteren bir araştırmada, Amerikan tipi kültür koleksiyonundan (American Type Culture Collection) üç farklı C6 hücresi alındığı, bu serilerden birinde glutamatın toksik konsantrasyonunun 28 saatte 10 mM, diğer ikisinde 20 mM olduğu, deneylerin ise 10 mM glutamatın toksik olduğu hücrelerde gerçekleştirildiği belirtilmiştir (26). Kato ve arkadaşları C6 hücrelerinde 48 saat süreyle uygulanan L-glutamatın IC₅₀ değerini 3.5 mM olarak bulmuşlardır. 24 saat süreyle uygulanan 10 mM L-glutamat ise hücrelerin yaklaşık % 50'sini öldürmektedir (36). Bizim IC₅₀ sonuçlarımızın diğer C6 hücreleriyle yapılmış olan çalışmalardan farklı olması, L-glutamatı 24 saat süre ile uyguladıktan sonra 24 saatlik bir iyileşme süresi vermemize bağlı olabilir. Besi ortamı olarak glukoz içeren tanımlanmış tuz solusyonu kullanan, astrositler üzerindeki bir araştırmada glutamatın gliotoksik etkisi 1 mM olarak bulunmuştur. Fakat serum ve DMEM'i besiyeri olarak kullanan astrositlerde hasar oluşturabilmek için ya daha yüksek konsantrasyonun ya da daha uzun sürenin uygulanması gerektiği belirtilmiştir. Nedeninin ise, DMEM ve serum içinde L-sistin gibi glutatyon öncülerinin bulunması olduğu, iyi büyüme koşullarının hücreiçi GSH miktarının daha yüksek düzeyde tutulmasını sağladığı belirtilmiştir (9).

Glia hücrelerinde glutamatın neden olduğu toksisitenin mekanizması ve tedavisi henüz tam olarak ortaya konamamıştır. Bu nedenle glutamat salınımının düzenlenmesi, glutamat reseptör antagonizmi veya lipid peroksidasyonunun engellenmesi gibi eksitotoksik hasarı engelleyici olasılıklar üzerinde araştırmalar yoğun olarak devam etmektedir. Sıçanlarda beyin hasarı ve ödemin ardından hücreiçi serbest Mg²⁺ konsantrasyonunun azaldığı gösterilmiştir (28, 29). Hücreiçi Mg²⁺ eksikliğinin nörolojik disfonksiyonu ve sıçanlarda beyin hasarının ardından ölüm oranını arttırdığı ortaya konmuştur. Bu bilgilere dayanarak iskemi ve travma sonrasında Mg²⁺ desteğinin

koruyucu olabileceği düşünölmüş, yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda Mg^{2+} 'un nöronal hasarı engellediği gösterilmiştir (18, 39, 43, 51). Bilindiği üzere glioma hücreleri, glia hücre özelliklerinin araştırılması, kültürdeki glia hücrelerinin yanıtlarının belirlenmesi ve glutamatın neden olduğu gliotoksisitede hücreyel olayların anlaşılması için uygun bir model oluşturmaktadır (23, 36).

$MgSO_4$ 0.01 mM konsantrasyonunda, L-glutamatın neden olduğu % 50'lik hücre yaşam oranını C6 sıçan glioma hücrelerinde % 17, insana ait iki glioma hücrelerinde % 15 ve % 5 yükseltmesi, $MgSO_4$ 'ın glutamat toksisitesi üzerinde koruyucu etkisinin bir ölçüde varolabileceğini ortaya koymaktadır. $MgSO_4$ 'ın neden olduğu bu artış sonucu elde edilen hücre yaşam oranı değeri kontrol grubu ile anlamlı farklılık göstermektedir. Ancak hücre sayısını kontrol grubuna yaklaştırması açısından dikkate değerdir. Beyin tümörleri salgıladıkları hormon, büyüme faktörleri ve içerdikleri reseptör türü ve sayısı bakımından bireysel farklılık gösterebilir. İkinci hastaya ait glioma hücrelerinde, diğer iki hücreye göre daha az bir koruyuculuğun gözlenmesi, bireysel farklılık nedeni olarak yorumlanabilir.

