



TÜRKİYE CUMHURİYET  
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TIAZOLIDİNDİON GRUBU PİOGLİTAZONUN NB2a HÜCRE  
KÜLTÜRÜ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

OKAN SEYREK  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Doç. Dr. KAMİL VURAL

MANİSA, 2018



TÜRKİYE CUMHURİYET  
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TIAZOLİDİNDİON GRUBU PİOGLİTAZONUN NB2a HÜCRE  
KÜLTÜRÜ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

OKAN SEYREK  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Doç. Dr. KAMİL VURAL

TEZ SINAV JÜRİSİ  
Prof. Dr. ERCÜMENT ÖLMEZ  
Doç. Dr. KAMİL VURAL  
Dr. Öğr. Üy. ELİF AKSÖZ

MANİSA, 2018



## BEYAN

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

Okan SEYREK

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olaneğitim sürem boyunca maddi ve manevi olarak her zaman desteklerini esirgemeyen değerli danışman hocam sayın Doç. Dr. Kamil VURAL'a, ilgisini ve önerilerini göstermekten kaçınmayan Farmakoloji Ana Bilim Dalı Baőkanı sayın Prof. Dr. Ercüment ÖLMEZ 'e, ayrıca tez çalışmam ve eğitimim sırasında bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım değerli hocam Doç. Dr. Tuğba GÜRPINAR ÇAVUŞOĞLU'na teşekkür vesayđılarımı sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca yardım, bilgi ve tecrübeleri ile bana sürekli destek olan hocam Prof. Dr. Mehmet İbrahim TUĞLU'ya teşekkür ve sayđılarımı sunarım.

Çalıőmalarım boyunca yardımını hiç esirgemeyen değerli arkadaőım Uzm. Dr. Ertan DARIVERENLİ'ye ve Dr. Iőıl AYDEMİR'e teőekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca çalıőmalarım ve eğitim hayatım boyunca bana her zaman destek olan eőime ve aileme de sonsuz teőekkürler ederim.

Okan Seyrek Manisa, 2018

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	iv
TABLO LİSTESİ.....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
RESİM LİSTESİ.....	vii
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ.....	3
1.1. Amaç.....	3
1.2. Genel Bilgiler.....	4
1.2.1.Nöroblastoma Tümörleri.....	4
1.2.2. Tiazolidindionlar (TZD)Ve Metabolik Etkileri .....	5
1.2.3.Peroksizom Proliferatör-Aktive Reseptör-GaMA(PPAR $\gamma$ ) Agonistleri.....	11
1.3. Oksidatif Stres .....	13
1.3.1. NOS ve Serbest Radikaller .....	13
1.3.2. Serbest Radikaller ve Apoptoz.....	15
1.4. Programlanmış Hücre Ölümü.....	16
1.4.1. Hücre Ölümü ve Apoptoz .....	16
1.4.2.Apoptoz Işık,Elektron Mikroskopik ve Biyokimyasal Özellikler .....	22
1.5. Nöron Kültürü ve Nörotoksik Etki .....	24
1.5.1. Kültür Ortamı ve Özellikleri .....	24
1.5.2. Nöron Kültürünün Değeri .....	32
1.5.3.Nöron Dizin Hücreleri,Kültür Ortamı ve Nörotoksik Etki .....	43
1.6. Nöroprotektif Etki ve Amaç.....	52
2. GEREÇLER ve YÖNTEMLER .....	56
2.1. Kullanılan Gereçler.....	56
2.1.1. Kullanılan Hücre Hattı .....	56

2.1.2. Kullanılan Cihazlar .....	56
2.1.3. Deney Protokolü .....	56
2.2. TUNEL Yöntemi.....	60
2.3. İstatistik.....	61
<b>3. BULGULAR.....</b>	<b>62</b>
<b>4. TARTIŞMA .....</b>	<b>72</b>
<b>5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER .....</b>	<b>84</b>
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>86</b>
<b>7. EKLER.....</b>	<b>136</b>



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

**Bcl-2** : B- hücre lenfoma 2

**Bcl-XL** : Ekstra büyük B- hücre lenfoma

**TNF**: Tumor Necrosis Factor

**DM**: Diabetes mellitus

**PPAR $\gamma$** : Peroksizom proliferatör aktive edici reseptör gama

**TZD**: Tiazolidindion

**NTT** : Nörotoksisite Tarama Testi

**MTT** : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

**TRAIL** : Tumor Necrosis Factor related apoptosis-inducing ligand

**NO** : Nitrik Oksit

**NF $\kappa$ B**: Apoptoza yol açan nükleer düzenleyici protein

**TNFR**: Tümör Nekrozis Faktör Reseptör

**AIF**: Apoptozis indükleyici faktörü

**TUNEL**: Terminal deoxynucleotidyl transferase [Tdt]-mediated dUTP-biotin nick-end labeling

**GFAP**: Glial fibriler asidik protein

**EGF**: Epidermal büyüme faktörü

**NTE**: Nöropati hedefli esteraz

**AChE**: Asetilkolin steraz

**PG** : Pioglitazon

**CPS**: Klorprifos

**AMPK**:AMP-aktive protein kinaz



## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 1</b> : TUNEL Boyama Protokolü .....	61
---	----



## ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1** : PPAR- $\gamma$  agonistlerinin nörodejenerasyondaki etki mekanizmaları. (143 Randy ve Guoying 2007'). ..... 13
- Şekil 2** : NB2a hücreleri üzerine değişik konsantrasyonlarda PG'un MTT metabolizması üzerine etkisi. Kontrol grubuna göre ( $p>0.05$ ). ..... 63
- Şekil 3** : NB2a hücreleri üzerine klorprifos 25 uM konsantaryonda etkisine karşı değişik konsantrasyonlarda PG'in MTT metabolizması üzerine etkisi. Klorprifos grubuna göre \*\*\* $p<0.001$  ..... 64
- Şekil 4** : NB2a hücreleri üzerine PG değişik konsantrasyonlarında nörit inhibisyonuna etkisi, kontrol grubuna göre anlamlı bir fark görülmedi. ( $p>0.05$ ) .... 65
- Şekil 5** : Nörit uzamasına klorprifosun ve PG nin etkisi. Klorprifosa göre istatistiksel olarak anlamlı nörit uzamasında anlamlı bir artış görüldü (\* $p<0.05$ , \*\*\* $p<0.001$ ). 67
- Şekil 6** : Pioglitazon tek başına uygulandığında kontrol grubuna göre apoptotik hücre sayısında anlamlı bir fark görülmedi ( $p>0.05$ ). ..... 68
- Şekil 7** : Apoptotik hücre sayısına CPS nin ve PG nin etkisi. Kontrol grubuna göre (\* $p<0.05$ , \*\*\* $p<0.001$ )..... 70

## RESİM LİSTESİ

- Resim 1** : d-cAMP ile farklılaştırılan NB2a Kültür Hücresi görüntüsü x 400 ..... 62
- Resim 2** : 25  $\mu$ M klorprifos uygulanan NB2a hücrelerinde oluşturulan nörit inhibisyonunun görüntüsü x400..... 66
- Resim 3** : 25  $\mu$ M klorprifos + PG 30 uM konsantrasyonda uygulandığında NB2a hücrelerinde oluşturulan nörit uzamasının görüntüsü x400. .... 66
- Resim 4** : Apoptotik hücrelerin görünümü düşük (x100) ve yüksek (x400) büyütmeleerde. CPS uygulanan hücreler hem morfolojik olarak diferansiye olamadığı hemde apoptotik hücre sayısında artış olduğu gözlemlendi. Birlikte PG 30 uM konsantrasyonda uygulanmadığında hem morfolojik düzelme hemde apoptotik hücre sayısında azalma görüldü. .... 69
- Resim 5** : NB2a hücreleri üzerine PG etkisi altında 10 ve 30 uM konsantrasyonlarda nörit uzatmaları ile oldukça sağlıklı morfolojik görünimleri olduğu ve apoptoz ile işaretlenmedikleri izlendi. .... 71

## **Tezin Başlığı: Tiazolidindion Grubu Pioglitazonun NB2a Hücre Kültürü Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması**

**Öğrencinin Adı:**Okan SEYREK

**Danışman:**Doç. Dr. Kamil VURAL

**Anabilim Dalı:**FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

### **ÖZET**

**Amaç:** Fare beyin hücre hatı (NB2a) üzerine pioglitazon in vitro sitolojik, biyokimyasal ve farmakolojik etkilerinin ilk defa araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca literatürde tez kapsamında test edilen pioglitazon maddesinin beyin tümörü hücrelerinde çoğalmayı baskılayıp baskılamadığı konusunda herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmamızda pioglitazon çeşitli konsantrasyonlarda kültür ortamına ilave edilerek hücre çoğalması üzerine etkileri 3-(4,5 dimetylthiazol-2-yl) - 2,5 diphenltetrazolium bromide (MTT) yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

**Bulgular:** Bulgularımız sözkonusu bileşiklerin düşük konsantrasyonlarda antioksidan aktivitelerinin varlığını ve yüksek konsantrasyonlarda ise sitotoksik etkili olduklarını ortaya koydu.

**Sonuçlar:** Nörotoksik etkiye sahip moleküllerin oluşturacakları nöron hasarlarıPG ile önlenebileceği ve toksik maddelerin santral sinir sisteminde oluşturduğu hasarının niteliği de araştırılacağı için oluşmuş hasarın tedavisi ile hasarın gelişmesinin önlenmesi için yardımcı tedavilerin bulunması için de bir çıkış kaynağı olabilecektir.

**Anahtar kelimeler:**NB2a, MTT, Nörotoksisite, klorpirofos, apoptozis, nörotoksisite tarama testi

**Title: Investigation of the Effect of Tiazolidinedion Group Pioglitazone on NB2a Cell Culture**

**Student Name:**Okan Seyrek

**Consultant:**Assoc. Prof. Dr. Kamil Vural

**Department** : Pharmacology Department

**ABSTRACT**

**Objective:** It is aimed to investigate in vitro cytological, biochemical and pharmacological effects of pioglitazone on mouse brain cell line (NB2a) for the first time. In addition, no research has been found in the literature on whether pioglitazone, tested in the thesis, suppresses proliferation in brain tumor cells.

**Material and method:** In our study, pioglitazone was added to the culture medium at various concentrations the effects on cell proliferation were determined using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) method.

**Results:**Our findings show that these compounds have the antioxidant activity at low concentrations and cytotoxic effects at high concentrations.

**Conclusion:**Neurotoxic effect of these molecules to produce the damage to neurons can be prevented with PG and toxic substances on the central nervous system, and the nature of the damage created in the araştırılacağı treatment of damage occurred to preventing the development of damage with the the presence of an output for auxiliary treatment for source.

**Key words:**NB2a, MTT, neurotoxicity, chlorpirofos, apoptosis, neurotoxicity screening test.

# 1.GİRİŞ

## 1.1 AMAÇ

Nöronlar oldukça gelişmiş hücreler olmasına karşılık hasar durumunda kendilerini koruma ve tekrardan oluşturma kapasitesinden yoksundurlar. Pioglitazon birçok farklı mekanizma ile nöron koruyucu özelliği gösterilmiş, ancak kronik ve uzun süreli kullanımda nöronal hasara karşı koruyucu etkiyi gösterme potansiyeli bilinmemektedir. Diyabet tedavisinde kullanılan Tiazolidindion grubu ilaçlar hedef hücrede insülin cevabını artırarak etki gösterirler. Pioglitazon kullanımı sırasında ortaya çıkan bulgulardan bir tanesi de ilacın nöronları koruyucu etkisi olabileceğidir. Pioglitazonun gerçekten nöronlar üzerine koruyucu etkisinin olup olmadığını nöronal toksisiteyi araştırdığımız nörotoksikite tarama testi (NTT) ve ilacın hücre ölümüne neden olup olmadığını belirlediğimiz MTT analizi (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ile araştırılacaktır.

Birçok molekül kişinin yaşamı boyunca kullanılmakta ve bunlardan bazıları nörotoksik etki göstermektedir. Bunların nörotoksik etkisini azaltacak elimizde ne yazık ki fazla alternatif yoktur. Bu nedenle nöroprotektif etki gösterebilen moleküle ihtiyaç gün geçtikçe artmaktadır. Bu araştırmada biz nöroprotektif olduğunu düşündüğümüz Pioglitazonun farklı yöntemler ile bu etkisini göstermeyi amaçlamaktayız. Bu nedenle özellikle nöronal kaybın önlenmesi oldukça önemlidir. Nöron kaybı telefî edilemez. Bu nedenle araştırmamız sonucu pioglitazonun nöroprotektif etkisi kanıtlanabilirse bu etkisi ile nörotoksik moleküllere bağlı nöronal hasar önenebilecektir. Böylece nöronlar korunacak ve hasar oluşumuna bağlı gelişen komplikasyonlar azaltılabilecektir.

Pioglitazonun antidiyabetik iyi etkileri olduğu kadar kalp üzerinde olumsuz etkileri de olabildiği bilinmektedir. Ancak nöronlar üzerine etkisi net olarak bilinmemektedir. Amacımız ilacın nöroprotektif etkileri olup olmadığını kültür ortamında göstermektir. Eğer bu etkisi kanıtlanabilirse nöronal kayba neden olan Alzheimer ve Parkinson Hastalıklarında olduğu gibi bu hastalıkların progresyonları

beklide yavaşlatılabilecektir. Ya da bu hastalıkların oluşması ve/veya gelişiminin önlenmesinde kullanılabilir. Hala tedavisi olmayan ve sadece semptomatik tedavileri olan bu hastalıklarda önemli bir tedavi seçeneği olarak kullanılabilir (Vural ve Tuğlu, 2011: 985-991).

Nöroblastoma dizini, bir kanser hücre hattı olup, nöronal hücreler üzerindeki nörotoksik etkileri araştırmada kullanılır. Bu etki nörotoksisite tarama testi ile değerlendirilir. Bu test ile sinir hücresinin nörit uzatmasının ve ılımlı toksik etkiye bağlı olarak nöritlerini geri çekmesi şeklinde kendini gösteren bir mekanizmanın gösterilmesi ile yapılır. Araştırılacak, güçlü toksik etkinin hücre ölümü, oksidatif stres, çoğalma ve rejenerasyon yeteneği ile ise MTT ile gösterilebilmektedir. Ayrıca ileri derecede farklılaşmış ve fonksiyonel bir hücre olan sinir hücresinin patolojik durumlarda davranış mekanizmalarının anlaşılmasına da katkı sağlanacaktır.

## **1.2. Genel Bilgiler**

### **1.2.1. Nöroblastoma tümörleri**

Nöroblastoma bebeklik çağının en sık görülen tümörü olup, olguların çoğu ise iki yaşından küçük çocuklarda görülmektedir (Sanchez, 2002).Amerikan Kanser Derneği (American Cancer Society)'nin verilerine göre Amerika Birleşik Devletleri'ndeki çocukluk çağı tümörlerinin %7,8'inden sorumlu olan nöroblastomaya, her yıl yaklaşık 650 yeni çocuk yakalanmaktadır. Nöroblastoma, insidansı bir milyon çocuktan 9,5'tur (Jonas, Witzens-Harig and Arseniev, 2007). Nöroblastoma sempatik sinir sisteminin nöral krest elemanlarından türevlenen nöroendokrin bir ekstrakraniyal solid tümördür. Sıklıkla adrenal bezlerde görülmekle birlikte boyun, göğüs, karın veya pelvis bölgelerindeki sinirlerde görülebilmektedir. Primer tümörlerin %60'ından fazlası adrenal medulladan veya abdomendeki paraspinal ganglia'lardan kaynaklanabilir (Elmas C, Elmas Y, Gautschi, Uehlinger, 1992).Nöroblastoma tümörleri oldukça heterojenite sergileyen bir tümör tipi olup; düşük, orta ve yüksek risk olmak üzere üç farklı risk grubu şeklinde değerlendirilebilir (Stevens, Fortin, Pappas, 2002).Yüksek riskli

nöroblastomada cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ve kemik iliği transplantasyonu gibi multimodular tedavi yöntemleri izlenmesine rağmen, hala hastaların %70'i ölmektedir (Morrison, Moore, Deppmeier, Gold, Meshul, Johnson, 1997).

Yüksek riskli nöroblastoma çeşitli genetik ve epigenetik faktörler ile ilişkilidir. Bunların başında nöroblastoma kaynaklı gen adıyla bilinen MYCN onkogeninin amplifikasyonu, B- hücre lenfoma 2 (Bcl-2) ve ekstra büyük B- hücre lenfoma (Bcl-XL) gibi bazı anti-apoptotik proteinlerin overekspresyonu gelmektedir (Moore, Spierdijk, vanKleef, Coleman, Love, 1982). Bu da tümör hücrelerine, apoptoza karşı yüksek bir direnç oluşturur. Bu kansere karşı geliştirilen yeni tedavi yaklaşımlarına rağmen hala çocukluk çağı kanser ölümlerinin yaklaşık %15'inden nöroblastoma tümörleri sorumludur. Nöroblastomada tedavi süreci ameliyat, kemoterapi, radyoterapi gibi farklı yöntemlerin uygulanmasıyla birlikte uzun bir dönemi kapsamaktadır. Buna ek olarak nöroblastoma rekürrensleri yüksek düzeyde tedavi rezistansı ve çok kötü bir prognoz sergilemekte ve genellikle ölümcül seyretmektedir. İleri dönem nöroblastoma taşıyıcılarında görülen, agresif bir tedaviye rağmen kötü sonuçlar alınması, yeni tedavi yaklaşımlarını gerekli kılmaktadır (Heath, Kidd, Trapp, Dunkley, 1991).

Bir apoptoz indükleyici ligand olan Tümör Nekroz Faktör İlişkili Apoptoz İndükleyici Ligand "Tumor Necrosis Factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand" (TRAIL), hücre membranındaki reseptörüne bağlandığında FADD gibi ilişkili domeynler üzerinden kaspaz-8 aktivasyonu ile hücrenin apoptoza gitmesine neden olmaktadır. Ayrıca TRAIL normal hücrelerde etki göstermezken kanser hücrelerinde apoptozu uyardığı için de tedavide umut vericidir (Kimes, Tarikas, Schubert, 1974). Bu yolun aktivasyonu tedavi de kullanılabilirse hastalıkların önlenmesi belkide gerçekleşebilecektir.

### **1.2.2. Tiazolidindionlar (TZD) ve metabolik etkileri**

Tiazolidindionlar tip 2 diyabetin tedavisinde kullanılan insülin duyarlılaştırıcı ajanlardır. İnsülin direncini azaltarak glisemik kontrolü sağlarlar. Bu bileşikler ortak



olarak bir tiazolidin-2-4-dion yapısına sahiptir ve her birinin farklı bir yan zinciri vardır. Ana halka antidiyabetik etkiden sorumlu halkadır ve bu halka üzerinde yapılan substitüsyonlar genellikle antidiyabetik etkinlikten çok, ilacın farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerini değiştirmektedir. Yapılan çalışmalar, tiazolidindion'lerin, başka bir deyişle glitazonların, glukoz düzeylerini düşürücü etkinliklerini insülinin varlığında gerçekleştirdiklerini göstermektedir. Glitazonların antihiperglisemik etkilerinin yanısıra, lipid metabolizması, endotel fonksiyonu, oksidatif stres ve vasküler inflamasyon üzerinde de pozitif etkileri vardır (Song, Sanchez-Ramos, 2002; Brazelton, Rossi, Keshet, Blau, 2000). Tiazolidindionlar, 1970'lerin sonlarında lipid düşürücü ilaçlar için tarama sürecinde keşfedilmişlerdir. Ciglitazon orjinal bileşiktir. İnsülin dirençli diabetes mellitusun (DM) hayvan modelinde hiperglisemi, hiperinsülinemi ve hipertrigliseridemiye azalttığı bulunmuştur. 1980'lerde glitazon yapısı içeren birçok türev sentez edilmiştir.

Troglitazon bu grupta pazara ilk sunulan ilaçtır. Bununla birlikte nadiren idiosinkratik karaciğer toksisitesinin gelişimi sonucu karaciğer yetmezliği ve ölüme yol açtığından piyasadan kaldırılmıştır (Yang, Huang, Ma, 2006; Atlasz, Babai, Reglodi, Kiss, Tamas, Bari, Domoki, Gabriel, 2007). Halen kullanılmakta olan pioglitazon ve rosiglitazonun her ikisi de Amerika Birleşik Devletleri'nde Gıda ve İlaç Dairesi tarafından 1999 yılında Tip 2 diabetes mellitus tedavisi için onay almışlardır. Rosiglitazon ve pioglitazonun 2 milyondan fazla hastada kullanımında belirgin karaciğer toksisitesi için kanıt bulunamamıştır (Harry, Billingsley, Bruinink, Campbell, Classen, Dorman, Galli, Ray, Smith, Tilso, 1998). Tiazolidindionlar esasen antilipidemik ve antihiperglisemik potansiyelleri için klofibrat asit analoglarının taranması sırasında, moleküler hedefleri bilinmeksizin geliştirilmişlerdir. Daha sonraları çekirdek hormon reseptörlerinin bir üyesi olan peroksizom proliferatör aktive edici reseptör gama'nın (PPAR $\gamma$ ) doğrudan ligandı oldukları bulunmuştur (Yang, Huang, Ma, 2006). İnsülin duyarlılığını geliştirerek glisemik kontrolü sağlayan TZD'ler, lipofilik olduklarından kolayca çekirdeğe girebilirler ve PPAR $\gamma$ 'ya orada bağlanarak aktive ederler ve agonisti gibi davranırlar (Axelrad, Howard, McLean, 2003).

Peroksizomlar, ökaryotik hücrede bulunan, pek çok fonksiyona sahip organellerdir. Hidrojen peroksit yıkımı dışında yağ asidi oksidasyonu, kolesterol biyosentezi ve yıkımı, gliserolipid sentezinde yer alırlar. Çeşitli değişken yapıları kimyasallar peroksizomları proliferate edebilirler ve bunlar "peroksizom proliferatörleri" olarak adlandırılırlar. Bu peroksizom proliferatörlerinin gen transkripsiyonundaki etkilerinde aracılık yapan nükleer reseptörler 1990 yılında bulunmuştur ve PPAR adını almışlardır (Flaskos, McLean, Fowler, Hargreaves, 1998). Nükleer reseptörler bir ligand ile aktive olduklarında spesifik DNA parçalarına bağlanarak gen ekspresyonunu düzenleyebilmektedirler. PPAR'ler diğer nükleer hormon reseptörleri gibi öncelikle hedef genin promotör bölgesindeki spesifik bölgeye bağlanırlar. PPAR'ın içinde bulunduğu bazı nükleer hormon reseptörleri DNA'ya Retinoid X reseptörü ile heterodimer oluşturarak bağlanırlar. Ligandın bağlanması ile transkripsiyonu aktive ederler (McLean, Holme, Janneh, Southgate, Howard, Reed, 1998).

**Üç farklı PPAR alt tipi tanımlanmıştır:** - PPAR $\alpha$  , - PPAR $\beta$ ( $\delta$ ) ve - PPAR $\gamma$ . PPAR $\gamma$  yağ dokusunda yağ asitlerinin depolanmasında etkilidir. Anabolik durumlarda adipoz dokuya etki ile lipogenezi artırır (Walum, Peterson, 1984; Atlasz, Babai, Reglodi, Kiss, Tamas, Bari, Domoki, Gabriel, 2007). İnsanlarda PPAR $\gamma$ 'nın üç alt tipi tanımlanmıştır: PPAR $\gamma$ 1, PPAR $\gamma$ 2 ve PPAR $\gamma$ 3. Bu alt tiplerin dağılımında predominant formun PPAR $\gamma$ 1 olduğu saptanmıştır. Belirgin miktarda PPAR $\gamma$ 2 eksprese eden tek doku adipoz dokudur (Yamamoto, Schmidt-Kastner, Hamasaki, Yamamoto, Parel, 2006). Böbreklerden bu üç PPAR subtipleri eksprese edilmektedir. PPAR $\alpha$  mezengial hücreler, proksimal tübül ve medullada henlenin çıkan kolundan eksprese edilir. PPAR $\beta$ ( $\delta$ ) ise düşük derecede eksprese edilir. PPAR $\gamma$  mezengial hücreler, proksimal tübül hücreleri, medüller toplayıcı kanallardan ve kortikal fibroblastardan yüksek miktarlarda eksprese edilir. PPAR $\gamma$  daha efektifir.

Yakın zamana kadar PPAR $\gamma$  aktivasyonunun böbrekte glomerül ve özellikle mezangiyumda etkili olduğu düşünülmekteydi. Ancak tubule-interstisyumun patolojik açıdan daha prediktif olduğu son zamanlarda çalışmalarda gösterilmiştir (Sanchez-Ramos, Neural, 2002; Stevens, Fortin, Pappas, 2002). Tübüler 13

disfonksiyonda albümin reabsorbsiyonunun etkilenmesi sonucu nefropatiye katkısı gözlenmiştir. PPAR $\gamma$  aktivasyonu ile albüminin tübüler geri emilimi normoglisemiklerde de artmış, üriner albümin atılımı azalmıştır. Bu etkileri TZD'ın antiinflamatuvar, antifibrotik, antiproliferatif, antioksidan etkilerine sekonder olduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir (Kobayashi, Kuroiwa, Shimokawa, Okeda, Tokoro, 2000).

Açlık sırasında uygulandığında pioglitazon serumda 30 dakika içinde ölçülebilir. Pik konsantrasyona 2 saat içinde ulaşır. Pioglitazonun yemekle birlikte alınması pik konsantrasyona ulaşma süresini 3-4 saat kadar geciktirir ancak emilimini azaltmaz. Pioglitazonun yarılanma ömrü 3-7 saattir; aktif metabolitleriyle kombinasyon halinde ise yarılanma ömrü 16-24 saattir. Sürekli serum konsantrasyonuna 7 gün içinde ulaşır. %99'undan fazlası albümin olmak üzere, proteine bağlanır (Song, Sanchez-Ramos, 2002; Kobayashi, Kuroiwa, Shimokawa, Okeda, Tokoro, 2000).İnvitro çalışmalar PPAR $\gamma$ 'nın ektopik olarak üretiminin bir TZD'nin varlığında yağ hücresinin farklılaşmasını indüklediğini göstermiştir (Walum, Peterson, 1984). Aynı zamanda TZD'lerin kan şekerini düşürerek insülin salgısını azalttığı gösterilmiştir (Yang, Huang, Ma, 2006; Garcia-Valenzuela, Sharma , Piña, 2005).TZD'ler yağ dokusuna serbest yağ asiti alımını artırır ve serbest yağ asiti mobilizasyonunun insülinle düzenlenen inhibisyonunu artırır (Song, Sanchez-Ramos: 2002).Hiperglisemik ve/veya bozuk glukoz toleransı olan hayvan modellerinin dokularının invitro ve ex vivo doku çalışmaları, TZD'lerin insüline cevap veren esas dokularda insülin duyarlılığını artırdığını ve TZD'lerin uyardığı glukoz yıkımının öncelikle çizgili kas hücrelerinde olduğunu göstermektedir.

1. Glukoz kullanımında TZD aracılı artışı açıklayan iskelet kasında, adipoz dokuya oranla, eser miktarda PPAR $\gamma$  vardır (Garcia-Valenzuela, Sharma, 2005).Bu çelişkiyi açıklamak için TZD'lerin, yağ asitlerinin yağ dokusu tarafından alınmasını artırarak iskelet kasından uzaklaştırdıkları hipotezi öne sürülmüştür. Böylece yağ asitlerinin sistemik kullanımının ve kas tarafından yağ asidi alımının azalması ile insülin direncinde düzelme olur. Özetle; PPAR $\gamma$  aktivitesine sekonder olarak fazla enerjinin depo edilmesi insülin duyarlılığında iyileşmeye neden olur (Walum, Peterson: 1984;

Garcia-Valenzuela, Sharma, 2005). Yani TZD'lerin hipoglisemik etkileri, hipolipidemik etkilerine sekonderdir. Ancak TZD'lerin iskelet kaslarına glukoz alınmasının artırılmasında direkt rollerinin olduğu da gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar tümör nekrozis faktör  $\alpha$ 'nın insülin direncinde mediyatör olduğunu göstermektedir (Garcia-Valenzuela, Sharma, 2005). TZD'lerin insülin direncinin patogeneğinde rol oynayan bu adiposit sitokininin etkilerini de antagonize etmektedirler. TZD'lerin antidiyabetik etkilerinin, hedef organları (yağ hücreleri, çizgili kas ve karaciğer hücreleri) insülinin etkisine duyarlı hale getirdiği kabul edilmektedir. Bu etkinin insülin bağımlı olduğu bilinmektedir. Çünkü TZD'ler insülin yokluğunda kan şekerini düşürmekte etkili değildir.

### **Metabolik Etkiler**

- 1- Glisemi Kontrolü Üzerine Etkileri: Amerika Birleşik Devletleri'nde gıda ve ilaç dairesi, pioglitazon ve rosiglitazonun tip 2 diyabet tedavisinde monoterapi olarak ve metformin, sülfonilüre ya da insülinle kombinasyon halinde kullanımını onaylamıştır. Glisemik kontrolü iyileştirmesine ilave olarak hem pioglitazon hem de rosiglitazon insülin direnç sendromunun komponentlerinin birçoğunu iyileştirir (Ahmed, Ingoglia, Sharma 2001; Garcia-Valenzuela, Sharma: 1999).
- 2- İnsülin Direnci Üzerindeki Etkileri: Plazma glukozunu düşürmesinin yanında TZD'ler aynı zamanda tip 2 DM'li hastalarda uygun glisemik kontrole ulaşmak için gerekli olan insülin dozunu ve/veya dolaşımdaki insülin düzeylerini düşürür. İnsülin direncinin derecesindeki bu azalma periferik glukoz uptakeinde bir artışa neden olur.
- 3- Pankreatik İnsülin Sekresyonuna Etkileri: Tiazolidindionlar plazma insülin düzeyinde sürekli olarak bir azalmaya neden olurlar ve bu da artmış insülin duyarlılığını gösterir.
- 4- Apoptoz Üzerine Etkileri: Genetik olarak programlanmış beta hücrelerinin artmış metabolik aktivitesi artmış apoptoza yol açabilir. TZD'lerin insülin direncini azaltarak Tip 2 DM'li hastalarda beta hücre kaybı azalttığı varsayılmaktadır. Ishida ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada pioglitazonun oksidatif stresi azaltarak insülinin sekretuar kapasitesini iyileştirdiğini ve beta hücre kaybını azalttığını göstermişlerdir (Maeda, Sawada, Matsubara, Nakai, Hara: 2004).

- 5- Lipid Profili Üzerindeki Etkileri: Birçok tip 2 DM hastasında kompleks dislipidemi vardır. TZD'ler lipid metabolizmasını anlamlı olarak modifiye etmektedirler (Yang, Huang, Ma: 2006).Van Wijk ve ark. 5000'den fazla hastayı kapsayan çalışmalarında pioglitazonun, trigliserid, total kolesterol ve LDL kolesterol üzerinde rosiglitazondan daha fazla oranda yararlı etkileri olduğunu bildirmiştir (Jia, Cepurna, Johnson, Morrison: 2000).
- 6- Arterial İnflamasyon, Ateroskleroz ve Endotel Fonksiyonu Üzerine Etkileri: Vasküler düz kas hücrelerinde, endotel hücrelerinde ve makrofajlarda da bulunan PPAR $\gamma$  aktivasyonunun aterosklerotik süreç basamaklarını direkt olarak etkilediği çok sayıdaki çalışma ile gösterilmiştir. Bu etkilerin çoğu antiaterojeniktir. TZD'lerin vasküloprotektif etkilerinin çoğu insülin direncini kırıcı/antihiperglisemik etkilerinden bağımsız olarak ortaya çıkmaktadır (Morrison, Moore, Deppmeier, Gold, Meshul, Johnson: 1997; Yu, Tanabe, Dezawa, Ishikawa, Yoshimura: 2006)."Pleiotropik etkiler" olarak adlandırılan bu etkiler özellikle antiaterosklerotik/düz kas proliferasyonunu önleyici etkidir ve bu konudaki araştırmalar devam etmektedir. Bu yönde, kardiyovasküler sonuçları değerlendirecek büyük randomize çalışmalara gerek vardır. Yapılan bir insan çalışmasında 3-6 aylık pioglitazon tedavisi sonrasında karotis ultrasonu ölçümlerine göre karotis arteri intimal media kalınlığında anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. TZD'lerin koroner tıkanmaya balon kateter ile müdahaleden sonra, koroner stent implantasyonlarından sonra hasarlanan bölgelerde oluşan intimal hiperplaziyi önledikleri gösterilmiştir (Qiu, Tang, Zhang, Wen: 2002). Tiazolidindionların intrasellüler antioksidan aktivitesi vardır (Friedlander, Dorrell, Ritter, Marchetti, Moreno, El-Kalay, Bird, Banin, Aguilar: 2007).Bu ajanlar serbest radikaller üzerinde direkt antioksidan temizleyici etki göstermezler. Fakat oksidatif stresin oluşumuna neden olan hiperglisemik durumlardan birkaç mekanizmayı bloke ederek etki gösterirler. Son yıllarda TZD'lerin ve özellikle pioglitazonun potent glikasyon ve protein çapraz bağlanmasının inhibitörü ve güçlü antioksidan olduğu görülmüştür (Jonas, Witzens-Harig, Arseniev, Ho: 2007).Diyabetik hastalar inflamasyonun ılımlı şeklini içerirler (Chen, 2004).Diyabette inflamasyon, oksidatif stresin üretimine neden olan hiperglisemi ile ayrıca ilişkilidir. TZD'ler, antiinflamatuvar aktiviteye sahiptir ve

bunun, hipoglisemik etkilerinden bağımsız olabileceği diyabetik hastalarda doğrulanmıştır (Mizuguchi, Hui, Palm, Sugiyama, Mitaka, Demetriou, Rozga: 2001).

### **1.2.3. Peroksizom proliferatör-Aktive reseptör-gama-(PPAR- $\gamma$ ) agonistleri**

Günümüzde Parkinson hastalığı tedavisinde semptomatik tedavi, restorasyona yönelik tedavi ve nöroprotektif tedavi olmak üzere 3 temel yaklaşım vardır. Semptomatik tedavide, nigrostriatal dopaminerjik aktivite farmakolojik olarak artırılmaktadır. Restorasyon tedavisinde, dopaminerjik hücre harabiyeti oluşmuş bölgelere intraserebral hücre tranplantasyonu ve viral kökenli dopamin sentezleyen enzim taşıyıcıların aktarılması gibi yaklaşımlar üzerinde odaklanılmaktadır. Nöroprotektif tedavide ise araştırmacılar nörodejenerasyona yol açan mekanizmalar üzerine etkili olabileceği düşünülen ilaç grupları üzerinde çalışmalarını yoğunlaştırmışlardır (Backes, Howard, 2003). Üzerinde durulan ilaç gruplarından bir tanesi de PPAR- $\gamma$  agonistleridir. Peroksizom proliferatör aktive reseptörleri (PPARs) nükleer reseptör ailesinin üyeleridir ve gen ekspresyonunu ligand bağımlı veya bağımsız birçok moleküler süreçle düzenlerler. Alfa, gama ve sigma olmak üzere üç ana alt grubu vardır (Yang, Huang, Ma, 2006). PPARların membran lipid içeriği, hücre proliferasyonu, apoptoza duyarlılık, enerji homeostazı ve birçok inflamatuvar transkripsiyon faktörünü düzenleyerek aktif olarak immun-regülasyonda görev alır. İlaveten birçok çalışmada PPAR- $\gamma$  ligandlarının makrofaj aracılı inflamatuvar cevabı inhibe ettiğini göstermiştir (Scintu, Reali, Pillai, Badiali, Sanna, Argioli, Ristaldi, Sogos, 2007; Vidal, Díaz, Villena, Moreno, Campos, de Vargas, 2006).