Mg^{2+} 'un, kalsiyum kanallarının doğal antagonisti olduğu ortaya konmuştur. Çalışmamızda dışarıdan verilen Mg^{2+} , Ca^{2+} ile yarışarak hücre içindeki Ca^{2+} birikimini ve böylece hücre ölümünü azaltmış olabilir. Ayrıca Mg^{2+} 'un hiperglisemik etkisi de hücre koruma özelliğini arttırmış olabilir. Mg^{2+} miktarının 0.25 mM'ın altına inmesi durumunda DNA transkripsiyonu, RNA oluşumu ve protein sentezinin baskılandığı bilinmektedir. Ayrıca glikoliz, Krebs döngüsü ve iyon dengesini düzenleyen hayati önemi olan enzimlerin optimum aktivite gösterebilmesi için Mg^{2+} 'a ihtiyaç olduğu bildirilmiştir (48). Besiyerine eklediğimiz 0.01, 0.1 ve 1 mM $MgSO_4$ hücrede bu olayların baskılanmasını engellemiş, enzimlerin normal aktivite göstermesini bir miktar da olsa arttırmış olabilir. Enzim aktivitesi, DNA ve protein sentezi değerlendirmesi yapamadığımız için belirtilen koruyucu özellikler spekülasyondan öteye gidememektedir. Çalışmamızda hücre yoğunluğunda artış sağlayan Mg^{2+} , glutamatın neden olduğu glioma hücre ölümünü tam olarak engellemekle birlikte, olayı etkileyen çok sayıda faktörden biri olabileceğini ortaya koymaktadır.

Kullandığımız 1 μ M dozundaki U-83836E, L-glutamatın neden olduğu % 50'lik yaşam oranını C6 hücrelerinde % 12, insan glioma hücrelerinde % 13 ve % 4.9 oranında artırması, U-83836E'nin glutamat toksisitesi üzerinde bir miktar koruyucu etkisi olduğunu ortaya koymaktadır. U-83836E'nin etkili bir \cdot OH radikali tutucusu olduğu bildirilmiştir. Hipoksi ve ardından oksijenlendirmeye bırakılan endotel hücrelerinde, U-83836E radikallerin başlattığı zar lipid peroksidasyonunu engellemektedir (45). Kainik asitle uyarılan nörotoksistide U-83836E'nin serbest radikal üretimini tamamen baskıladığı gösterilmiştir (6). Sıçan beyincik granül hücrelerinde de glutamat toksisitesinin ardından U-83836E reaktif oksijen türevlerinin oluşumunu azaltırken, eksitotoksiste karşısında ancak kısmi koruyuculuk sağlamıştır (55). Lazaroidlerin, birincil olarak lipid peroksidasyon baskılayıcısı olduğu ve bu nedenle diğer hücresel hedefleri koruyamadıkları bildirilmiştir. Lipid peroksidasyonu tam olarak baskılanmasına rağmen oksidanların uyardığı ATP eksikliği ve DNA zincir kırıkları zar bütünlüğünün, gen transkripsiyonunun ve hücre bölünmesinin kaybına neden olmaktadır. Böylece lipid peroksidasyonunun yokluğunda bile zar bütünlüğünün bozulması diğer hücresel hedefleri hasarladığı için oksidan hasarın daha sonraki safhalarına geçilmektedir (33). U-83836E'nin kültür ortamına eklenmesi ile glia hücre yoğunluğunda elde ettiğimiz artış, L-glutamat toksisitesinde serbest radikal üretimi ve lipid peroksidasyonunun da küçük bir rolü olabileceğine işaret etmektedir.

Bir çok *in vitro* çalışma oksidan stresin neden olduğu hücre hasarını engellemede lazaroid bileşiklerinin güçlü etkiye sahip olduğunu göstermektedir (24, 25, 34, 45, 55). Bununla beraber, *in vivo* şartlarda lazaroidlerin oksidatif hasarı engelleme yeteneğinin kesin olmadığı konusunda veriler bulunmaktadır. Doku nakli yapılan hastalarda merkezi sinir sistemi veya doku hasarını sınırlamak için lazaroid kullanan öncü klinik çalışmaların ümit verici olmadığı belirtilmiştir. Bunu test etmek için Huang ve arkadaşları böbrek tübül hücre serisini U-83836E ortamda varken veya yokken H_2O_2 'ye maruz bırakmışlardır. Erken ve geç dönemde lipid peroksidasyonu, laktat dehidrojenaz (LDH) salınımı, DNA hasarı ve ATP azalması ölçülmüştür. Erken dönemde U-83836E H_2O_2 'nin neden olduğu lipid peroksidasyonu ve LDH salınımını engellerken, DNA hasarını ve ATP azalmasını engelleyememiştir. Geç dönemde ise U-