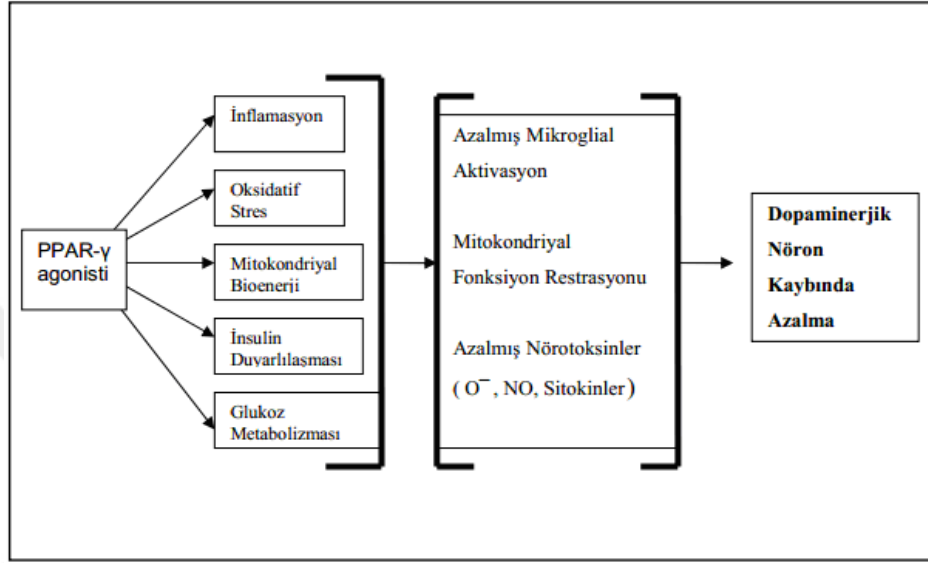
PPAR gama agonistleri, asıl olarak adipöz doku diferansiasyonu ve insülin aracılı lipid depolamayı düzenleyerek, insülin duyarlılığını artırıp metabolik sendrom bozukluklarını azaltırlar. Günümüzde diabet tedavisinde kullanılmaktadır. Bu etkilerinin yanında PPAR- $\gamma$ , nükleer faktör kappa-B (NF $\kappa$ B) gibi proinflamatuvar transkripsiyon yollarındaki antagonist etkiyle inflamatuvar cevapta değişiklik oluşturarak inflamasyon sürecinde düzenleyici rol oynar (Urcola, Hernández, Vecino, 2006). Bir başka çalışmada ise PPAR- $\gamma$  aktivasyonunun hem aktive hem de aktive olmayan makrofajlarda apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Aberg, Dhuner,

Sydnes, 1977; Agnew, McCreery, Yuen, Bullara, 1990). İnflamatuvar cevabın düzenlenmesindeki rolü tam belli olmamakla birlikte PPAR- $\gamma$  agonistlerinin inflamasyonu etkilediği bilinmektedir. İnflamasyonun birçok nörodejeneratif hastalıkta rolünün olması, PPAR- $\gamma$ 'ın bu hastalıklardaki etkilerinin araştırılmasına neden olmuştur. PPAR- $\gamma$  aktivasyonunun inflamatuvar cevabı düzenlediği ve birçok proinflamatuvar genin (COX-2, iNOS ve sitokinler) ekspresyonunu azalttığı ve bunların da nörodejenarasyondaki inflamasyonla ilişkili olduğu bilinmektedir. Ayrıca PPAR- $\gamma$ 'ın çeşitli beyin bölgelerinde (nöronlar ve gliada) eksprese olduğu bilindiğinden (Agnew, McCreery, Yuen, Bullara, 1990; Arıkan, Nurşen, Firdevs, Kenser, 1992) PPAR- $\gamma$  agonistlerinin nöroinflamasyonu dolayısıyla da nörodejenerasyonu engelleyebileceği öne sürülebilir. Alzheimer hastalarının temporal korteksleri (LR., 1986) ve iskemik beyinde (99) PPAR- $\gamma$  artışının bulunması PPAR- $\gamma$ 'ın nöroinflamasyon ve nörodejenerasyondaki rolünü desteklemektedir. PPAR- $\gamma$  agonistlerinin nöroinflamasyon ve nörodejenerasyona etkileri gösterildikten sonra PPAR- $\gamma$  agonisti, pioglitazonun Parkinson hastalığındaki olası tedavi edici etkilerinin araştırılması fikri ortaya atılmıştır.

Yapılan çalışmalarda pioglitazon tedavisi Parkinson hastalığı MPTP modelinde nöroprotektif etkili göstermiştir (Barsa, Batra, Fink, Sumi, 1982; Baulieu, Schumacher, 1997). Breidert ve ark. akut MPTP modelinde pioglitazonun inflamasyonu ve dopaminerjik hücre kaybını azalttığını fakat striatal mikrogial aktivasyon ve striatal tirozin hidroksilaz immunreaktivite azalmasına etki etmediğini ayrıca DA seviyelerini normale çevirmediğini göstermişlerdir (Barsa, Batra, Fink, Sumi, 1982). Bu sebepten PPAR- $\gamma$  aktivasyonu MPTP modelinde temel olarak SN'daki inflamasyonu etkilemiş ve pioglitazon hafif bir terapötik etkinliği göstermiştir. Dehmer ve ark. yaptığı kronik bir çalışmada ise pioglitazon daha etkili bulunmuş ve glial aktivasyonu ve iNOS ekspresyonunu hem SN hem de striatumda azaltmıştır. Ayrıca kalan dopaminerjik nöronlarda oksidatif stres markırlarında azalmaya neden olmuştur.

Bu etkiler dopaminerjik nöroproteksiyon ve kısmi restrasyon oluşturmuştur (Baulieu, Schumacher, 1997). Pioglitazon uygulamasının farelerde MPTP modelinde

MAO-B enzim inhibisyonuna neden olduğu bulunmuştur (Benoit, Changeux, 1978) Gerek pioglitazon gerekse de retinoik asit hipokampustaki DA seviyelerinde artış veya düzelme oluşturmamıştır. PPAR-gama agonisti pioglitazon iskemi-reperfüzyon hasarlı hipokampusta antiinflatatuvar ve koruyucu etki göstermiştir (Geren, 1954).



Şekil 1 : PPAR-γ agonistlerinin nörodejenerasyondaki etki mekanizmaları. (143 Randy ve Guoying 2007’).

### 1.3. Oksidatif Stres

#### 1.3.1. NOS ve serbest radikaller

Endotel kaynaklı nitrik oksid, hem deneysel çalışmalarda hem insanlarda sürekli vasküler tonusun fizyolojik düzenleyici olduğu ortaya konmuştur. NO bir mediatör olarak nörotransmisyon, immün direnç ve hücrel adezyonun düzenlenmesi gibi birçok fizyolojik olayda görev aldığı bilinmektedir (Bruhwylar, Chleide, Liegeois, Carreer, 1993).

Nitrik oksit renksiz bir gaz şeklinde bulunan inorganik serbest bir radikaldir (Şekil. 12).Yarı ömrü 2–10 saniyedir. Sentezlendikten kısa bir süre sonunda hemoglobin, metilen mavisi ve süperoksit anyonu tarafından nötralize edilerek nitrat



ve nitrite dönüşür (Bruhwyler, Chleide, Liegeois, Carreer, 1993).NO düşük konsantrasyonlar da çok önemli fizyolojik işlevlerde rol almaktadır (Moncada, Higgs, 1993).Yarı esansiyel bir aminoasit olan L-arjinin'in terminal guanidin grubunun NOS enziminin katalize ettiği bir reaksiyon sonucu nitrik oksite çevrilmesi sonucu sentezlenmektedir (Mishell, Shiiqi, Henry, 1980) NOS izoenzimleri NOS başlıca yapısal (konstitütif) ve uyarılabilir (indüklenebilir) olmak üzere iki grup altında toplanmaktadır (Marletta, 1993).Yapısal NOS (cNOS, NOS1, NOS3) hücre içinde sürekli var olan ve vasküler tonus ayarlanmasında ve nörotransmisyonunda rolü olan, intermittan küçük miktarlarda nitrik oksit üretimini sağlayan enzimlerdir. Esas olarak nöronlarda (nNOS), vasküler endotel hücrelerinde (eNOS), endokard, myokard ve trombositlerde bulunur.  $Ca^{+2}$  /kalmodülün bağımlı bir enzim olan cNOS çeşitli uyanlarla geçici olarak intrasellüler iyonize  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunun ( $10^{-7}$  mol/L) fizyolojik sınırlar içinde yükselmesi sonucu aktive olur ve esansiyel miktarda NO sentezlenmesine yol açar. Endotel kaynaklı eNOS (NOS- 3) arteriyel ve venöz endotel hücrelerinde bulunan membrana bağlı bir enzimdir ve eNOS aktivitesi asetilkolin, bradikinin, adenozin trifosfat (ATP), elektriksel uyarı ve sıvı akımıyla uyarılabilir.

Dolaşımın düzenlenmesinde, trombositlerin ve polimorf çekirdekli lökositlerin damar lümeniyle olan etkileşiminde görev alır. nNOS; beyin, cerebellum, nöroblastlarda bulunur ve nörotransmitter olarak görev yapar. (Katusic, Cosentino, 1994).Uyarılabilen NOS (iNOS, NOS- 2) fonksiyonel olarak  $Ca^{+2}$  bağımsız olması nedeniyle cNOS'dan farklıdır. Endotel hücrelerinden başka, özellikle düz kas hücreleri ve makrofajlarda bulunmaktadır. Makrofajların, nötrofillerin, mast hücrelerinin ve vasküler düz kas hücrelerinin sitokinlerle uyarılmasından sonra NOS'un gen tanımlaması başlayarak belirli bir sürede NOS sentez edilir ve hücrede nanomol gibi büyük miktarda NO sentezi yapabilir. Makrofajların aktivasyonu ile sentezlenen NO'nun başlıca makrofajlarda bulunmasına rağmen, vasküler düz kas hücreleri, renal tübül hücreleri, kupffer hücreleri, endotel hücreleri, monosit ve polimorf nüveli lökositlerde tespit edilmiştir (Katusic, Cosentino, 1994).Makrofajlar dışındaki hücrelerde iNOS aktivitesinin rolü yeterince bilinmemektedir. Ancak endotelde bulunan iNOS konjestif kalp yetmezliği gibi artmış sitokinlerin bulunduğu

durumlarda önemli olabilir. Sitotoksik rol oynarak immün cevapta, antimikrobiyal ve antineoplastik aktivitesinde önemlidir (Marletta, 1993).

NOS protein ve aktivitesi (Şekil 1) insan ve ratların testis, epididim, prostat ve seminal veziküllerinde tesbit edilmiştir. NOS antikorlarıyla yapılan deneysel çalışmalarda farelerin spermatozoa ve kuyruklarında NOS'un varlığı gösterilmesine rağmen spermatozoada bir mi yoksa daha fazla mı NOS izoformuna sahip olduğu bilinmemektedir. (Shiraishi, Naito, Yoshida, 2001).NO hücrelerdeki ATP sentetazı inhibe ederek ATP seviyesini azaltır. ATP üretiminin azalması ile enerji eksikliği meydana gelir ve enerjinin %90'ı ATP'den sağlandığı için sperm motilitesi bozulur. Mast hücrelerinin NO üretimini artırdığı bilinmektedir. Mast hücre sayısının artışının testiküler dokuda ciddi patolojik değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir (Menger, Rücker, Vollmar,).

### **1.3.2 Serbest radikaller ve apopitoz**

Apopitoz, reaktif oksijen radikallerinin hem mitokondri hem plazma membranı hem de genom üzerinde oluşturabileceği hasarlara bağlı olarak başlatılabilir. Fisher ve arkadaşları, 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) uygulanması ile spermatozoada ROS seviyelerinde artış gözlendiğini, bunun da mitokondriyal membran potansiyelindeki kayba aracılık ettiğini öne sürmüşlerdir. Moleküler seviyede, ROS, DNA'yı direk etkiler ve apopitozu indüklemenin en etkili yöntemlerinden biri olduğu bilinen intrasellüler kalsiyum seviyelerini değiştirir (Barutçu, 2008).

Hidrojen peroksitin apopitozu tetiklemede intrasellüler mekanizması tartışma konusudur. Bu molekülün kendisi reaktif olmayan bir yapıya sahiptir; peroksidatif hücrel toksik etkisinden, metal ile katalizlenen Fenton veya Harber-Weiss reaksiyonu sonucu üretilen oldukça reaktif hidroksil radikalinin sorumlu olduğu düşünülmektedir. Kasahara ve arkadaşlarının çalışmasında ise, hidroksil radikalinin etkisizleştirilmesi için dimetil sülfoksit veya bir demir şelatörü kullanılmış ancak

etkin bir koruma gözlenmemiştir. Bu da apoptotik yolun peroksidatif hasarla bir bağlantısının olmadığını gösterir.

Diğer bir apoptozdan sorumlu olabilecek serbest radikal olan peroksinitrit, nitrik oksit ve süperoksitin etkileşimi ile oluşur ve birkaç hücre serilerinde apoptozu indüklediği görülmüştür. Varikoselli hastalarda, peroksinitrit üretimi için ksantin oksidazın nitrik oksit sentaz ile birlikte çalıştığı düşünülmektedir ve normalde germ hücrelerinde saptanmayan endotelial nitrik oksit sentaz, insan testisinde, dejenere olan veya apoptotik germ hücrelerinde saptanmıştır. Apoptozu yol açan nükleer düzenleyici proteininin (NFkB) aktivasyonu, Fas reseptörünün çapraz bağlanması ve kaspaz aktivasyonu gibi farklı intrasellüler sinyaller, intrasellüler ROS üretimindeki artışla ilişkilidirler. Fas sisteminin, germ hücre apoptozunda anahtar bir düzenleyici olduğu bilinmektedir. (Lee, Cheng, 2003; Lee, Mruk, Wong, Cheng 2005).

#### **1.4. Programlanmış Hücre Ölümü**

##### **1.4.1. Hücre ölümü tipleri ve apoptoz**

Programlanmış hücre ölümü terim olarak ilk kez 1965 yılında kullanılmıştır. Apoptozis terimi ilk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır (Pleasure, Kreider, Shuman, Sobue 1985). Kerr, fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin parçalarını gözlemlemiş ve organellerin iyi korunduğunu fark ederek bu olayı büzüşme nekrozu olarak adlandırmıştır. Köken olarak "apo-TOE-sis" 'den gelmektedir ve eski Yunanca'da "sonbaharda yaprak dökümü" anlamına gelmektedir (Touchette, Fogle 1991). Hücrelerin doğru yer, zaman ve sayıda olmasını sağlayan apoptozis mitozis ile dokuda sürekli bir denge halindedir (Cummings, Winterford, 1997). Programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı, fizyolojik hücre ölümü apoptozis ile aynı anlamda kullanılan terimlerdir (Majno, Torisl, 1995).

Apoptozise uğrayan hücrenin komşu hücrelerle bağları kesilir. Hücre yüzeyindeki mikrovillüsler ve diğer hücrelerle yaptıkları özel bağlar ortadan kalkar,

hücre yüzeyi yuvarlaklaşır (249).Apoptotik hücre komşu hücreye göre daha küçük ve sitoplâzması daha yoğundur. Endoplazmik retikulum dışında diğer hücre organelleri yapılarını korur (267, 268).Sitoplâzma yoğunluğu arttığı için organeller kalabalık görünür. Hücre zarı sağlam olduğundan nekrozda olduğu gibi bir inflamatuvar reaksiyon gözlenmez. Hücreden hücreye değişmekle birlikte genellikle çekirdek büzülür (Cohen, Apoptosis, 1993; Cohen, 1993).Kromatin çok yoğun bir hale gelir ve parçalar halinde bir araya toplanır. Çekirdek porları seçilemez.

Çekirdek şekli düzensizleşir ve ileri evrede küçük çekirdek parçalarına bölünür. Çekirdekçik genişler ve granülleri kaba granüller halinde dağılır (Kerr, Wyllie, Currie, 1972).Hücrede önce yüzeye doğru tomurcuklanmalar olur. Bunlardan bazıları sitoplâzma parçacıkları içeren ve sıkı biçimde paketlenmiş organellerden oluşan zarla sarılı apoptotik cisimlere dönüşür (Cohen, Apoptosis, 1993; Cohen, 1993).

Apoptozis için morfolojik değişimler hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, hücre membran tomurcuklanması olurken fosfotidilserin açığa çıkar. Sağlıklı hücrelerde plazma membranının içinde bulunan fosfotidilserin apoptotik hücrelerde plazma membranının dış yüzünde bulunur ve fagositik hücreler için sinyal görevi görür (Lu, Ashwell, Ken, Waite, 2000; Lui, Mruk, Cheng, 2005).

Apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelebilirken nekrozis fizyolojik bir ölüm şeklidir. Apoptotik hücrede kromatin nukleus membranı agregasyon gösterir ve kondanse olur ancak nekroziste kromatin paterni normal hücredekine benzerdir. Nekrotik hücrenin plazma membranı bütünlüğünü kaybeder ve hücre içinden dışına hücre içi materyallerinin çıkışı gerçekleşir. Oysa apoptotik hücre membranı intaktır ve üzerinde küçük cepcikler “membrane blebs” oluşur. Apoptozis ile ölen bir hücrede hücre membranı intaktır ve enflamasyon gözlenmez; nekrozda ise, enflamasyon, hücresel şişme ve hücre zarının bozulması gözlenir (Fitzgerald, Woolf, Gibson, Mallaburn, 1984).Apoptozis bir hücre hasarına yanıt olarak meydana gelir oysa nekroz genelde hasar sonucu gelişir. Apoptozis önceden belirlenen bir yol ile koordineli olarak meydana gelirken, nekroz birçok

biyokimyasal olaydan bağımsız olarak gerçekleşir ve hücrede enerji stoklarının tükenmesi ile aktive olur (Denecker, Vercammen, Declercq, Vandenabeele, 2001).

Programlı hücre ölümü olgun dokularda intrensek intihar programının aktivasyonu ile hasarlı, infekte ya da değişime uğramış hücreleri ortadan kaldırmak için hem gelişimde hem de homeostazisde önemli bir mekanizmadır. Apoptozisin başlamasına neden olan ve soy hakkında bilgi içeren sinyaller viral yangı sinyali ya da ekstrasellüler sinyallerdir. Ekstrinsik sinyaller apoptozisi başlatır, ya da baskılar, intihar edecek olan hücrelere yardımcı olabilir ve aynı sinyaller bir hücre tipinde kurtulmayı başlatabilir. İntihar programının aktivasyonu spesifik mRNA molekülerinin sentezini translasyonunu gerektirir. Programlı hücre ölümü bazen hücre ölümünü intrensek mekanizmalar yoluyla transkripsiyon ya da translasyonu, kısıtlama ile de baskılayabilir.

Bir hücrede apoptozis mekanizması iki yolla düzenlenir: Hücre dışından kaynaklanan, hücre yüzeyi ölüm reseptörleri ile (Tümör nekrozis faktör süperailisi üyeleri ve bunların reseptörleri) düzenlenen apoptozis. Hücre içinden kaynaklanan, mitokondriyal yolla düzenlenen apoptozis (Scorrano, Korsmeyer, t.y.). Hücre yüzeyi ölüm reseptörleri Tümör Nekrozis Faktör Reseptör (TNFR) süperailisine ait transmembran proteinlerinin bir familyasıdır. Bu reseptörler hücre dışındaki bölgelerde tekrar eden sistein zengin bölgelerde yer alırlar. Ölüm reseptörleri sitoplâzmanın iç kısmında ‘ölüm bölgesi’ (death domain) denen protein zincirleri taşırlar. Ölüm bölgeleri, ölüm reseptörlerine ligand bağlandığı zaman apoptotik mekanizmayı uyarırlar ve hücre dışından gelen uyarıyı hücre içine iletirler (Kobayashi, Kuroiwa, Shimokawa, Okeda, Tokoro 2000).

Apoptozisi başlatan yolların kesiştiği kavşak noktanın mitokondri olduğu görülmüştür. Bu yüzden mitokondrinin aktivasyonu ile sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salıverilmesi sonucu apoptotik süreçte geri dönülemez noktayı gösterir. Mitokondrinin aktivasyonuna yol açan en önemli faktör Bcl- 2 ailesidir. Hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik üyeleri olan bu ailenin üyelerinin mitokondri üzerindeki etkileriyle ya sitokrom c'nin sitoplâzmaya salıverilmesi

gerçekleşir veya sitokrom c'nin sitoplazmaya salınması baskılanır. Apoptozis indükleyici faktörün mitokondriden çekirdeğe geçmesi apoptozis başladığında ve AIF'nin salınımındaki artışı, , mitokondrial transmembran potansiyelinin kaybolması, periferal kromatin kondenzasyonu ve plazma membranında fosfotidilserinlerin ortaya çıkmasına neden olur (Bryniarski, Szczepanik, Ptak, Ptak 2005). Bunun sonucunda yüksek moleküler ağırlıklı (50 kbp) DNA fragmentasyonu gerçekleşir. DNA hasarına cevaben de PARP (poly ADP-ribose polymerase- 1) aktive olur. Bu etkiler kaspazlardan ve AIF'nin oksidoredüktaz aktivitesinden bağımsızdır (Miramar, Constantini, Ravagnan 2001). Kaspaz aktivasyonundan bağımsız olan EndoG aktivasyonu, nükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olabilir (Zhang, Ebata, Robaire, Nagano 2006). EndoG'nin salınımı, kaspaz aktivasyonuna paralel olarak apoptotik programı başlatabilir. Bax ve Bak, BH3-only proteinlerin mitokondriye hareket etmeleri ve sitokrom c salınımının düzenlenmesi için gereklidir. Hücrenin yaşayabilirlik durumu pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerinin rölatif oranına bağlıdır. Bu heterodimerlerden biri olan Bcl- 2/Bax oranının bazı hematolojik malignansilerde prognostik değer taşıdığı rapor edilmiştir. Çünkü oranın artması ya da azalması apoptozisin inhibisyonu veya aktivasyonu ile sonuçlanır. Bu da prognozu belirleyici bir değer taşıyabilir.

Bid proteini yaşayan hücrelerde sadece sitoplazmada bulunur. Aktivasyonları sitokrom c'nin sitoplazmaya salınımını sağlar (Luo, Budihardjo, Zou, Slaughter, Wang, Bid, 1998). Bid'in apoptotik veya yaşam sinyal yolağındaki etkisi proteinin fosforilasyon-defosforilasyon mekanizması ile düzenlenir (Konishi, Lebdnen, Donovan, Bonni 2002). Bim ve Bmf proteinleri Bim, normalde mikrotübüllerle ilişki içinde olan dynein motor kompleksi ile birlikte bulunur. Apoptozis indüksiyonu esnasında mitokondriye göç eder. Pro-apoptotik aktiviteye sahiptir ve Bmf, apoptozisin tetiklenmesi sırasında mitokondriye göç eder ve Bcl- 2 ailesi ile etkileşime girerler (Putchu, Moulder, Golden 2001).

Sitokrom c, apoptozis sırasında mitokondriden salındığında kaspaz aktivasyonunu başlatan, mitokondrial elektron zincirinin bir bileşenidir (Luo, Budihardjo, Zou, Slaughter, Wang, Bid, 1998). Mitokondriyal yolla tetiklenen

apoptotik yolun erken fazında mitokondrial membran potansiyelinin bozulması ve ardından sitokrom c'nin salınması genel olarak önemli rol oynar (Grinberg, Sarig, Zaltsman, Frumkin, Grammatitakis, Reuveny, Gross 2002). Sitokrom c normalde iç mitokondri zarına anyonik fosfolipid 'kardiolipin' ile birlikte bağlıdır. Kardiolipin mitokondriye özeldir, iç mitokondri zarında predominant olarak bulunur. Kardiolipin ile sitokrom c'nin ayrılması ve sitozole salınması apoptozisin başlaması için ilk adımdır. Mitokondrial elektron transport zinciri ile reaktif oksijen radikallerinin ortaya çıkması; sitokrom c'nin harekete geçmesi ve kardiolipinden ayrılması ile sonuçlanır (Petrosillo, Ruggiero, Pistolese, Paradies 2001).

Apoptoz Başlatıcı Faktör (AIF) mitokondrinin iç membranında bulunur ve AIF 57 kD ağırlığında bir flavoprotein olup apoptozis başlangıcında mitokondriden çekirdeğe geçerek kromatin kondenzasyonu yoluyla DNA fragmentasyonunu sağlar. AIF oksidoredüktaz aktivitesi gösterir (Yu, Wang, Poitras, 2002). Bu etkiler kaspazlardan ve AIF'nin oksidoredüktaz aktivitesinden bağımsızdır AIF'nin çok fazla salınımı sonucunda, periferik kromatin kondenzasyonu, mitokondrial transmembran potansiyelinin kaybolması ve plazma zarında fosfatidilserinlerin ortaya çıkması (48) ile yüksek moleküler ağırlıklı (50 kbp) DNA fragmentasyonu meydana gelir (Miramar, Constantini, Ravagnan 2001 ).

Kaspazlar apoptozis mekanizmasında yer alan önemli protein grubudur. Hücre sitoplazmasında inaktif (zimojen) olarak bulunurlar ve proteolitik olarak birbirlerini aktive ederler. Böylece bir kaskad şeklinde işlerler. Aktif merkezlerindeki sisteinden dolayı sistein proteaz olarak adlandırılan enzim grubudur. Apoptozisde hücreyi parçalayan yani apoptotik morfolojinin oluşumunu sağlayan etkenler "effectors" olarak bilinirler. Bu güne kadar tanımlanan 14 kaspaz bulunmaktadır. (Schlatt, Ehmcke, Jahnukainen, 2009). Apoptotik sinyal yolunun erken safhasında etki gösterirler ve apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini iletici kaspazlara iletirler (Hofmann, Bucher, Tschopp 1997). Kaspaz İnhibitörlerinden bazılarının önemli olduğu durumlar nöro-dejeneratif hastalıklar, iskemi-reperfüzyon zedelenmesi ve otoimmün hastalıklardır. Kaspazlar potansiyel hedefleri oluşturarak bu hastalıkların tedavisinde inhibitör tedavide kullanılabilirler (Yamato, Egashira,

Utsumi, 2003). Reseptörler aracılığıyla kaspaz aktivasyonuna ve apoptoza yol açarlar. Diğer yol mitokondriden Sitokrom-c sitozol içerisine bırakılır ve kaspaz aktivasyon proteinine (Apaf 1) bağlanır. Ardından Apoptozom olarak adlandırılan multiprotein yapısındaki kaspaz aktive eden kompleksin toplanmasına neden olur (Şekil 1).

Apoptozis tanı yöntemleri içerisinde apoptotik hücre morfolojisinin değerlendirilmesinde kullanılan ışık, floresan, lazerli konfokal, elektron ve faz-contrast mikroskobu ile inceleme yer alır. DNA fragmentasyonlarının belirlenmesinde agaroz Jel elektroforezi, enzimatik yolla DNA fragmentasyonlarının belirlenmesi ISEL TUNEL, İn situ hibridizasyon tekniği ve Anneksin-V yöntemi ile apoptozise özgü proteinlerin saptanması ve flow sitometri yöntemi kullanılır (Moore, Persaud, 2009).

DNA fragmentasyonlarının belirlenmesi birçok farklı yol ile gerçekleşmektedir. DNA'nın 180- 200 baz çifti ve bunun katları şeklinde kırılması olarak ifade edilen DNA fragmentasyonu programlı hücre ölümünün belirleyici özelliğidir (Arends, Wyllie, 1991).DNA'nın bu özelliği agaroz jel elektroforezi ile belirlenmiştir. Fakat bu yöntemlerle apoptozisin kesinliği değil DNA'nın fragmentasyonunun anlaşılması için tanımlayıcıdır. Enzimatik yolla DNA fragmentasyonlarının belirlenmesi: TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase [Tdt]-mediated dUTP-biotin nick-end labeling) yöntemi 1992 yılında Gavrieli ve arkadaşları tarafından doku kesitlerinde ve hücrelerde ilk defa kullanılmıştır. TdT enziminin aktivitesi için DNA'nın 3' ucu biotinlenmiş dUTP ile birleşir. İn situ olarak DNA fragmentasyonlarının belirlenmesinde ise (ISEL), çoğunlukla Kornberg polimeraz (E. Coli'den elde edilen DNA polimeraz) DNA polimeraz I'in Klenow fragmenti ve TdT (Hilton, Love, Barber 1997) kullanılmaktadır. Bu yöntemler, tek ya da çift iplikli DNA kırıklarına işaretlenmiş nükleotidlerin bağlanması esasına dayanır. DNA fragmentasyonunda DNA iplikleri internükleozomal bölgelerde kırılma olur ve DNA'nın 3'-OH ucu ortaya çıkar. Dana (calf) timus TdT'si ile apoptozisin belirlenmesi, serbest 3'-OH ucuna biotin, dioksigenin-, floresan veya radioaktif olarak işaretlenmiş nükleotidlerin bağlanması esasına dayanır.



Avidin peroksidaz tekniği için 3,3'-diaminobenzidine (DAB) veya 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) gibi kromojenler kullanılarak biotinlenmiş nükleotidler belirlenir. Dioksijenin- işaretli nükleotidler, alkalen fosfataz, biotin ya da peroksidaz işaretli sekonder antikorlar kullanılarak belirlenebilir. Hematoksilen, metilgreen ya da DAPI ile rutin artalan boyaması kullanılarak TUNEL veya ISEL reaksiyonları belirgin hale getirilebilir. Ancak bu iki metodun zayıf tarafları vardır. Bunlardan birincisi apoptozis altındaki hücrelerde internükleozomal DNA fragmentasyonunun ölçülememesi, ikincisi ise DNA fragmentasyonunun apoptozis ile mi ilişkili olduğu yoksa DNA'nın rasgele olarak nekrozis ile mi parçalandığı fark edilemeyebilir. O nedenle apoptotik DNA fragmentasyonu biyokimyasal analizler ile desteklenmelidir.

#### **1.4.2 Apoptozun ışık, elektron mikroskopik ve biyokimyasal özellikleri**

Apoptosis terimi, yunan kökenlidir ve yaprak dökülmesi anlamına gelmektedir. Bu, sürecin nekrozdan ayırt edilmesi için bu terim kullanılmıştır. Elektron mikroskopik morfolojik özellikleri içersinde apoptozis, hücreleri, asenkron ve tipik olarak inflamatuvar değişiklik olmaksızın etkiler. En erken gözlenen olay, keskin sınırlı, yoğun, ince granüler hilal şeklinde çekirdek zarına bitişik kütle oluşturmak üzere kromatinin kondensasyonudur. Kondanse kromatinin nükleusa oranı, hücre tipine göre değişir; örneğin lenfoid hücrelerde yüksek, az heterokromatinli hücrelerde düşüktür. Nükleer porlar, kondanse kitlelerin yakınında nadiren gözlenirken, nükleer zarın geri kalan kısımlarında belirgin bir şekilde gözlenirler. Nükleolar değişiklikler de oluşur, ancak bunlar sadece kesitlerin bazı seviyelerinde görülmektedir (Barutçu, 2008).

Apoptozun farklı biyokimyasal özellikleri vardır. Apoptoz işlemi, enerji gereksinimi olan bir süreçtir. Fizyolojik hücre ölümünü, belli fazlara bölmek uygun olur. En erken faz, apoptotik cevabı başlatan stimulus fazıdır. Bu, yüzey reseptörleri aracılığıyla yayılan bir eksternal sinyal olabilir veya bir ilaç, toksin veya radyasyon etkisiyle hücre içinden orijin alabilir. İkinci faz, sinyalin veya metabolik durumun saptanması ve sinyal iletimini içerir. Sinyal iletim yolları, bu mesajı, hücre ölümü

effektör mekanizmasına iletir. Effektör faz ise, hücre ölüm mekanizmasının üçüncü kısmıdır ve pozitif ve negatif regülatörleri ile beraber proteazların aktivasyonunu içerir. Dördüncü faz, hücre kromatininin kondanse olduğu ve DNA'sının degrade edildiği postmortem fazdır. Hızlı nükleer DNA yarıklanmasına, uzun zamandır apoptozisin en önemli biyokimyasal göstergesi olarak bakıldı.

Bu DNA degradasyonu, iki aşamada oluşur. İlki, 200-300 kilobaz çiftlik fragmanlara ve/veya 50 kilobaz çiftlik fragmanlara yarıklanır. Nükleer zarfa doğru kromatin marjinalasyonu, muhtemel morfolojik görünümüdür. İkincisi, apoptoza giden hücrelerin tamamını olmasa da çoğunu etkileyen, internukleozomal (nükleozomlar arası bağlayıcı bölgelerden) çift iplikli DNA yarıklanmasıdır, böylece oligonukleozomal ebatlı fragmanlar oluşur. Apoptotik hücre debrisleri, in vivo hemen fagosite edilirler. Bu yüzden, hücre rüptüre olmadan önce, apoptotik hücrelerin, fagositlerce tanınabilmeleri için plazma membran değişimlerini tamamlamaları gerekir. Gerçekten, plazma membran değişimlerinin, programlanmış hücre ölümünde çok erken oluştukları gösterilmiş. Son çalışmalar, canlı hücrelerde, plazma membranının iç yaprağında lokalize olan fosfotidilserinin kritik bir rol üstlendiği bilinmektedir.

Apoptoza giden lenfositlerde, fosfotidilserinin dış yaprağa translokasyonunun, makrofajlar tarafından fagositik tanınmaya aracılık ettiği gösterilmiştir (Şekil 2). Martin tarafından yapılan çalışmalarda, sıçangillerde ve birçok insan hücre tipinde, başlangıç stimulusu ne olursa olsun, fosfotidilserin eksternalizasyonu en erken olay olarak saptanmıştır. Önemli olan bir not da, fosfotidilserinin yanısıra diğer yüzey molekülleri de, fagositik tanınma ve apoptotik hücrelerin alınmasında şüphesiz çok önemlidir. Apoptozise giden hücrelerde oluşan dramatik morfolojik değişikliklerden, sitoskeletal elemanlardaki değişimler ve yaygın sitoplazmik proteinaz aktiviteleri sorumludur. Cotter ve arkadaşları, mikrofilament topluluğunun, hücre fragmentasyonu ve apoptotik cisimlerin oluşumu için gerekli olduğunu göstermişlerdir. HL-60, Molt-4 veya U937 hücre dizilerinin, aktin polimerizasyonunda etkili cytochalasin B ile ön muamelesi, hücre tomurcuklanma ve apoptotik cisim oluşumunu engellemiş, ama nükleusu veya nükleer DNA'sının

fragmentasyonunu bloke etmemiştir. İn vivo, apoptotik cisimlerin, lizis olmaması ve böylece inflamasyona yol açmadığı gerçeği, apoptotik hücrelerde, iki önemli olayı vurgular; membran integrasyonunun korunması ve ani tanınma ve fagositoz. Sitoplazmik proteinlerle, geniş çapraz bağlar kuran doku transglutaminazının (tTG) aktivasyonu, yüzey kabarıntılarının (bleb) oluşumunda ve intrasellüler içeriğin hücrede tutulmasında anahtar bir rol oynamaktadır. tTG, apoptotik cisimlerde, en yüksek konsantrasyondadır.

Apoptozis çok sayıda ve çeşitte mediyatör ile hücre içi metabolik değişiklikler tarafından düzenlenir. Bunlar arasında genler (c-myc), bazı iyonlar (kalsiyum), proteinler (p53) ve hatta organeller (mitokondri) bulunmaktadır. Bazı mediatörler hücre tipine özgüdür, bazıları da apoptotik stimulusun çeşidine göre farklılık gösterebilirler. Apoptotik süreç boyunca hücre içine sürekli kalsiyum ( $Ca^{++}$ ) girişi olur. Sitoplazmada artan  $Ca^{++}$ , inaktif durumdaki  $Ca^{++}$  bağımlı proteazları ve nükleazları aktifleştirerek sitoplazmik proteinlerin parçalanmasına ve apoptoze özgü internükleozomal DNA kırıklarına neden olur.  $Ca^{++}$  iyonları endonükleaz aktivasyonunda, doku transglutaminaz aktivasyonunda, gen regulasyonunda, proteazların aktivasyonunda ve hücre iskeleti organizasyonunda rol alabilirler. Fakat hücreye  $Ca^{++}$  girişi, apoptozun gerçekleşmesi için esansiyel değildir (Barutçu, 2008).

## **1.5 Nöron Kültürü ve Nörotoksik Etki**

### **1.5.1 Kültür ortamı ve özellikleri**

İn vitroyu diğer tekniklerden ayıran özellik ortamın steril olmasıdır. Hücre kültür laboratuvarında preparasyon, inkübasyon ve kullanma sırasında aseptik fonksiyonlar meydana gelebilir. Hücre kültür laboratuvarında ortam, cihazlar ve atıkların uygun methodlarla sterilize edilmesi gerekir. Bu nedenle çalışmalarda sürekli steril hava akışkanlı laminar zeminli steril kabinler kullanılmalıdır. Kültür ortamının sürdürülmesi için ileri kontroller (sıcaklık, oksijen stresi ve karbondioksit

içerik) kritik öneme sahiptir ve hücre kültür inkübatörü mutlaka güç kaynağına bağlanmalıdır. Hücre kültürü laboratuvarı buzdolabına sahip olmalıdır (+4'den -20°C'ye) ayrıca ortam ve diğer ajanları saklama yetisine sahip olmalı ve uzun süreli nöronal hücre sıraları saklamaya yönelik nitrojen tank bulunmalıdır. Ters faz-kontrast mikroskopu veya 3D optik mikroskoplama (örneğin Haffmarn veya Nomarski) sahip olması, glial hücreler açısından morfolojik kültür tayininde gereklidir. Nitelikli kimyasallara erişim, steril pipetler, göz koruyucu cam, hücre kültür kapları aynı derecede kritik öneme sahiptir. Diğer ekipmanlar genel ihtiyaçlar çerçevesinde olup soğutmalı santrifüj, hücre sayacı, içeren hemotometre, pipetleme ekipmanları kullanmış ortam ayırıcı ortam ekipmanları sayılabilir.