83836E lipid peroksidasyonunu engellemesine rağmen herhangi bir koruyuculuk gösterememiştir. Doku naklinde, organ yada merkezi sinir sistemi hasarını engellemek için lazaroid kullanan öncü klinik çalışmaların ümit verici olmamasını, geç dönemde lazaroidlerin doku hasarını engellemedeki başarısızlığı ile açıklamışlardır (33).

Hücrede eksitotoksiteden Ca^{2+} iyonları sorumlu ise hücre dışındaki yada hücre içi depolardan salınan Ca^{2+} 'u uzaklaştırmanın hücre hasarını engelleyeceği düşüncesiyle besiyerindeki Ca^{2+} 'u uzaklaştırarak, hücre dışındaki Ca^{2+} 'u EDTA ile tutarak ve hücre içindeki IP_3 kapılı kalsiyum kanallarını bloklayan heparin kullanarak çalışmalarımızı tekrarladık. Ortamdan Ca^{2+} 'un uzaklaştırılması hasarı önlemek yerine tam tersi bir etki oluşturarak hasarı daha da arttırdı. Kontrol % 100 ve L-glutamat grubu % 50 iken, C6, birinci ve ikinci hastaya ait hücre yaşam oranı sırasıyla % 27.3, 33 ve 29 idi. 10 μM heparin uygulanması ise Ca^{2+} 'suz besiyeri kullanılan gruba kıyasla insana ait glioma hücrelerinde hücre yaşam oranını hafifçe arttırmasına rağmen (C6 hücrelerinde değil), sadece L-glutamat uygulanan grubun verilerine ulaşamadı. C6, birinci ve ikinci hastaya ait hücre yaşam oranı sırasıyla % 26.6, 40 ve 33 idi. Heparin ile hücre içi IP_3 kapılı Ca^{2+} kanallarını blokladığımızda istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir koruyuculuğun farkedilmesi, glioma hücrelerinde metabotropik reseptörlerin olayda rolü olabileceğini düşündürmektedir. Besiyerindeki Ca^{2+} konsantrasyonu 10 ve 50 mM 'a yükseltildiğinde hücrelerde doza bağımlı olarak hasarın arttığı gözlemlendi. 10 mM $CaCl_2$ verilen grupta, C6, birinci ve ikinci hastaya ait hücre yaşam oranları sırasıyla % 16, 33.3 ve 28 iken, 50 mM $CaCl_2$ grubunda % 6.3, 25.7 ve 23 idi. Ca^{2+} iyonlarının ortamda aşırı miktarda olmasının glutamat toksisitesini potensiyelize ettiği görüldü. Sonuç olarak, L-glutamat toksisitesi ve Ca^{2+} iyonları arasında doğrudan bir ilişki kurulamadı. Nöronlar üzerinde yapılan ve bulgularımızı destekleyen birçok çalışma bulunmaktadır (14, 22, 52). Verity ve arkadaşları uyarıcı aminoasitlerin Ca^{2+} eklenmemiş besi yerinde de nörotoksik olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu bulgular, hücre içine Ca^{2+} girişinin nöronal ölümden sorumlu olduğu hipotezini şüpheye düşürmüştür (60). Bulgularımız, Lee ve arkadaşlarının (40) iskemik koşullarda akut olarak Ca^{2+} birikiminin baskın olduğunu, iskemi sonrası geç dönemde Ca^{2+} 'un aşırı azalması ile hücrenin Ca^{2+} açlığına girdiği hipotezine de ters düşmektedir.

Beyincik kesitlerinde doğrudan Bergmann glia hücrelerinde Ca^{2+} kayıtları yapan bir araştırmada, glutamat uygulandıktan sonra Ca^{2+} içermeyen solüsyonların hücre içindeki Ca^{2+} yükselmesini engellemediğini ve hücre içindeki Ca^{2+} 'un kaynağının hücreiçi Ca^{2+} depoları olduğunu göstermişlerdir (38). Bu araştırmadaki bulguların bizim verilerimizle çelişmesi tamamen yöntem ve süre ile ilişkilidir. Onlar saniye ve dakikalar içerisinde uyarıcı aminoasitlerin Ca^{2+} ileti sistemi üzerindeki erken etkisini ortaya koyarken, biz L-glutamat verildikten 48 saat sonrasındaki hücre canlılığını geç dönemde değerlendirdik.

İskemik durumlarda nöronlarda olduğu gibi glia hücrelerinde de glutamatın Mg^{2+} azalmasına neden olup olmadığını araştırmak için, besiyerindeki Mg^{2+} 'un tamamı uzaklaştırıldı. Mg^{2+} içermeyen besiyerinde beklediğimiz gibi hücre yaşam oranı önemli azalma göstermektedir. Ancak ortama tedavi amaçlı Mg^{2+} eklendiğinde sadece 2 mM $MgSO_4$ grubunda hücre canlılığında bir artış gözlenmesine rağmen, doz yükseldikçe hücreler üzerindeki toksisite artış göstermektedir. Deneylerimizin birinci aşamasında normal DMEM/F-12 içine eklediğimiz 0.01, 0.1 ve 1 mM $MgSO_4$ 'ün az da olsa koruyucu etki göstermesi, Mg^{2+} 'un tamamen doz bağımlı bir etkisinin olduğunu, konsantrasyon arttıkça toksik etki oluşturduğunu göstermektedir.

Astrositik hücre ölümü ile diğer iyonlar arasında ilişki kurmaya çalışan araştırmalar bulunmaktadır. Nöronal hasar mekanizmasında önemli role sahip olan Na^+ iyonlarının, astrositik hücre ölümünde de görev alıp almadığını ortaya koymak üzere sıçan astroglial hücrelerinde yapılan bir araştırmada, hücrelere veratridin (Na^+ kanal açıcısı), monensin (Na^+ iyonoforu) ve 1mM glutamat (Na^+ ile birlikte taşınım) tek başına verildiğinde anlamlı bir hücre hasarının oluşmadığı, veratridin ve monensin, ouabain (Na^+/K^+ ATPaz ile Na^+ 'un çıkışını bloklar) ile kombine olarak 20 saat boyunca uygulandığında hücreiçi Na^+ birikiminin arttığı ve anlamlı hücre ölümünün meydana geldiği ortaya konmuştur. Na^+ içermeyen besiyeri oluşturmak için kolin (geçirgen olmayan katyon) kullanıldığında, monensin ve veratridinin sebep olduğu hücre ölümünün anlamlı olarak azaldığı belirtilmiştir. 1mM glutamat ile birlikte ouabain kullanıldığında ise anlamlı hücre ölümünün meydana gelmediği görülmüştür. Hücre

içine sodyum iyonlarının aşırı girmesinin astroglial hücre ölümüne neden olduğu sonucuna varılmıştır (56). Astrositik hücrelere glutamat ile birlikte ouabain verildiğinde anlamlı hücre ölümünün olmaması, glutamat toksisitesi ile Na⁺ iyonları arasında önemli bir ilişkinin olmadığını göstermesi açısından ilginçtir.

Glia hücrelerinde L-glutamatın neden olduğu olaylar dizisini etkileyen etkenleri tam olarak ortaya koyabilmek için daha detaylı araştırmaların yapılması gerektiği inancındayız. Özellikle hücre içi Ca²⁺ ve Mg²⁺ ölçümleri ile bulgularımız arasında herhangi bir korelasyonun olup olmadığı araştırılabilir. Rothman, hipokampus nöronlarının glutamat, kainat ve NMDA toksisitesinin hücre dışında klor iyonları olmadığı azaldığını göstermiş, glutamat nörotoksitesinden glutamatın neden olduğu depolarizasyonun ardından klor iyonlarının pasif olarak hücre içine girmesinin sorumlu olduğunu ortaya koymuştur (52). Bu teoriye dayanarak, glia hücrelerinde L-glutamat toksisitesi ve klor iyonları arasında bağlantı olup olmadığını araştırmak yeni bir yaklaşım olacaktır. Yine fosfolipaz C inhibitörlerinin glutamatın uyardığı nöron ölümünü engellediği ortaya konmuştur (42). Fosfolipaz C'nin metabotropik reseptörlerin işlevine aracılık ettiği bilinmektedir. Nöronlara benzer şekilde glia hücrelerinde de fosfolipaz C'nin baskılanarak glutamat toksisitesinde koruyucu etki oluşturup oluşturmadığını araştırmak da mekanizmayı aydınlatmaya yardımcı olabilir.