Kültür ortamının korunması ve hücre karakterizasyonu etkileyici faktörlerdendir. Bir kültür sisteminin hücresel fenotipi, o kültürün ihtiyaç duyduğu gereksinimler tarafından kontrol edilir. Hücrelerin in vitroda yetişmesi ve hücre farklılığı, besin ve hormonal faktörlerdeki çevresel etkiye, hücrelerin içindeki ve hücreler arasındaki substrata bağlıdır. denemeler in vitrodaki kültür ortamı, substrat ve farklılık, girişim ve farklılaşmaya bağlı olarak şekillenir.

Bunun yanı sıra, kültürde bir hücre yetiştirmek in vivo'ya karşılık aynıdır. Hücresel heterojenlik kültür ortamında gelişim, çoğalma ve farklılaşma süreçlerini etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Birincil kültürlerdeki ilk hücre popülasyonu aşırı heterojendir ve bu in vivo'yu tamamen temsil eden kültürde hücre grupları oluşmasına imkân sağlar. Bazı özel problemler için, kültürlerde tek hücre tipi olması tercih edilir. Bu kültürler farklı beyin bölgelerinden ve donörlerin optimum yaş seçimine bağlı olarak seçilebilir. Büyüyen bir kültürde istenilen hücre türlerinin seçimi farklı yöntemlerle belirlenebilir. Örnek olarak sitotoksik antiserum belli bir hücre sınıfını öldürmek amacıyla kullanılabilir. Kritik hormonların ortamdaki yok edilmesi hücre türlerini seçimli olarak yok edebilir.

Glia ve fibroblastlar genellikle DNA sentez inhibitörüyle hücre bölünmeleri engellenerek sayısı azaltılabilir. Özellikle glia hücreleri için kullanılan başka bir metod ise; ortamdaki serum konsantrasyonuna müdahale ederek ve hücre

tutunmasında farklılık yaparak glia hücre sayısına müdahale edilmesidir. Bu metodların tümü saflaştırma sürecine yardımcı olur; kültürdeki hücresel saflayacak hiçbir metod yoktur. Çözünmüş hücre kültürlerinin ilk avantajı zenginleştirilmiş hücre tipi kültürü sağlamasıdır. Biyokimyasal ölçümlerde büyük miktarda hücreler, tek bir hücreden daha fazla avantaj sağlar. Eğer bu saf hücre kültürlerinden sonuç elde edilirse in vivo durumların belirsizliğine ışık tutacaktır. Kültürün kompozisyonu eğer bazı hücreler bölünmeye devam ederse zamanla büyük ölçüde değişebilir. Çok hızlı bölünen hücreler az bölünün hücrelere göre seçici bir avantaja sahip olacaktır. Eğer bire bir orijinal kültürden klonlanmış hücre kullanılacaksa, klonlar bölünme seviyesine göre sınıflandırılmalıdır. Bu nedenle yeni klonlarda izolasyon periyodu gereklidir. Fenotipik sürüklenme yaşayan ve mutant hücrelerde birincil kültürlerin belirlenmesi zordur.

Kültürde ortamlarında serum faktörü, çoğalmanın belirleyicisi olarak yer alır. Ayrıca kültür ortamındaki ortam içeriğinde şeker, tuz, aminoasit, vitamin gibi temel içerikler ile büyüme hormonları, büyüme ve tutunma faktörleri, içermektedir. Bu ortamların tamamı ile bileşen tayini çok zordur. Birçok birincil hücre kültür ve birçok hücre sıralaması için serumsuz kimyasal tabanlı ortamlar mevcuttur. Bu ortamlar; tuz, vitamin, aminoasit, büyüme faktörleri, kültüre edilen hücreye özel tutunma molekülleri içerebilir (60). Kimyasal tanınmış ortamlar sera yapısının doğasında olan ve çeşitli standardizasyon ve tekrar üretilebilirliğe bağlı problem oluşturucu ve kontrolsüzlük ihtiva edilebilir.

Buna karşın, eksiksiz süplementler olması in vivoya kıyasla çok düşük düzeyde kalacaktır. Çünkü sinir sisteminde birçok gelişim faktörü bulunur ve hücre dışı akışkanlar hakkında çok az bilgimiz vardır ve tanımlanan bu ortamlar in vivodaki hücrenin fizyolojik ortamı ile çok farklıdır. Ortam ve besin destekleri anlatıldığı üzere, farklı ortam şartlarında farklı gen ekspresyonları ve hücresel metabolizmada inanılmaz farklanmalar olabilmektedir. Örnek olarak; Epidermal büyüme faktörü (EGF) serumun fonksiyonu olarak değişir. EGF membran yüzeyine hücre büyümesi sırasında yapışık olarak kalır ve serum varlığında bu yapı korunur. Nöron tarafından üretilen glial fibriler asidik protein (GFAP) ve mikrotübülün ilgili protein sentezi

hem serum konsantrasyonu hem de kaynak hayvana bağı olarak etkilenir. Adrenal kortikal hücreler at serumu kortikosteronun yüksek miktarda salgısını içerir ve ama doğmamış buzağı serumundan hem morfolojik olarak farklıdır hem de buzağı serumu at serumunun sahip olduğu steroidlerin %1'ine sahiptir. Fenotip farklanmalarının kültür ortamında geri dönüşümleri yapılamaz.

Hücre substratı ve belirlenmesinde izlenecek yollar yine kültür ortamında hücre davranışını belirleyen ve yönlendiren önemli faktörlerdendir. Kendi metabolizmasını ve çoğalmasını sağlayan hücreler substratında yetişir. Genellikle kollajen, fibronektin, poli-D-lizin, poliornitin ve yüksek sülfonat içeren plastik doku kültürü hücre substratı olarak kullanılır. Bazı hücreler destekle (örneğin; eklenen yüzey yapıştırıcılar geretiren) gelişirler, oysa diğer poliferat/farklılaştırıcıların ikisi de gevşek tutunur veya tekrar agregat oluşturarak süspansiyon kalır. Eğer hücreler deneysel çeşitlendirilmiş adhezyon durumunda büyütülürse, hücrenin birçok biyokimyasal karakteristiği değişir. Örneğin, poli-D-lizin nöral hücre kültürlerinde hücre-substrat tutunmasını yükseltmek için kullanılır. Poli-D-lizin birçok kere prokürsör alımı, enzim çalışmaları, izotipik işaretlenmiş ligantların hücre yüzey reseptörlerine bağlanma çalışmaları gibi yıkama gerektiren deneyler boyunca sürekli hücre tutunmaları çalışmalarında kullanılır. Boya alımında hücre canlılığı için bile, en yüksek seviyedeki saldırıda canlı hücreler deneysel sonuçta kritiktir. Bunun yanı sıra Poli-D- lizin genellikle hücrede fenotipik değişimlere, morfolojik değişimlerde, radikal yapıda ve metabolizmada yükselmeye sebep olduğu için kullanılır (Heath, Kidd, Trapp, Dunkley 1991).Çünkü hücre-poli-d-lizin etkileşimi cAMP sentezini ve normal iyon kanallarına girişimini değiştirebilir, bu substrat elektrofizyolojik deneylerde hücreler için kullanılamaz.

Hücrelerin her süspansiyonda gelişebilmesi veya yüzeye yapışabilmesinin her ikisi için de metabolizmadaki bazı değişiklikler gözlemlenmelidir. Fibroblastlarda, hücrelerin tutunmaya veya askıda kalmaya bağlı olup olmadığını anlamak için çeşitli amino asit dönüşüm sistemleri kullanılır. Yüzeye tutunan fibroblastlarda, süspansiyon olarak büyüyen hücrelere kıyasla daha fazla tübinin proteini bulunur. Substrat-bağı fibroblastlar antisera ajanlarının sitolizinde çok hassastır. Substrat

hücre morfolojisini ve gelişim oranını belirleyebilir. Plastik kültürde yetişen fibroblast benzeri hücreler düz ve uzayan ve hızlı gelişen hücreler yetişir. Aynı hücreler hidrofobik bakteriyal plastiğe tutunmadan, yuvarlak şekilli ve yavaş gelişim gösterebilir. Gelişim ve morfolojinin düzenlenmesi için yapılan bu deneyler hücrelerdeki farklılıkların küçük değildir; fibroblast benzeri hücrelerin DNA sentezini başlatabilir.

Hücre beslenmesi yine farklılaşmanın yönlendirilmesinde yer almakta ve farklı kültürlerde değişik etkiler elde edilmektedir. Hücre ortamının ya da besinlerinin kültürde rutin değişimi sırasında, hücre kültür ortamının değişimine bağlı etmenlerden dolayı mevcut fenotip farklı hücre fenotiplerine kayabilir. Öyleyse, yeni eklenen ortamın yarattığı etkilerden dolayı oluşan deneysel etkilerden emin olunmalı ve bunlara göre önlem alınmalıdır. Örnek olarak, yeni ortam eklenmesi ile endotel hücrelerinde plasminojen aktivatör aktivitesinde düşüş gözlenir. Bu ortamın serumundaki inhibitör faktörlere bağlı gelişir. Bu etki serumsuz ortam kullanılarak kesilebilir. Fakat nöral hücrelerde, ortama yeni büyüme faktörleri eklenmesi veya salgı halindeki büyüme etkenlerinin ortam değişimi ile seyreltilmesi, aynı zamanda geçici hücre fenotip değişimlerine de sebep olabilmektedir. Kültür ortamındaki değişimin sonucu olarak, ortam pH'ında geçici olarak 7,4'ün üzerine çıkma gözlenebilir. Bu pH değerinde proses büyüme faktörlerinde benzer uyarılma etkisi gösterir. Atmosferik oksijen gerilimi sinir hücre kültüründe düzeyi korunması gereken kritik öneme sahip olan bir bileşendir. Yayınlanmış protokollerin büyük çoğunluğunda hücre kültürü inkubatörünün hava oranı %95 hava %5 CO<sub>2</sub> olarak kabul ediliyor. Serebral kortikal nöronların canlılığı, astroglia hücrelerinin bölünmesi ve olgunlaşması %10'luk kısmi oksijen basıncı ile maksimize edilmiştir(61).

Hücre-hücre etkileşimindeki farklılaşmadan dolayı, metabolizmadaki farklanmalar ve farklanma dereceleri hücrelerin tekrar agregatlaşması veya yüzey tutunmalarındaki farklanmalara etki ederek gözlenmiştir. Hücre döngüsü açısından bakıldığında tüm farelerdeki protein sentezi gelişen ve sabit fazdaki hücrelerde aynıdır; ancak sıçanlardaki sentezde özel proteinlerin çeşitliliği hücre fazının fonksiyonuna göre %40 civarında değişir. Bu nedenle, deneysel protokoller hücre

döngüsünün değişmesi (antimikotik ajanlar) tasarlanmasını içerir. Bu tasarıda hücre gelişmesi sırasında kültürdeki birincil deneysel etkiler ve ikincil sonuçların arasındaki ayırım yapılmalıdır. Hücredeki fenotipik değişiklikler de hücre döngüsüyle ilişkilidir. Hücreler sadece kültürdeki farklı gelişme fazları boyunca değişebilir değildir yani hücre döngüsü boyunca değişebilir. Normal çoğalma miktarının altında, çoğalan hücrelerin hücre dışı makroleküler sentezleri her zaman statik faz hücrelerinden kantitatif olarak farklıdır.

Sinir dokusundaki birincil kültürlerin çoğu girőimi embriyonal ya da doğumdan sonraki materyalin kullanılmasında dâhildir. Bu yetişkin vertebrat CNS'den oluşturulan kültürlerin çoğalmasının zorluğu yüzündendir. Bu zorluk hücre izolasyonu ve preparasyonu prosedürleri sırasında oluşan nöronsal hasardan doğar. çeşitli beyin bölgelerinin, beynin her bölgesinden nöron kültürlerinin zamanlama zorluğundan dolayı farklı yaş periyotlarının sebebiyle başarılı olabilir. Hatta aynı beyin bölgesi, bireysel yaşlarda hücre tipleri gerektirir. Örneğin; sıçan beyin serebellumundan, doğum sonrası altı sekiz gün arasında granül hücreler izole edilmiştir, fakat başarılı Purkinje hücre kültürleri fetal dokudan izolasyon gerektirir. Glial hücre kültürleri başarılı kültürün olabileceği yaş açısından daha geniş bir pencere sunar. DNS içeren birincil kültürler yaşlı dōnorlardan daha büyük başarıya ulaşır (Aubin, 1999; Corti, Locatelli, Strazzer, Guglier, Comi 2003).

Tüm hücre tipleri için, kültür yaşı, kültüre müdahale cevabı konusunda kritik önem taşır. Bu önem taşımaya rağmen birincil hücre kültürleri ek nütrient ortam ve substrat kullanılmasıyla birkaç ay boyunca korunur, hücrelerdeki metabolik malzemeler zamanla deęiőtięi iyi bilinmektedir. Dōnor yaşı faktörü, kültürün yaşı kadar, birincil kültür sistemleri ile de ilgilidir. Bu kültür sistemleri çeşitli ajanlarda farmakojik ya da toksikolojik gelişmelerde kullanılır. Kültür kesidi yeni doğan hayvanlardan hazırlanır, bu yaştaki dōnorlarda final hazırlığına ulaşmış organotropik organizasyon dereceleri kritiktir. Genellikle, doku yaşamlarındaki ilk haftaları olan sıçanlarda elde edilir. O zamana kadar, iyi derecede dokuya özel hücre mimarisi kurulmuştur ve nöronal göçün en yoğun noktası geçmiştir. Kültürdeki iki üç hafta içinde, pseudomonolayer hücrelerinden ince bir kesit oluşur ve büyüme



derecesi ve farklılaşma deneysel büyüme öncesinde gelişebilir (Deacon, Dinsmore, Constantini 1998; Deliloglu-Gürhan, Tuğlu, Vatansever, Özdal-Kurt, Ekren, Taylan, Sen. 2006).Ex vivo çalışmalar için, doku herhangi bir yaştaki hayvandan elde edilebilir; ancak, bölgedeki büyüme örnekleme öncesi ve verinin elde edilmesi ile ilgilidir.

Hücre hatları genellikle tümörojenik dokudan ve çeşitli yaşlardaki donörlerden sağlanır. Kültürde, bu tipteki hücreler yaklaşık olarak 50 divisyonla karakterize edilen kullanışlı bir yaşam süresine sahiptir. Hücre hattı fenotipi bir kere belirlendiğinde, bu değişmez; ancak yükselen akış için psikolojik cevap konusunda yavaş sürüklenme vardır. Kültürün yaşı kültürün toksik maddelere karşı olan hassaslığında etkilidir. Hem sürekli hücre sıralarında geçit sayı hem de tekrar agregatlaşmış hücre kültürlerindeki olgunlaşmış ve birincil hücre kültürlerindeki hücresel olgunlaşma kültürün yaşına bağlı olarak optimum göre deneye yön verilmelidir. Örnek olarak, MPTP'nin dopaminerjik nöronlara toksitesi tamamen gelişmiş ve büyümüş dopaminerjik nöronlarda bariz olarak yüksek değerdedir ve toksite, olgunlaşmanın getirdiği fizyolojik proseslere bağlı olarak değişen iyon kanalı aktivitesine bağlıdır.

Aynı hücre farklı besiyeri uygulamaları ile farklı hücrelere dönüştürebilir. Yine aynı hücre farklı besiyerlerinde aynı toksikanta farklı tepkiler verebilir. Genelde kültür doku kaynağı olarak doymamış ya da yeni doğmuş hayvanlar kullanıldığından dolayı, yetişkin farklanmış nöron veya glial hücreler kültürde temsil edilmez. Örnekler cebellar granül hücreleri, dişli girus nöronları içerebilir. İki hücre türünde de doğum sonrası dönemde bölünmesi durmuştur ve kültürde birkaç gün geçirmeden iyon kanalı barındırmaz. Nöroblastoma ve benzeri hücre dizin kültürlerinde, tropik büyüme faktörleri, morfolojik farklanmayı ve ortalama gen ekspresyonunu değiştirir. Sinir büyüme faktörü(NGF) içeren uyarılmış iyi tanımlanmış sıçan pheochromocytoma (PC-12) hücreleri ve retinoik asit indüklenmiş insan nöroblastoma (SMS-KCNR; SNSY5Y) hazneleri örneği verilebilir. İki durumda da, müdahale edilen hücreler nöritlere dönüşür, sitoiskelet elemanlarında sentezler, önemli gen ekspresyonu farklanmaları oluşur ve hücre

bölünmesi yavaşlar ya da durur (Flaskos, McLean, Fowler, Hargreaves 1998; Jones, Anderson, Galvin 2003). Farklılaşma durumu nörotoksit maddelerin potansiyel hedefleri arasındadır. Özel durumlarda, bazen görece saf nöron veya glia hücre kültürleri istenebilir. Kültürün saflığını belirlemek üzere kültür sadece mikroskobik değil immünohistokimyasal metodlarla da kültürdeki hücre türlerinin belirlenmesi gerekebilir. Tüm kültür sistemlerindeki temel nokta hücre saflığı ve kültür heterojenitesidir. Bundan dolayı, karakteristik morfoloji ve kültürün antijenik fenotip hücre türleri tanımlanması için özelleştirilmiştir. Bunlar hem immünohistokimyasal hem de enzimatik işaretleyiciler CNS hücrelerinin bolluğu ile alakalıdır. Hücre kültürüne muhtemel bir başka hücre türü de fibroblast hücreleridir.

Hücre kültürlerinde kontaminasyonu engellemek amacıyla ortama Antibiyotikler ve/veya fungusitler eklenir. Bu eklenenler hücresel aktiviteyi azaltabilir ve ilaçtan kaynaklanan nörotoksik etkiler görülebilir. Aksine bakteri ve mantarların, gelişimi, kültüre edilen hücrede makroskobik ya da mikoplazmayla kontaminasyonu genellikle raporlanmamıştır. Bunun yanı sıra, mikoplazma kontaminasyonu metabolizmada değişim, yetiştirme, canlılık, DNA, RNA, protein sentezi, morfoloji ve virüs yayılması gibi deneysel çalışmalarda istenmeyen yan etkilere sebep olabilir.

Kültür sistemini etkileyen nörotoksikolojik etkiyi arttıran bazı faktörler vardır. Örneğin, bir tek hücredeki canlılık ve yayılabilirliği hücre kültüründeki teknik müdahalelerden çok etkilenir. Birincil kültürler için, ayrışma metodu büyük etkiye sahiptir. Hücrelerde genellikle enzimatik ayrılma mekanik tekniklerden daha iyi hayatta kalabilmeyi sağlar. Şu önerilmektedir ki, erken prenatal evrelerde mekanik etkiler hücrenin hayatta kalmasını çok etkiler ve enzimatik etkiler geç prenatal ve doğum sonrası yaşlarda hücrelerin izole edilmesinde hücrenin hayatta kalmasında çok etki gösterir. Hücre dizileri için, hücrelerin depolama şekli ve kaplama metodları hücre canlılığını etkileyebilir.

Özet olarak, kültür sistemleri, bir kimyasala hücresel cevaplı deneylerde potansiyel olarak avantaj sağlar, biyolojik proseslerin değiştirilmesi in vivo uygulanabilir değildir ve mekanizmanın altında yatanların değerlendirilmesi sinir

sisteminde hücresel gelişimi ve fonksiyonuyla ilişkilidir. Kimyasalların kültürlere eklenmesi ve kültürlerden çekilmesi kolay olmasına rağmen ve etkileri direk olarak kültür sisteminde görülür. İn vitroda gözlenen hayvanlarda etkilerin meydana gelişi gibi benzer etkiler kullanılabilir.

Kültür sistemi kullanımı kısmen uygun olsa da, canlıdaki nörotoksosite tahmin edilebilir bir kimyasal ya da bir dizi potansiyel ilişkili bağlıdır. İn vitro sistem modelleri toksik etkinin belirlenmesinde uzun zamandır kullanılmaktadır. Sinir sistemi fonksiyonunun incelenmesi için, özellikle in vivo nörotoksikantlar tarafından hedef olan önemli biyokimyasal ve morfolojik özellikleri içerecek şekilde seçilmiştir.

Hücre kültürlerini birbirinden ayırmak için deneysel müdahale kültür kesidinden daha elde edilebilir ve daha kolay sağlanabilir ve korunabilir. Piretiroid insektisitler sitotoksik olmayıp nörotoksik olan pestisitlere örnektir. Piretiroidin nöron canlılığına etkisi yoktur. İn vitro veya ex vivo testlerle organofosfat pestisitlerle nöropati hedefli esteraz (NTE) ölçümlerinde gecikmeli nörotoksik nörotoksik potansiyel ölçümleridir. Asetilkolin esteraz (AChE) inhibisyonunda NTE yaşlanması oranı normal beyin homojenatları ve hücre kültürlerinde ölçülmüştür. Bu bize ilişkili akut toksik etkiyle gecikmiş nörotoksik potansiyel bilgilerini sağlamış biyoaktivasyonun organofosfatlara yapılması örneklendirilmiştir. Sülfat formu (paration gibi) biyoaktif hale geçene kadar çok düşük toksik potansiyele sahiptir. Biyoaktivasyon kapasitesi in vivo olmayan mekanizmalarda bulunmaz ve bundan dolayı ex vivo ve in vitro sistemlerde bu mekanik aktivite gözlenemez.

### **1.5.2 Nöron kültürünün değeri**

İN vivo çalışmalar etik nedenler ile gittikçe zorlaşmakta ve in vitro çalışmalarla daha çok çalışılması en son durumda kesinlik kazanması halinde in vivoya geçmek daha doğru bir yöntemdir. İn vitro çalışmalarda özellikle toksik etkinini değerlendirilmesi gereksiz canlı denek kullanılmasını önlemek açısından oldukça önemlidir. Ancak bu durum bazı riskleri de içermektedir. Risk değerlendirmesi genellikle kendi içerisinde şu kısımlara ayrılmıştır: a) risk analizi, b) doz-tepki

ilişkisi, c) maruz kalma değerlendirmesi ve d) riskin tanımlanması. in vitro test düzeneklerinin dizaynı in vivo test sistemlerine göre daha zordur. in vitro sistemler daha korunaklı olan biyolojik proses çalışmaları için daha uygundur ve toksiste çalışmalarını, belirlenen hücrelerdeki nörotoksiste belirlenmesini, ve hücrelerin nörotoksikantlar tarafından uyarılmasıyla gelişme ve karışıklığın belirlenmesini en başarılı şekilde açıklar.

İn vitro nörotoksisite çalışmalarının temeli birincil uç noktaların spesifik mekanizmalardaki nörotoksisitenin etkileri kullanılabilir. Örneğin; In vitro sistemlerde hedef hücreleri ve nörotoksisite ilgili biyokimyasal süreçleri iyi bilinen organik fosforlu bileşikler ve gecikmiş nöropati, yapısal olarak tanımlanan belirli toksistelerde bileşikler ve mekanizmaları için kullanışlı olabilir. Diğer bileşikler ve değişik tiplerdeki nörotoksisite için toksiste mekanizmasının tanımlanması gereklidir. in vivo ve in vitro methodların her ikisi tarafından, bir sistemle in vivo nörotoksisite sonucunun tahmin edilebilirliğinin belirlenmesi ve değerlendirilmesidir (McLean, Ward, 1998).

Genel açıdan nöronlar diğer tüm vücut hücreleriyle aynıdır, fakat nöronlarda ek olarak anatomik farklılaşma olan nöron toplulukları arasında ve diğer hücrelerle iletişim kurmayı sağlayan sinir uçları içeren akson ve dendritler bulunur. Bu dendritler hücreden yayılımı ve diğer kaynaktan alıp hücre içine taşıyarak iletimi sürdürürler.

Aksonlarda sinyal iletiminde kullanılan yüzey alanı hücrenin ana gövdesinin yüzey alanından boyutu binlerce kata kadar büyüktür ve hücreden çıkan diğer hücrelere ve sinir uçlarına ulaşan sinir uçlarına özelleşmiştir ( nöron kas hücreleri, ya da glandular hücreler).Nöron hücresinden çok miktarda membran koruyucu ve genel özellikli önemli bileşikler sentezlenir. Birçok akson glia hücrelerinin (miyalin kılıfı) hücre salgılarından olan bir membranla çevrilidir. Miyelin tabakanın varlığı miyelin kılıf ve her bir glia hücresinin Ranvier düğümü arasında uygun iletim sağlayarak sinir impulslarının hızlanmasına izin verir. Aksonun her düğümü henüz miyelinsiz olan teloglial hücrelerdir. Buna rağmen miyelini olmayan aksonlar miyelin lamelden

yoksundur, bunlar benzer hücre olan plazmolemma tarafından sarılmıştır. Nöronlar birbirlerinden bilgi alma, tamamlama, aktarma ve depolama için özelleşmiştir.

Nöronal yapılara maddelerin verdiği zararlar değişebilir. Dejenerasyon perikaryondan direk etkiyle ya da inaktif hedef bölgesi ve tropik faktörlerin yokluğuyla uyarılabilir. Birkaç kimyasal nöral popülasyonlar için spesifik farklılıklar ortaya çıkarır. Buna karşın spesiflik olabilir ve model dejenerasyon diagnostik nöropatolojide, herhangi bir nöron tipinin partikülünde zarar verici ajan gerekli olmadan kullanılabilir. Genellikle bu model zarar ve akutluğun ya da kronik doğal maruziyetin şiddeti ve süresini yansıtır. Sinir hücresinin dejenerasyon oluşumu mekanizmaya bağlı olarak hızlı ya da yavaş, uzatılmış süreçli olabilir. Glial hücreler ve nöronlar arasındaki hücre- hücre etkileşimi her iki nöral ve glial farklılaşma ile düzenlenebilir ve glial model nöronların göç etmesi sırasına kritiktir. Gliyal hücreler hareketli ve kritik sinir sisteminin normal fonksiyonunun sürdürülmesi sürecinin sağlanmasında gereklidir (örneğin, bölgesel pH ve iyonik dengenin düzenlenmesi ve yetiştirme faktörleri ve hücre adhezyon faktörlerinin tropik desteği). Bu hücreler toksik yanıt için hedef oluşturabilir. Sinir sistemi hasarından sonra, astrosit ve mikroglialın her ikisi de büyük zarar görür. Bölünme ya da morfolojik değişim tarafından gerçekleştirilen astrosit yanıtı hücrel hipertropi tarafından karakterize edilir. Bu reaktif gliosis süreci sinir sistemi hasarı belirleyicisi olarak belirlenmiştir ve morfolojik ya da glial fibriler asidik protein (GFAP) olan astrosit-spesifik protein ölçümleriyle bu durum belirlenebilir. Yanıtın sonucu hızlı ve uzun olabilir ya da aşamalı ve sürekli belli periyotlarda tekrar eden olabilir.

Nörotoksistenin belirlenmesindeki in vitro sistemlerin rolü giderek artmakta ve in vivo çalışmalara ciddi alternatifler olarak görülmektedir. Nörobiyolojide, in vitro hücre kültür teknikleri anlamlı sistematik kompleks sinir sistemleri cevabı geliştirilmesinde ve alıcı spesifik sinir sistemi fonksiyonlarında kullanılmıştır (Shareef, Garcia-Valenzuela, Salierno, Walsh, Sharma, 1995; Temeltas, Dagci, Kurt, Evren, Tuğlu, 2009; Deliloglu-Gürhan, Vatanserver, Özdal-Kurt, Tuğlu, 2006; Deliloglu-Gürhan, Tuğlu, Vatanserver, Özdal-Kurt, Ekren, Taylan, Sen, 2006; Corti, Locatelli, Donadoni, Strazzer, Salani, Del Bo, Caccialanza, Bresolin, Scarlato G,

Comi, 2002).Bu sistemler iki ana ve kritik özelliğe sahiptir. Birincisi CNS elementlerinin hücresel karmaşıklığını nörobilimcilere ve nörotoksikologlara öğretir. İkincisi, in vitro olarak muhtemel durumları ve fonksiyonları test etmeye yarayan uyumlu bir deney aracı oluşturulur (Hou, Cao, Wei, Bai, Zhang, Wu, Pei; Koshizuka, Okada, Okawa, Koda, Murasawa, Hashimoto, Kamada, Yoshinaga, Murakami, Moriya, Yamazaki, 2004).

Nörobiyolojide in vitro metodlar in vivo metodlara kıyasla çok az kullanılır. Genel olarak canlılarda araştırma yapılmaz onun yerine hücresel yaklaşımı kabul görmüştür. Ancak in vitro sistemler sorulara bütünsel değil kısmısal cevap verir. Buyüzden soruya cevap olmaktan çok cevapları destekler. Biyoloji ve farmakolojik birçok soruya in vitro sistem uygun olmayabilir. Reseptörlerin kimyasal etkilerini incelerken bu durum çok az bilgi verir. Potansiyel nörotoksik maddelerin anlaşılmasına yönelik araştırmalarda primer hücre kültürleri,hücre dizileri ve klon hücreleri kullanılabilir. in vitro tekniklerle; insan ve hayvan modellerinde olan nörotoksin ajanların tahmininde şüphe ile yaklaşır. Bu bağlamda validasyon adımlarının çalışma dizaynında; toksisite tanımlamalarında ve kimyasalların bütün canlı ve in vitro kültür çalışmalarındaki cevabını validasyon adımlarıyla uygunluğuyla düşünölmelidir.

Sinir sistemlerine kimyasal karışımlar uygulandıında, Kimyasalların nadiren tüm nöronlara saldırması rastlantısaldır. Hücresel toksisite hücrelerde sipesifik hassaslık test bileşisindeki ekstraselöler konsantrasyona bağlıdır. Etkiler uygulanan birincil toksikant yüzünden görölmeyebilir, fakat biyoaktivasyon sonuçları sonraki metabolit yanıtları değildir. Ek olarak in vivo nöronlardaki toksik cevaplar nöronal ve nonnöral hücrelerin toksisite sonuçları olabilir. İn vitro sistemin kullanılması için, in vitro sistemlerde kimyasalların sebep olduğu bütün etkilerin bulunamadığı akılda tutulmalıdır. Bu sınırlama kısmen olası hedef bölgenin eksikliği ve hücre tipleri arasındaki sinerjistik etkileşimler nedeniyledir. Ek olarak limitli kültürel yaşam yanıtın tekrarını görölmesine imkân vermemiştir ve geçici ve kalıcı etkilerde farklılığa sebep olmuştur. Birçok kimyasal endüstriyel kullanımda biyolojik organizmaların nasıl etkilediğine ilişkin sınırlı bilgi içerir. Örneğin; bir metil

grubunun eklenmesi molekülde önemli bir değişiklik yapmazken molekülün biyolojik etkisi kötü sonuçlar doğurabilir.

Genel olarak, güvenlik testi insan ve diğer hayvan popülasyonlarında önemsiz maruziyetler düzeyinde dizayn edilmiştir. Böylece, risk bilgisi için uygun sistem biyolojik, fizyolojik, moleküler ve diğer hücresel organ süreçlerinin fenotipiyle benzer etkide olabilir. İn vitroda gözlemlenen doz-tepki verilerinde in vitro ve in vivo kimyasal maruziyetinde dikkat çeken farmakokinetik veriler kullanılmalıdır. in vitro çalışmalarda kullanılan nörotoksiste mekanizma(lar)ının tespiti bir etkinin ortaya çıkmasının gelişimine katkısının olup olmadığı bulunabilir ve gözlemler hayvanlar ve insanlarda kimyasal maruziyet sonuçları ters olabilir.

Nörotoksik etkiyi saptamada in vitro nörotoksistenin iyice anlaşılması in vivo çalışma yapılmasıyla önerilir. Çünkü nörotoksik etki için tek başına yeterli kabul edilmeye bilir. Bu nedenle in vitro veriler genellikle in vivo verilerin güvenilirliğini arttırmada kullanılır. Fizikokimyasal olarak hücrenin yaşam ortamı olan in vitro ortamı kolayca kontrol edilebilir, kültür ortamına kolayca madde eklenebilir veya çıkarılabilir. Test kimyasalları istenilen konsantrasyonda tüm hücrelere ulaşacak düzeyde (kontrol altında) tutulabilir. Fakat bu konsantrasyon in vivo koşullarda maruziyetin anlamlı olması gerekir. Buna ilaveten bileşik fiziksel olarak hücrede bulunabilmektedir. Substratın hücre içine doğrudan enjekte edilebildiği teknikler bulunmaktadır ve bunlarda hücre çalışmalarına ve hücre cevabının araştırılmasına ve hücre cevabının araştırılmasında kullanılır. Sonuç olarak bu teknik spesifik sorularla sınırlı cevaplar verir, non- fizyolojik etkidir. Lokal etki (petri içinde kimyasalın dağılmaması) enjeksiyonun hücreyi yaralaması gibi sonuçlar doğurur.

Fizikokimyasal özellikler, çözünürlük uçuculuk, pH, kimyasalın kültür ortamındaki bağlanmaları ve ozmolarite, kültür sistemlerinde öncelikli düşünülmesi gereken özelliklerdir. İn vitro kimyasalları değerlendirmek hem sıvı sistemlerdeki çözünürlüğü pH duyarlılığı açısından zordur. Ayrıca zamanla presipite veya agregatlaşma görülebilir. Hücreleri, çözülmeyen Tween-80, dimetil sülfoksit (DMSO) veya etanol gibi maddelere maruz bırakmak için genellikle kültür ortamına

eklemek ve toksik karakteri bozmak sureti ile hücreler maruz bırakılabilir. Bazan araştırmacılar bu çözünmeme problemini aşmak için fizyolojik taşıyıcılar kullanabilir (albümin, lipoprotein gibi).Başka bir yöntemde hızlı uçuculuktan ya da buharlaşmadan faydalanmaktır. Bu türde fizikokimyasal bileşiklerde temel problem sabit ve düzgün konsantrasyon seviyesinin uzun süre korunamamasıdır.

Kimyasalın doğal yapısı kullanılırken dikkate alınmalıdır. Kültür ortamındaki pH veya ozmoz kaymaları hücrelerde toksik etki gösterebilir veya kültür ortamındaki besinleri bozabilir. Bunlara ek olarak besin akışları üzerine test kimyasalları eklemek, kimyasal bir ortam bileşenleri arasında doğrudan reaksiyona sebep olabilir. Bunlar protein denaturasyonu gibi. Ayrıca esansiyel besinleri ya da toksik madde etkilenmesi kültür hücrelerinin sinyallerinde düzenleme yapılabilir. Herhangi bir protein bağlayan içerik, test kimyasallarının mikroçevreyi değiştirmesine sebep olabilir ve bu da in vivo hücrenin şekillenmemesine yol açabilir.

Kültür ortamında, test bileşikleri değişmeden kalır ya da görece yavaşça değişir. Örneğin bir maddenin toksik etkisinin gözlemlenmesi için hücre içinde bazı maddelerin olmaması gerekebilir. Birçok bileşik metabolik aktivasyon gerektirir ve diğerleri metabolizma tarafından zehirsizleştirilir. Örneğin; metil n- bütül keton metabolizma sonucu 2,5 heksadion ve 2,5 heksadiol'e dönüşür (McLean, Holme, Janneh, Southgate, Howard, Reed, 1998).In vivo metabolizmada anlaşılması gereken en önemli şey dağılma ve doku kültür sistemlerinin verilerine dayanarak metabolizmanın potansiyel etkisini belirlemektir. Eğer bir kimyasalın potansiyel nörotoksik etkisi biyodönüşüm (lipit su ayrımı, dağılım) gibi metabolik parametrelere bağlıysa; toksik etkinin kültür sisteminde gözükmesi hayvan çalışmalarında anlamsız olacaktır.

Metabolik Aktivasyon, in vitro çalışmalarda önemlidir. İlacın metabolik olarak aktif olması (ön-ilaç niteliği taşımaması) hücre kültüründe toksik sonuçların elde edilmesi için gereklidir. Genellikle test materyallarının biyokimyasal aktivasyonu ve detoksifikasyonu enzim preparasyonu, mikrosomal katkı maddesi(örneğin, embriyo ekstratı ya da S9 karaciğer fraksiyonu), ya da metabolizmayı aktifleştiren hücreler



tarafından benzerlik sağlanır; Ancak biyotransformasyon prosesleri tamamlanamayabilir ya da organizmaya değişik yollar tarafından sağlam olarak aktarılabilir. Metabolik aktivasyon sisteminin içeriği, karaciğerde mikrozomal bölüm olup olmadığı, embriyonik mikrozomlar, ya da izole olmuş hücreler, deneysel tekrarlılığı sağlamak için sürekli kaynak gereklidir. Metabolik model metabolik içerik hücrelerinin izole edildiği metabolik sistem tipi geliştirilmiştir. Ancak, enzim çeşitliliği için polimorfizm görülmesi asla dikkate alınmaz, bazıları için nörotoksosite (örneğin, sitokrom P450'ler veya monoamin oksidaz [MAO-B]) uygun olabilir (Walum, Peterson, 1984). Örneğin, sinir sisteminde, glial hücreler glutamati glutamine çevirmek (Yamamoto, Schmidt-Kastner, Hamasaki, Yamamoto, Parel, 2005), aynı zamanda nöral çevreden ağır metallerin ayrılması (Stevens, Fortin, Pappas, 2002) için N-metil-4-fenilpiridinyun iyonu (MPP+)’den türevlenen 1-metil-4-4fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) nörotoksik metabolitlerin üretilmesinin gerekli olduğuna dair kanıt vardır. Bundan dolayı, ikincil nöronlara olan kimyasal etkilerin çalışıldığı in vitro modellerde genellikle tüm organizma bazında yetersiz metabolik sistemler çalışılmıştır. Hücre kültürlerinin hücreye toksik etkisinin araştırılmasına olanak sağlamasına rağmen, geçerli toksik etki sağlayan miktar tayininde zorluklar vardır.