Sonuç olarak, MgSO₄ ve lazaroid U-83836E glutamat toksisitesi oluşturulmuş sıçan ve insan kaynaklı glioma hücre dizilerinde az da olsa koruyucu etki göstermektedir. Bu bulgu, Mg²⁺ iyonlarındaki azalmanın ve serbest radikal üretiminin glia hücrelerindeki glutamat toksisitesinde rolü olabileceğini önermektedir. Ca²⁺ iyonları ve glutamatın oluşturduğu hücre ölümü arasında doğrudan bir ilişki kurulamamakla birlikte, ortamda Ca²⁺ miktarının aşırı artmasının hücre ölümünü potansiyelize ettiğini söylemek mümkündür. Ayrıca heparin ile hücre içi IP₃ kapılı Ca²⁺ kanallarının bloklanmasının anlamlı olmasa da koruyuculuk göstermesi, glutamatın glioma hücrelerinde metabotropik reseptörlerini kullandığını ve hücre içi kalsiyum düzeyinin toksisitede rolü olabileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

1. ALLEY, M.C., SCUDIERO, D.A., MONKS, A. : Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay, *Cancer Res.*, 48: 589-601, (1988).
2. BABU, A.N., CHENG, T.P.O., ZHANG, A., ALTURA, B.T., ALTURA, B.M.: Low concentrations of ethanol deplete type-2 astrocytes of intracellular free magnesium, *Brain Res. Bulletin*, 50(1): 59-62, (1999).
3. BANKER, G., GOSLIN, K.: *Culturing Nerve Cells*, A Bradford Book The MIT Press London, England, (1991).
4. BORDEY, A., SONTHEIMER, H.: Electrophysiological properties of human astrocytic tumor cells in situ: enigma of spiking glial cells, *J. Neurophysiol.*, 79: 2782-2793, (1998).
5. BRIDGES, R.J., HATALAKI, C.G., SHIM, S.N., CUMMING, B.J., VIJAYAN, V., KUNDI, A., COTMAN, C.W.: Gliotoxic actions of excitatory aminoacids, *Neuropharm.*, 31: 899-907, (1992).
6. CAMINS, A., GABRIEL, C., AGUIRRE, L., SUREDA, F.X., PUBILL, D., PALAS, M., ESCUBEDO, E., CAMARASA, J.: U83836E prevents kainic acid-induced neuronal damage, *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 357: 413-418, (1998).
7. CARMICHAEL, J., DEGRAFF, W.G., GAZDAR, A.F. : Evaluation of tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing, *Cancer Res.*, 47: 936-942, (1987).

8. CHAN, P.H., CHU, L. CHEN, S.: Effects of MK-801 on glutamate-induced swelling of astrocytes in primary culture, *J. Neurosci. Res.*, 25: 87-93, (1990).
9. CHEN, C.J., LIAO, S.L., KUO, J.S.: Gliotoxic action of glutamate on cultured astrocytes, *J. Neurochem.*, 75(4): 1557-1565, (2000).
10. CHEN, T.T., MEALEY, J.: Microculture of human brain tumors, *Cancer Chemother. Rep.* 54: 9-14, (1970).
11. CHOI, D.W.: Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent, *Neurosci. Lett.* 58: 293-297, (1985).
12. CHOI, D.W.: Calcium: Still center-stage in hypoxia-ischemic neuronal death, *Trends Neurosci.*, 18: 58-60, (1995).
13. COLE, D.E., QUAMME, G.: Inherited disorders of renal magnesium handling. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 11: 1937-1947, (2000).
14. CONNOR, I.A.: Reduced voltage-dependent Ca² signaling in CA1 neurons after brief ischemia on gerbils, *J. Neurophysiol.* 81: 299-306, (1989).
15. DAIKHIN, Y., YUDKOFF, M.: Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia, *J. Nutrition* 130(4): 1026S-1031S, (2000).
16. DURMAZ, R., DELIORMAN, S., İŞIKSOY, S., UYAR, R., EROL, K., TEL, E.: Antiproliferative properties of the Lazaroids U-83836E and U-74389G on glioma cells in vitro, *Pathology Oncology Research*, 5(3): 223-228, (1999).
17. DURMAZ, R., INAL, M., ANGIN, K., ATASOY, M.A., ALTINIŞIK, M., TEL, E.: The effects of MK-801 and U-83836E on post-ischemic reperfusion injury in rat brain, *Acta Neurobiol. Exp.*, 59: 99-104, (1999).