Maruziyet Süresi; in vitro çalışmalarda önemli olmaktadır. Kimyasalların toksik etkileri tüm organizma bazında çok çeşitlidir ve maruz kalınan doza ve süreye bağlıdır. Toksik etki maruziyetten sonra çok kısa sürede görülebilir. Ancak bazı durumlarda nörotoksik etkinin görülmesi için zamana ihtiyaç vardır. Bu tür oluşumlar, kullanılan kimyasallar ya da kullanılan dozlardan ziyade toksik cevabın altında yatan biyokimyasal proresten kaynaklanmış olması muhtemeldir. Bazı kimyasallar zorunlu enzimler ya da membranlar gibi hücre içerikleriyle etkileşir. Sonuç olarak, bu yapılar maruziyetten çok kısa bir süre sonra etkisini gösterir. Bunlar etkilerini düşük konsantrasyonlarda ve kısa maruz kalma süresinde yoğun bir şekilde gösterebilir. Etkinin görülmesindeki gecikme kaskat mekanizmasındaki geri dönüşümsüz etkilere bağlı olabilir. Bunun sonucunda toksik etki hücrede yapı zararı şeklinde görülür. Kaskattaki her adım, sonraki adımı etkilemesi için zamana ihtiyaç duyar ve bu da toksik cevapta gecikmeye sebebiyet verir. İleri etkiler benzer kaskat

mekanizmaları tarafından etkilenir. Bazende, ilk değişimler çok geç sürede ve ileri derecede etkili olacak şekilde gözlemlenmiştir. Bazen toksik etki için, kimyasalın sistemde birikmesi gerekmektedir ve bu da uzun bir zaman alır. Bizmut örneğinde, aşırı konsantrasyonlarda bile hem in vivo hem in vitro çalışmalarda etkisi yoktur, ancak uzun süreli maruz kalma durumlarında durum tam tersidir. İn vitro sistemin türüne bağlı olarak, nöron hücreleri en fazla birkaç ay yaşayabilir. Fakat tüm nöral hücre türleri bu periyotta olgunlaştırılabilir (Horvat, 1991). Sonuç olarak maruz kalma süresi farklı kültür sistemlerinde farklı sonuçlar verebilir. Kültür sistemleri büyük oranda akut cevaplar üretebilme kabiliyetine sahiptir. Fakat doğadaki örneklere kıyasla farklı sonuçlar ve cevaplar üretebilir.

İn vitro teknik kullanımı kesin ve yüksek spesifikte herhangi bir biyokimyasal bileşimin, organizmanın diğer bileşimlerinden ve bölgelerden ayrı olarak ölçülmesine olanak tanır. İn vitro sistemler mekanik sorunları aşmaya yönelik kesin kontrol imkânı sunar, fakat yapay bir sistemdir ve etkiler ve sonuçlar in vitro ortamda kontrol edilmeli ya da in vivo ortama sonuçlar uyarlanmalıdır (Arıncı, Elhan, 1995). Homostatik etkinin yoksunluğu; nöroendokrin sistemin kontrolünün olmaması, kan dolaşımı ve buna bağlı desteğin olmaması, bitişik hücre etkileşimi olmaması ve hücreler arası bileşiklerin yarattığı mikro çevrenin olmaması gibi durumlar, in vitro çalışmaların sınırlandırır.

Hayvanı tüm vücut olarak incelersek, kimyasal dağılım birçok değişken tarafından kontrol edilmektedir. Düzgün çalışan kan beyin bariyeri; kimyasalın beyne girişini belirleyici en önemli mekanizmadır. Kültür ortamında bu bariyer yoktur. Bu Bariyerin yokluğu kimyasalın hücre ile doğrudan bağlantı kurmasını sağlayabilir ve böylece kimyasalın gerçek etkisinin izlenmesini sağlar. Her ne kadar, in vitro koşullar kimyasalların sinir hücreleri ile doğrudan ilişki kurmasını sağlasa da kan beyin bariyeri veya lipid-su ayrımının sağlandığı filtrelemenin olmaması (Garcia-Valenzuela, Sharma, 2005) kültür ortamındaki maruziyetin sonuçlarının doğal halde mümkün olmamasını ve etkinin yapay kalmasına sebep olur. Bundan dolayı, her ne kadar hücre kültürü hücreye girişi olan madde miktarını tayin etse de, toksikolojik miktar tayinini zorlaştırır. Unutulmaması gereken kan beyin bariyeri

doğum öncesi dönemde belirli bölgelerde tamamen gelişimini tamamlamıştır. Buna ek olarak kan-beyin ve kan-sinir bariyeri kimyasal geçirgenliği, değişkenleri modellerken sıkıntı oluşturabilir. Bu bileşiklerin geçirgenliğine sinir sisteminden bağımsız olarak izin verilir.

Çoklu tür kıyaslanması ise *in vitro* toksisite yöntemlerinin belirlenmesinde ve standardizasyonunda önemli sonuçlar vermektedir. *In vitro* sistemlerde farklı türlerin benzer hücre türlerini araştırma ve uygulama fırsatı sunar. Tek uygulamada farklı türlerin hücreleri, hücre sırası dizilimi uygulanarak aynı anda ölçülebilir. İnsan hücrelerinin diğer organizma hücreleri ile kıyaslanarak türler arası farklılığa bağlı toksisite farklanmaları bulunabilir. İnsan hücrelerinden birincil hücre kültürleri kolayca hazırlanamaz. İnsan hücre çizgileri belli başlı progenitor hücrelerden hazırlanabilir ve türetilbilse geniş insan hücre kültür yelpazesine sahiptir. Örnek olarak, kendi kendine çoğalan kültür HCN-1Aa serebral kortikal nöronlardan geliştirilmiştir ve unilateral melangoensefali (megalencephaly) hücrelerine uygulanmış ve olgunlaşmış nöronların çoğalmasına bağlı gelişimsel nöropatinin incelenmesine olanak tanır.

*In vitro* çalışmalarda önemli bir sorunda Sinir sistemindeki heterojen yapı olmakta ve alınan verilerin değerlendirilmesinde ve yorumlanmasında dikkat edilmesi gereken zorlu çıkarımlara neden olmaktadır. *In vivo* da, sinir sisteminin farklanması nöronlar ve nöron olmayan hücrelerle etkileşimine bağlıdır. Nörotoksik cevapta, bazen doğrudan hücreye birebir etkileşmek yerine, hücre-hücre etkileşimini değiştirmek gibi dolaylı etkileşimlerle de bu cevap gösterebilir. Birincil hücre kültürünün en büyük avantajı tek bir hücre tipi ile zenginleştirilmiş kültür oluşturulmasıdır. Bu tür izole durumlar, nöral hücreler için çok yabancı durumlardır. Zenginleştirilmiş hücrelerde beyin, spinal korteks ve ganglion üzerine odaklanmış birçok çalışma mevcuttur.

Bu çalışmalarda bazı glial hücrelerin ve hücre tiplerinin kültür içinde etkileşiminin olmadığı çok nadir nöron kültürü yapılmıştır (Ahmed, Ingoglia, Sharma, 2001; Garcia-Valenzuela, Sharma, 1999). Aslında astroglial hücreler olmadan nöronlar çok

zor hayatta kalır (Maeda, Sawada, Matsubara, Nakai, Hara, 2004).Doğum öncesi serebellar astroglial hücreler nöron olmadan kültüre edildiğinde düzgün yapıda farklanmamış morfolojide olur ve çok çabuk çoğalır. Bu tür kültürlere nöron eklendiğinde, hızlı bir şekilde glial hücre büyümesi durur ve gliallerin morfolojisi farklanması in vivo da görülen serebellar astroglial hücrelerine benzeyen bir profil oluşturur (Maeda, Sawada, Matsubara, Nakai, Hara, 2004).Benzer etkiler beyinin başka bölgelerinden izole edilen hücrelerde de görülür. Glial bölünmesindeki nöron inhibisyonu; nöron/glial oranı 4/1 in üstünde ise görülür. Eğer sistem oranın altına düşerse birçok glial hücre nöronlardan ayrılır ve çoğalmaya başlar. Bu olayın membran-membran etkileşiminden kaynaklandığını akıla getirir. Kültür ortamında glial hücre çoğalmasının nöronlar tarafından inhibisyonu serumlu kültür ortamında gösterilmiştir (Morrison, Moore, Deppmeier, Gold, Meshul, Johnson, 1997).

Benzer etki astrositoma hücre dizi kültürlerinde de görülmüştür (Yu, Tanabe, Dezawa, Ishikawa, Yoshimura, 2006).Astrositoma en etkili yıkım özelliğine sahip CNS tümörlerini bölen, ayrıca yavaş büyüyen astrositomalardan hızlı büyüyen glioma çeşitlerinde kadar etki gösterir. Bu etkiye sıçan C6 tümörü, fare G26-24 tümörü, insan V251, HTP-16, ve A-172 hücre sıra kültürleri arasında göstermiştir. Nöronlar bu astrositoma hücreleri arasına yerleştirildiklerinde hızlı bir şekilde astrositomalara tutunur ve glial hücre büyümesini durdurur. C6 glioma hücreleri ve retinal endotel hücrelerinin etkileşmesi ile oluşan glia-uyarılmış endotel farklanmaları, hücre tipleri arası dinamik etkileşime örnek olduğu rapor edilmiştir (Qiu, Tang, Zhang, Wen, 2002).

McCarthy ve de Vellis, doku kültürünü iki haftada (Mizuguchi, Hui, Palm, Sugiyama, Mitaka, Demetriou, Rozga, 2001) iki günlük yeni doğmuş sıçan yavrularından glial karışım hazırlandı. 24 gün in vitro da olgunlaştırıldı. Bu 14 gün ve 21 günlük periyodu takiben astrositlerdeki ilerleyen tüm nörobiyolojik çalışmalarda tekrar yerleştirme uygulandı ve hücrelerin kritik olgunlaşma sürecinde olabileceği ve benzer hücreler oligodentrogliya, astrosit ve mikroglialara farklılaştılar. Böylece, duyarlılıktaki farklılıklar her kültürdeki hücresel popülasyondan dolayı olabilir ve bütün hücre tipleri arasındaki etkileşimlerden, beyinin hangi bölgesinden

alındığı, hangi büyüme evresinde toksikanta maruz kaldığı, hangi hücre tabakasından temellendiği ve serumun varlığından dolayı olabilir.

Gelişim sırasında, nöronlar ve glial hücreler farklı etkiler tarafından etkilenebilirler. Astrositlerin anatomik organizasyonu ve onların başlayabilirliği ve sinaptik transmisyonunda astrositler için çok fonksiyonlu transmitterlerin oluşturduğu sinaptik metabolitler olabilir (Miida, Hirayama, Nakamura, 2004; Scalia, Stalker, 2002; Backes, Howard, ).Glial hücreler neurotransmitter konsantrasyonu düzenler, böylece nöronların potansiyel etkileycilerini oluştururlar (Jeppesen, Gaist, Smith, Sindrup, 1999; Focking, Besselmann, 2004; Gaist, Garcia Rodriguez, Huerta, Hallas, Sindrup, 2001).

Farmakoloji ve toksikoloji örnekleri ile yapılan çalışmalarda hedef belirleme ve hedefe yönelik tedavi oluşturma düşüncesi ve ilgili süreçler her geçen gün giderek artan bir şekilde sağlık sektörüne ve farmakoloji dünyasına girmektedir. Farmasötik ajanlar geliştirilmesine yönelik in vitro sistemler çalışılmıştır. Genelde farmasötik ajanlar bir reseptör bağlanmasındaki özelleşmiş mekanizmalar için tasarlanmıştır. Hedef bağlanma bölgesine bağlı olarak ilaç gücü ve etkisi test amaçlı özel geliştirilmiş in vitro sistem oluşturabilir. Buna ek olarak, ilaç tasarlanma, test boyunca gözlenen bağlanma hareketleri, ilaç güç ve etkisini değiştiren hareketin bağlantı noktasını karıştırması ile ilgili bilgiler elde edilir. Bu ortam ilacın özelleşmiş mekanizmalarının çalışması için tasarlanmış çok özel bir ortam olup özel mekanizmaları değerlendirmeye yönelik in vitro tekniktir. İn vitro teknik kullanılmasıdaki temel amaç, bir ilaç molekülü geliştirmek, ilacın hareketini yalınlaştırıp kavramak ve ilaçtaki geliştirme masraflarını en az düzeyde tutmak için mekanizmanın gerçekleştirildiği eş değer çevre oluşturmak, hedef hücreleri belirlemek, bilinen hücrelerin fonksiyonlarını ortaya çıkarmaktır. Buna rağmen in vitro testler bilinmeyen ya da hayvan veya insan deneylerindeki beklenmeyen sonuçlardan mükellef tutulamaz. Nörotoksikler için iyi açıklanmış mekanizmalardan biri glutamatın nörotransmitter uyarısıdır. Glutamat medyatör görevlerinden birini postsinaptik N-metil-d-aspartat (NMDA) tipi glutamat reseptörü üzerinde gösterir.

Bu reseptörü bulunan hücreler eksitotoksik uyarılara duyarlıdır. Reseptör uyarımına giden yol sodyum ve kalsiyum akımının uzun süre devam etmesine dayanır. Bu akım hücre ölümüne yol açan bir olaylar kaskadına yol açar (McLean, Holme, Janneh, Southgate, Howard, Reed, 1998).Domoik asit gibi çeşitli glutamat muadilleri de uyarı toksitesi ve bağlı lezyonlara yol açar. Domoik asidin deniz kabuklularında birikimi insanlarda hipokampal venörokortikal nöronların kaybı ile hafıza kaybına yol açar ki bu olay glutamat alıcılarının aktif hale getirilmesinden kaynaklanır. Uyarı toksitesi mekanizmaların anlamak ve tanımlamak için çeşitli in vitro sistemlere başvurulur. Hipokampal kesim preparatları hazırlanması veya organotipik kültürler elektrofizyolojik, biyokimyasal, ve farmokolojik NMDA reseptör aktiviteleri incelenmek amacıyla kullanılır. Birincil dağılmış hipokampal ve nörokortikal kültürler uyarı toksitesi karakterizasyonu amacıyla kullanılmıştır.

### **1.5.3.Nöron dizin hücreleri, kültür ortamı ve nörotoksik etki**

Nöroblastoma hücre dizilerinde yapılan çalışmalar en çok kabul gören çalışmalar yöntemi olmaktadır. Hücre dizilerindeki birçok nörotransmitter enzim fare ve insan nöroblastomalarından oluşturulmuştur. Bu özellikleri onları gen ekspresyonunun düzenlenmesi ve cDNA kütüphanelerinin kurulması için yapılan çalışmalarda kullanılabilir yapar. 40 yıl önce ilk nöroblastoma hatı elde edilmiştir. Nöroblastoma hücrelerinin kullanımında morfolojik farklılaşma ve sitotoksiteyi ayırtetmek için zamanlama önemli ve zordur. (Benzon, Kim, Benzon, Silverstein, Jericho, Prillaman, Buenaventura, 1997) Pestisit araştırmalarında, nöroblastomalar hedef diziler olan AChE'nin ve NTE varlığı için kullanılır (Berthold, Fabricius, Rydmark, Andersen, 1993). Fare nöroblastoması, NTE inhibisyonu düzeyleri ve çeşitli organik fosforlu maruziyetten sonra, sıralı girişin ile organofosfat bağlı gecikmiş nöropati (OPIDN) ile ilişkili ilaçları incelemek için kullanılmıştır (Bischoff, 1973; Blunt, Vrbova, 1975; Bridenbaugh, 1969).

İnsan nöroblastoma hücre dizileri, fare ve sıçan nöroblastoma dizilerine benzer, insan dokusundan üretilen ve türe özgü olan ajanlar nörotoksik etki gösterebilirler.

Böyle bir hücre dizisi, birkaç ilaçla uyarılmasının ardından nörotransmitter sentezi ve depolama, reseptörler ve iyon kanallarının incelenmesi gibi deneyler için kullanışlıdır. Genel sitotoksosite, nörotoksiğe özel olarak belirlenir. Farmakolojik deneylerde kullanılan IMR32 hücreleri nikotinik ve muskarinik kolinerjik reseptörlerin ekspresyonunun ve bilinen farmakolojik dinamiklerin bu reseptör bölgelerde mevcut olduğu görülmüştür. Bu hücreler, kolinerjik in vivo sistemde çeşitli metallerin toksitesini incelemek için de kullanılır. SY5Y insan nöroblastoması ve beyinle karşılaştırılabilir nörotoksik esteraz aktivitesi bulunmaktadır.

Feokromasitoma hücreleri, PC-12 klonal hücre dizisi bir sıçan feokromositoma (adrenal medular tümör) yerleştirilmiştir ve genellikle birincil sempatik nöron ve kromafin hücre kültürleri birçok özelliğe sahiptir (Urcola, Hernández, Vecino, 2006; Bruguerolle, Attolini, Lorec, Gantenbein, 1995). Bu hücreler NGF varlığında sempatik nöronların, uzamış nöritlerin, tiroksin içeren hidroksilaz aktivitesinin ve uzaklaştırma faktörlerinin (Fujita ve arkadaşları; Buchi, Kestermann, Perlia, 1974) farklılaşmasını indükleyebilir. PC-12 hücre dizisi NGF cevabında ve sinir hücresi farklılaşmasında mekanizma denetlenmesi yaygın olarak kullanılmıştır. PC-12 hücrelerinin AChE, asetilkolin ve kolin asetiltransferazın sentezine bağlı olduğu durumlar dopamin, noepinefrin ve asetilkolinle birlikte salgılanır. Bunlar sodyum, potasyum ve kalsiyum kanallarını kapsar ve G- proteiniyle çiftleşmiş reseptör içeren diğer çeşitli membran reseptörlerini içerir. Bu sebeplerden dolayı nörotransmitter biyosentezi ve sekresyon biyolojisinin temelleri aşırı derecede araştırılmaktadır. Çalışma prosesinde birleşmiş nöral farklılaşmasında, saklanması ve salgılanmasında, nörotransmitterlerin salgılanması, iyon kanallarının fonksiyon ve iyon kanallarındaki regülasyonu ve membran bağ reseptörleindeki içeriklerle etkileşim için kullanışlı bir model sağlarlar. Toksikolojide, PC-12 hücreleri kimyasal uyarım kalsiyum kanallrındaki nörotransmitter salgılama ve reseptör geliştirilmesinde biyokimyasal ve fizyolojik metodların araştırılmasında kullanılmışlardır (Butterworth, Moran, Whitesides, Strichartz, 1987; Cavino, 1971; Chanh, Tuyen, Phuong, Pinhas, Buu-Hoi, 1971; Choi, Birknes, Popitz-Bergez, Kissin, Strichartz, 1997).