18. FELDMAN, Z., GUREVITCH, B., ARTRU, A.A., OPPENHEIM, A., SHOHAMI, E., REICHENTHAL, E., SHAPIRA, Y.: Effect of magnesium given 1 hour after head trauma on brain edema and neurological outcome, *J. Neurosurg.*, 85: 131-137, (1996).
19. GANONG, W.F.: *Review of Medical Physiology*, 19th ed., Appleton & Lange Stannford, Connecticut, (1997).
20. GIAUME, C., MCCARTHY, K.D.: Control of gap-junctional communication in astrocytic networks, *Trends. Neurosci.*, 19: 319-325, (1996).
21. GLICK, R.P., GETTLEMAN, R., PATEL, K.: Insulin and Insulin-like growth factor I in brain tumors: binding and in vitro effects, *Neurosurgery*, 24, 791-797, (1989).
22. GOLDBERG, M.P., CHOI, D.W.: Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury, *J. Neurosci.*, 13(8): 3510-3524, (1993).
23. GOYA, L., FENG, P.T., ALIABADI, S., TIMIRAS, P.S.: Effect of growth factors on the in vitro growth and differentiation of early and late passage C6 glioma cells, *Int. J. Dev. Neurosci.*, 14: 409-417, (1996).
24. GRASBON-FRODL, E.M., ANDERSON, A., BRUNDIN, P.: Lazaroid treatment prevents death of cultured rat embryonic mesencephalic neurons following glutathione depletion, *J. Neurochem.*, 67: 1653-1660, (1996).
25. HALL, E.D., BRAUGHLER, J.M., YONKERS, P.A., SMITH, S.L., LINSEMAN, K.L., MEANS, E.D., SCHERCH, H.M., VOIGTLANDER, F.V., LAHTI, R.A., JACOBSEN, E.J.: U-78517F: a potent inhibitor of lipid

- peroxidation with activity in experimental brain injury and ischemia, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 258: 688-694, (1991).
26. HAN, D., SEN, C.K., ROY, S., KOBAYASHI, M.S., TRITSCHLER, H.J., PACKER, L.: Protection against glutamate-induced cytotoxicity in C6 glial cells by thiol antioxidants, *Am. Physiol. Soc.*, 273: R1771-R1778, (1997).
27. HANSSON, E., MUYDERMAN, H., LEONOVA, J., ALLANSSON, L., SINCLAIR, J., BLOMSTRAND, F., THERLIN, T., NILSSON, M., RÖNNBACK, L.:Astroglia and glutamate in physiology and pathology: aspects on glutamate transport, glutamate-induced cell swelling and gap-junction communication, *Neurochem. Int.*, 37: 317-329, (2000).
28. HEATH, D.L., VINK, R.: Traumatic brain axonal injury produces sustained decline in intracellular free magnesium concentration, *Brain Res.*, 738: 150-153, (1996).
29. HEATH, D.L., VINK, R.: Neuroprotective effects of MgSO₄ and MgCl₂ in closed head injury: a comparative phosphorus NMR study, *J. Neurotrauma*, 15: 183-189, (1998).
30. HERTZ, L., DRINGEN, R., SCHOUSBOE, A., ROBINSON, S.R.: Astrocytes: glutamate producers for neurons, *J. Neurosci. Res.*, 57: 417-428, (1999).
31. HINTZ, K., GUNZEL, D., SCHLUE, W.R.: Na dependent regulation of the free Mg²⁺ concentration in neuropile glial cells and P neurones of the leech *Hirudo medicinalis*, *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, 437: 354-362, (1999).
32. HONG, Y.C., PAIK, S.R., LEE, H.J., JANG, S.M.: Magnesium inhibits nickel-induced genotoxicity and formation of reactive oxygen, *Environmental Health Perspectives*, 105(7): 744-748, (1997).

33. HUANG, H., PATEL, P., SALAHUDEEN, A.K.: Lazaroid compounds prevent early but not late stages of oxidant-induced cell injury: potential explanation for the lack of efficacy of lazarooids in clinical trials, *Pharmacological Research*, 43: 55-61, (2001).
34. KARLSSON, J., LOVE, R.M., CLARKE, D.J., BRUNDIN, P.: Effects of anaesthetics and lazarooid U-83836E on survival of transplanted rat dopaminergic neurones, *Brain Research*, 821: 546-55, (1999).
35. KASS, I.S., COTTRELL, J.E., CHAMBERS, G.: Magnesium and cobalt, not nimodipine, protect neurons against anoxic damage in the rat hippocampal slice, *Anesthesiology*, 69: 710-715, (1988).
36. KATO, S., HIGASHIDA, H., HIGUCHI, Y., HATAKENAKA, S., NEGISHI, K.: Sensitive and insensitive states of cultured glioma cells to glutamate damage, *Brain Res.* 303: 365-373, (1984).
37. KIRISCHUK, S., MOLLER, T., VOITENKO, N., KETTENMANN, H., VERKHRATSKY, A.: ATP-triggered calcium mobilization in cerebellar Bergmann glial cells, *J. Neurosci.* 15: 7861-7871, (1995).
38. KIRISCHUK, S., KIRCHHOFF, V., MATYASH, H., KETTENMANN, H., VERKHRATSKY, A.: Glutamate- triggered calcium signaling in mouse Bergmann glial cells in situ: role of inositol-1,4,5-triphosphate-mediated intracellular calcium release, *Neurosci*, 92: 1051-1059, (1999).
39. LEE, E.J., AYOUB, I.A., HARRIS, F.B., HASSAN, M., OGILVY, C.S., MAYNARD, K.I.: Mexiletine and magnesium independently, but not combined, protect against permanent focal cerebral ischemia in Wistar rats, *J. Neurosci. Res.*, 58: 442-448, (1999).

40. LEE, J.M., ZIPFEL, G.J., CHOI, D.W.: The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. Macmillan Magazines Ltd, A7-A14, (1999).
41. LIN, W.W., KIANG, J.G., CHUANG, D.M.: Pharmacological characterization of endothelin- stimulated phosphoinositide breakdown and cytosolic free Ca^{2+} rise in rat C6 glioma cells, *J. Neurosci.*, 12: 1077-1085, (1992).
42. LLANSOLA, M., MONFORT, P., FELIPO, V.: Inhibitors of phospholipase C prevent glutamate neurotoxicity in primary cultures of cerebellar neurons, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292: 870-876, (2000).
43. MARINOV, M.B., HARBAUGH, K.S., HOOPES, P.J., PIKUS, H.J., HARBAUGH, R.E.: Neuroprotective effects of preischemia intraarterial magnesium sulfate in reversible focal cerebral ischemia, *J. Neurosurg.*, 85: 117-124, (1996).
44. MCLEAN, R.M.: Magnesium and its therapeutic uses: a review, *Am. J. Med.*, 96: 63-76, (1994).
45. MERTSCH, K., GRUN, T., KUNSTMANN, S., WIESNER, B., LADHOFF, A.M., SIEMS, W.G., HASEOFF, R.F., BLASIG, I.E.: Protective effects of the thiophosphate amifostine (WR 2721) and a lazaroid (U-83836E) on lipid peroxidation in endothelial cells during hypoxia/reoxygenation, *Biochem. Pharmacol.*, 56(8): 945-954, (1998).
46. MOSSMANN, T.: Rapid colorimetric assay of cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immun. Method*, 65: 55-63, (1983).
47. NICHOLLS, D., ATTWELL, D.: The release and uptake of excitatory amino acids, *Pharmacol. Trends. Sci.*, 11: 462-468, (1990).

48. OHNISHI, S.T., OHNISHI, T.: Central Nervous System Trauma Research Techniques. CRC Press, Inc., U.S.A., (1995).
49. OKA, A., BELLIVEAU, M.J., ROSENBERG, P.A. VOLPE, J.J.: Vulnerability of oligodendroglia to glutamate: pharmacology, mechanisms and prevention, J. Neurosci., 13: 1441-1453, (1993).
50. RASGADO-FLORES, H., GONZALEZ-SERRATOS, H.: Plasmalemmal transport of magnesium in excitable cells, Frontiers in Bioscience, 5: d866-d879, (2000).
51. ROBERTSON, C., FOLTZ, R., GROSSMAN, R. GOODMAN, J.C.: Protection against experimental ischemic spinal cord injury, J. Neurosurg., 64: 633-642, (1986).
52. ROTHMAN, S.M.: The neurotoxicity of excitatory amino acids is produced by passive chloride influx, J. Neurosci. 5: 1483-1489, (1985).
53. SCHIPKE, C.G., OHLEMEYER, C., MATYASH, M., NOLTE, C., KETTENMANN, H., KIRCHOFF, F.: Astrocytes of the mouse neocortex express functional N-methyl-D-aspartate receptors, Faseb J. 15: 1270-1272, (2001).
54. SCOLDING, N.J., MORGAN, B.P., CAMBELL, A.K., COMPSTON, D.A.S.: The role of calcium in rat oligodendrocyte injury and repair, Neurosci Lett., 135: 199-211, (1992).
55. SUREDA, F.X., GABRIEL, C., PUBILL, D., PALAS, M., ASCUBEDO, E., CAMARASA, J., CAMINS, A.: Effects of U-83836E on glutamate induced neurotoxicity in dissociated rat cerebellar granule cells, Toxicology and Applied Pharmacology, 156: 1-5, (1999).

56. TAKAHASHI, T., SHIBATA, M., GOTOH, J., FUKUUCHI, Y.: Astroglial cell death induced by excessive influx of sodium ions, *European Journal of Pharmacology*, 408: 127-135 (2000).
57. TASHIRO, M., KONISHI, M., IWAMOTO, T., SHIGEKAWA, M., KURIHARA, S.: Transport of magnesium by two isoforms of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger expressed in CCL39 fibroblasts, *Pflugers Arch.*, 440(6): 819-827, (2000).
58. THOLEY, G., LEDIG, M., MANDEL, P., SARGENTINI, L., FRIVOLD, A.H., LEROY, M., GRIPPO, A.A., WEDLER, F.C.: Concentrations of physiologically important metal ions in glial cells cultured from chick cerebral cortex, *Neurochem. Res.* 13(1): 45-50, (1998).
59. UNTERMAN, T.G., GLICK, R.P., WAITES, G.T.: Production of Insulin-like growth-factor binding proteins by human central nervous system tumors, *Cancer Res.* 51: 3030-3036, (1991).
60. VERITY, M.A., TORRES, M., SARAFIAN, T.: Paradoxical potentiation by low extracellular Ca²⁺ of acute chemical anoxic neuronal injury in cerebellar granule cell culture, *Molecular and Chemical Neuropathology*, 15: 217-233, (1991).
61. VERKHRATSKY, A., KETTENMANN, H.: Calcium signalling in glial cells, *Trends Neurosci.* 19: 346-352, (1996).
62. VERKRATSKY, A., ORKAND, R.K., KETTENMANN, H.: Glial calcium: Homeostasis and signaling function, *Physiological Reviews*, 78: 99-141, (1998).
63. VESCE, S., BEZZI, P., VOLTERRA, A.: The highly integrated dialogue between neurons and astrocytes in brain function, *Science Progress.*, 82(3): 251-270, (1999).

64. WANG, D., ZHANG, H., ZHAO, S., WEI, M., ZHANG, H.: Prophylactic effects of magnesium sulfate and ligustrazin on the hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats, *Chung Kuo I Hsueh Yuan Hsueh*, 19: 301-304, (1997).
65. ZHOU, Q., OLINESCU, R.M., KUMMEROW, F.A.: Influence of low magnesium concentrations in the medium on the antioxidant system in cultured human arterial endothelial cells, *Magnes. Res.*, 12(1): 19-29, (1999).



ÖZGEÇMİŞ

1972 yılında Eskişehir’de doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Eskişehir’in muhtelif okullarında tamamladım. 1989 yılında Anadolu Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nü kazandım. 1993 yılında Biyoloji Bölümü’nden üçüncülükle mezun oldum. Aynı yıl Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimi görmeye hak kazandım. 1996 yılında yüksek lisans eğitimimi tamamladım. 1997 yılında aynı Enstitü ve anabilim dalında doktora giriş sınavını kazandım. Halen doktora eğitimime devam etmekteyim. Evli ve bir çocuk annesiyim.