NSC-34 hücreleri voltaj kapılı iyon kanallarına, sitoskelet organizasyonlarına ve axondaki transfer mekanizmasında çalışan içeriklere cevap üretir. Bu hücrelerin test sistemlerinde nörotoksisite amaçlı aratılan kimyasalların araştırılmasında kullanılırken, nörotoksisitenin aksiyon potansiyeli üretimine, akson potansiyeline nörofilament oluşumuna ve nöral iletimde spesifik nöron fonksiyonlarıyla olan ilişkisi değişime uğratarak aratılabilir (Cravioto, 1965).NSC-34 hücrelerindeki sitoskelet proteinleri, ara filamentlerin düzenlenmesinde 2,5-hegzandi-on a karşı duyarlıdır.

Nörotoksikolojide sonlandırma noktaları da önemlidir. Nörotoksikoloji ve genel toksikoloji arasındaki ayrımın sıklıkla kullanılması özel sonlandırma noktalarının sinir sistemindeki fonksiyonunu ve bu sonlandırma noktaları arasındaki maruziyet ilişkisini karşılaştırır ve diğer spesifik olmayan sonlandırma noktaları her yerde birden bulunabilir. Diğer yaklaşım nöronal ve nonnöronal hücreler arasındaki toksik özelliklerin karşılaştırılmasıdır. Nörotoksisiteyi denetlemek için bir çok sonlandırma noktası vardır ve bu nörotoksikant etkileri sinir sisteminin özelleşmiş fonksiyonlarını birincil üstlenen özellikleri denetlemek içindir. İzleyen bölümlerde bazal hücre fonksiyonlarındaki çeşitli enzimlerin ölçümü ve sinir sisteminin özgün sonlandırma noktaları ve hedef bölgelerdeki kimyasal karışıklık yeniden incelenecektir.

Toksik hasar bazen hücre yaşamını etkiler ve hücreler ölür. Hücre yaşamının belirlenmesi, mitokondrial canlılık belirlenmesi, çeşitli boyalar aracılığı ya da laktat dehidrogenaz salınımının ölçümü ile yapılabilir. vital boya miktarının belirlenmesi hücrelerin hasarlı membranlarının tripan mavsine veya hücre içindeki nötral kırmızıya dayanabilmesine bağlıdır. Bunun yanı sıra vital boya miktarı hücre aslında hücre hücre membran geçirgenliğinin letalitesinde bir gösterge olarak kullanılır.

Nötral kırmızı ve 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-dipentiltetrazolyum'un (MIT) indirgenmesinin belirlenmesi hücre fonksiyonunda yarı spesifik olarak durumunun belirlenmesinde geniş ölçüde kullanılmıştır (Curtis, Scurlock, 1981). Bu belirtiler ölçümlerin vital boya dışındaki daha hassas sitotoksik potansiyellerini açıklayabilir.



Herhangi bir mikroskobik bakı hücreler ve astrositler ve fibroblastlar gibi düz morfolojide olan kuşku uyandıran hücreleri gösterebilir. Floresans boyalardan etidyum homodimer ve iyotanmış propidyumun her ikisi de canlı hücre dışına çıkabilir, floresans aktive hücreyi otomatik olarak saymamızı sağlayabilir. Bir diğer metodu önce toplam kültür floresansını ölçerek ve daha sonra hücre membranı yok edilerek uygulanabilir. Boyanın aşırılığının giderilmesi için gerektiği gibi yıkanmasıyla, bağlılığını ya da parçalanmışlığını kaybeden hücreler rahatlıkla ayrılabilir.

Sitotoksik bir enzim olan LDH toksik maruziyetin birkaç gün ya da hafta içerisinde gösterilmesi için önerilmiştir. LDH stabil bir enzim olmadığı ve yarılanma ömrünün diğer ürünler tarafından serbest bırakılabileceği not edilmiştir. Tüm bu nedenlerden ötürü, ortamdaki hücrelerden elde edilen herhangi bir ölçüm bulunan toplam miktardaki salgı için incelenmelidir. Bu nedenle, tüm çalışmalar ortamdaki ve hücredeki işaretçiler ve salgılanan/toplam işaretçi oranı verileri belirlenebilir. Bu maddeler ortamdaki proteinleri indirgeyebilir ve sızdırıcı membranlar protein ölçümünü etkiler. Ortamda mevcut salgının toplam salgılanana bölünmesi ile toksiste ölçülür. Membran geçirgenliğini yansıtan tüm bu ölçümler hücrenin direk ölmesine sebep olmaz.

Nörotoksikolojide hedef bölgeler olarak bilinen Kimyasalların nörotoksik potansilelerini araştırmaya yönelik in vitro sistemlerin geliştirilmesine yönelik çalışmalara örnek olarak in vivo hedef bölge ya da süreçler belirlemek, biyolojik detayın in vivo proseslerini anlamak ve çeşitli kimyasalların özel hedeflerinin karşılığını belirlemek olarak verilebilir. İzole halde bir model sistem geliştirilememiştir. Çeşitli biyolojik prosesler, hedef bölge ve konumlar, in vivo ve in vitroda beraber kullanılarak oluşturulan sistemlerde nörotoksikant ölçümü yapılabilir.

Yapısal olarak in vitroda morfolojik sonlandırma noktaları hücre gövdesini aksonları ve dendritleri etkiler, kimyasal uyarılmış değişiklik hedef hücre

populasyonunda farklı morfolojik etkiye sahip kimyasallarla zarar verilmesi gibi ölümcül olabilir (De Waegh, Brady, 1991).Morfolojik lezyonlar, sınırlı miktarda etkiyi sonlandırma noktası toksisitesinde gösterir. Nöronlar genelde kültür ortamında anormal yapıdaki neurites oluşturan maddelere maruz kalırlar. Ortak oluşum boncuklaşmadır, genellikle genişlemiş ve bütün organellerle kaplanmış aralıklı nörit oluşturmuş yapılarıdır. Boncuklaşma genelde kolşisin (Dixon, 1962), akrilamid (Duchen, Scaravilli, 1977), veya etoksite maruz kalma durumunda oluşur (Dybre, Lang, Wallin, Renck, 1997).Morfolojik farklanmalar astrosit kültürlerinde söz konusu kimyasal ajanlara cevap olarak oluşabilir. Örneğin, trimetil kalay, astrositlerde morfoloji değişimine sebep olur ve proses merkez odaklı ortam hücre gövde büyüklüğünün artması ile içe çökme şeklindedir (Chen, 2004).Tüm nöron hücreleri fenotip ve de morfolojik değişimleri bu tür substratlarla etkileşim sonucu gösterebilir.

Nörit büyümesinin akıbetini etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Nörit büyümesi in vivo koşullarda nöron hücrelerinin ana özelliklerindedir ve akson iletimi gibi çok önemli hücresel proseslerde görev alır. Her ne kadar, zaman alıcı olsa da nörit büyümesi görece kolay bir görevdir. Ek olarak nörit büyümesi, nörit spesifik yapı elementleri ile belirlenebilir. Örneğin; mikrotübül ilişkili proteinler, nörofilament proteinleri. Biyolojik etkenlerin durdurma yetenekleri, farmosotik ajanların veya çevresel ve endüstriyel içeriklerin neurit büyümesine müdahalesi genelde yeni maddelerin aktivitesi görüntülenirken kullanılır.

Nörit düzenleyici faktörler, nörotropik faktörler ve glial büyüme faktörleri genelde gelişim sürecindeki ekzojen yapılarına etkilerin belirlenmesi amacı ile kullanılır. Bileşiğin biyolojik uyarılmış nörit büyümesini önleyici etkisinin gözlenmesine yönelik çalışmalar sinir büyüme faktörü muamele edilmiş hücre çalışılmasıdır (Erengül, 1985; Eylar, Ishaque A, Szymanska, 1980).Yine de bu yaklaşım sınırlıdır. Çünkü uyarılmış büyümenin inhibisyonu, normal koşullardaki enzimleri ya da yapısal elementlerin yok olmasına ya da aktivite değişmesine nöritik

proseslerin incelenmesine nazaran daha çok etki edebilir. Her ne kadar bu yaklaşım bilimsel incelemeye yönelik yaklaşım içerse de, neurit gelişiminde doğrudan etkileri sonuç olarak göstermeyebilir.

Nörotoksikolojide fonksiyonel sonlandırma noktalarından biri olarak Aksonal taşınım önemlidir. Aksonal taşınım tüm ökaryotik hücrelerde kendi bölgesinden sentezlenen ve kendi gölgesinde kullanılan ve kendi bölgesinden sentezlenip başka bölgelerde kullanılan transfer materyallarına benzer mekanizmaları kapsar. Bu prosesin ardından organizmalardaki biyolojik fonksiyonu için geniş alanlara yayılım gereklidir (Glawert, 1980). Aksonal taşınım yönteminin ardından toksikantın doğrudan ya da doğrudan olmayan yöntemlerle yuarılması uyarılması önemli bir problemdir. Bir toksikant tranfer yolu üzerindeki mekanizmalarda bir etki oluşturabilir. Mekanizmadaki özel bir adım ile aksonal taşınım arasında bir etkileşim olabilir. Ek olarak, enerji metabolizmasındaki daha genel biyokimyasal bozulmadan dolayı bir etki olabilir. Genel yaklaşım aksonal transferde toksikantın indüklediği değişimin hayvanlar üzeriinde incelenmesi gerektiğidir. Bir akrilamid denemesi, aksonal taşınımın görünüşünü etkileyen bir nörotoksikant, nöroblastoma farklılaşmasında bir toksiklik göstermiştir, fakat organel hareketi bozulmadan kalır. İn vivo sonuçları ile karşılaştırılması hızla taşınan aktif markırların değişebileceği olasılığını yükseltir ve aksonların altkütmesi veya organellerin akrilamid tarafından bozulmasının gözlemlenmesine yardım eder (Hess, 1956). Eğer organeller normal şekilde hareket ediyorsa bu tipteki eksikliklerin vidyo mikroskop tekniğiyle açıklanması kolay olamaz. Bundan dolayı, in vitro sistemlerde tüm popülasyonlardaki akson ve nöritleri etkileyecek karışıklık ortaya çıkması sınırlanabilir.

Bu sensör veya motor hücrelerine farklılaşan hücrelerin hassas farklılaşmasının in vitro gözlemleriyle uyuşmayabilir. Bu hücreler akrilamite toksistelerinin belirtilmesi için denetlendiğinde, hücre morfolojisindeki değişmeme durumu 25 µg/ml akrilamid maruziyetinden 2 hafta sonra görülmüştür. Maruziyet saptandığında, büyüme prosesinin gerçekleştiği sınırdaki büyüme konisinde bozulmalar ve neurit kabartıları not edilmiştir (Horvat, 1991). Walum ve arkadaşları (Duchen, Scaravilli, 1977) NIE115 hücrelerinin nörit kabarcıklarını üreten akrilamid maruziyeti

göstermiştir. Bu in vivo şartlardaki akrilamid Maruziyeti çevresel akrilamid maruziyetine bağlı ölüme benzerdir. Hücreleri hassaslık düzeyleri sekiz hücre dizisi (nöroblastoma 41A3, nöroblastoma N18, nöroblastoma N1E115, nöroblastoma glioma hibridi NG108CC15, glioma 13BMG, glioma C6, fibroblast RLF ve fibroblast RMC) kıyaslanarak kesinleştirilmiştir.

Elektromorfolojik endekslerde kültür ortamında önemli olmaktadır. Reseptör veya iyon kanalı ifade edilmesi in vitroda elektrofizyolojik kayıtlarla çalışılabilir. Ancak spesifik alt türler en iyi şekilde tek kanal kayıtları ile karakterize edilebilir. Böyle detaylı kayıtlar membranın yıkıntılardan uzak tutulmasını gerekli kılar ancak bu teknik açıdan organotipik ya da eksplant kültürlerde bunu başarmak çok zordur. Ek olarak, sinaptik fonksiyon ve nöron ağındaki rastgele aktivite sadece aktivite göstermek için yeterli karmaşıklığa sahip sistemde kolayca görüntülenebilir. Yapının karmaşık fonksiyonlarının net sonuçları görece daha basit olan elektrofizyolojik çiftleştirilmiş titreşim inhibisyonu ve uzun dönem potansiyel gibi tekniklerle değerlendirilebilir. Beyin kan bariyeri (BBB); hem koruma hem de beyni besleme görevine sahiptir.

Beyin kan bariyeri in vitro ortamların değerlendirilmesinde önemlidir. Beyin kan bariyeri(BBB) beyni hem koruma hem de besleme görevine sahiptir (Garcia-Valenzuela, Sharma, 2006; Huang, Thalhammer, Reymond, Strichartz, 1995). Beyin kapiler damarlarındaki endotel hücreleri birbirine tight junction ve manşet kısırtması ile bağlı oldukları için birçok organik ve polar molekülün kan damarından beyin omurilik sıvısına geçişini engeller. Moleküller BBB ye ancak protein ve aminoasit transfer enzimleri veya taşıyıcıları(glutamil transpeptidaz (GGTP), alkalen fosfataz, glukoz transfer enzimi (GLUT-1) örnek olarak verilebilir (Bossy, Bastide, Godlewski, Guérin, Lasjaunias, Lefebure, Prat, Roland, Salama, 1990; Jessen, Mirsky, 1998) ile taşınabilir. Bu endotel hücreleri fiziksel olarak astrositlerle etkileşim halindedir ve fonksiyon gösterirken etkileşirler (Kalichman, Moorhouse, Powell, Myers, 1993; Kalichman, Powell, Myers, 1988; Kalichman, Powell, Myers, 1989).Astrositler tight junction ların düzenlenmesinde görevlidir ve yüksek elektrik dayanıklılığını hücrelere sağlar. Aynı zamanda GGTP gibi çeşitli enzim aktiviteleri,

amino asit taşıyıcısı, GLUT-1 proteininin ifadesinin regülasyonunu sağlarlar. Bu BBB nin hem endotel hasarında hemde astrositlerle endotellerin bağlantılarının kopmasının ardından yok olabileceğini gösterir. Her ne kadar daha önceden toksisite duyarlılığa ve hedef hücrenin gelişmişlik düzeyine, test edilen maddenin miktarına, maruz kalma süresine bağlı olduğu açıkça gösterilsede BBB nörotoksik kimyasal maddeleri geçirmektedir (Kalichman, Powell, Reisner, Myers, 1986).Çok sayıda kimyasalın beyin parankimasına BBB yi aşarak geçtiği in vivo ortamda gösterilmiştir ve in vivo nörobiyolojisinde buna dayanarak modeller geliştirme çabası içindedir (Kayaalp, 1988; Kidd, Heath, 1988; Kidd, Heath, 1991; Kniel, Junker, Perrin, Bestetti, Rossi, 1966; Konradsen, Ravn, Sorensen, 1993; Lambert, Lambert, Strichartz, 1994).

Sinyal iletim mekanizmaları olarak kalsiyum homostasisi normal nöronların hücre içi fonksiyonları hücreler arası kalsiyumun sitosolde bulunan serbest kalsiyuma oranına kritik şekilde bağlıdır (Levy, Wallace, Dobkin, 1975; Li, Bahar, Cole, Rosen, 1985).Hücrelerin canlılığı mekanizma kalsiyum homoestasisi bozulunca etkilenir (Lowe, Stevens, 1997; Ludmer, Sabelli, 1968). Eğer yüksek senkronizasyon ve iletişim çökerse, hücre içi serbest kalsiyum miktarında artış olur, bu da çeşitli hücre içi reaksiyonları artırır. Bu reaksiyonlara örnek olarak nörotransmitter salınımı, proteinlerin fosforilasyonu, proteaz aktivitesinde artış gösterilebilir (Ludmer, Sabelli, 1968; Scaravilli; Scaravilli, 1977; Mason, Attema, DeVries, 1991).Hücreler arası kalsiyum aynı zamanda nöron büyümesinde ve büyüme konisi aktivitesinde görev alır. Bölünme mekanizmalarına etki eden birçok toksik ajan hücre içi kalsiyum miktarının dengesini bozar. Bu kimyasallara örnek olarak metil cıva(I) (Lundborg, 1970; Mason, Attema, DeVries, 1971), kepon, trietil kurşun (Mateu, Luzzati, Vargas, Vonasek, Borgo, 1990; Mateu, Luzzati, Villegas, Borgo, Vargas, 1992; Mateu, Moran, Padron, Borgo, Vonasek, Marquez, Luzzati, 1997), siyanür (McArthur, Stocks, Hauer, Cornblath, Griffin, 1998), piretiroidler(pyrethoids) (Monso, Santaliestra, Barbal, Fito, Riudeubas, 1996; Moore, Spierdijk, vanKleef, Coleman, Love, 1982), PCB ilgili moleküller (Erices, Conget, Minguell, 2000) ve aliminyum (Muir, 1959; Murphy, Dawson, Slack, 1995) verilebilir.

Hücre sıraları elde edilen insan nöroblastomalarını baskılayacak miktarda asetilkolin ve/veya katekolamin üretmiştir (Myers, Kalichman, Reisner, 1986). Her ne kadar çok miktarda fareden elde edilmiş nöroblastoma hücre sıraları asetilkolin veya katekolamin farklanmalarını inceleyebileceğimiz sistemler sunsa da, diğer nörotransmitter sistemler ile ilgili çok az örnek bulunmaktadır. Sıçan klon hücre sıraları fazla çeşitte nörotransmitter sistem sunar. GABA gibi nörotransmitterlere karşı öncelikli inhibisyon göstermekte olup, çok az sayıda hücre çok az miktarda asetilkolin ve katekolamin üretir (Myers, Murakami, Powell, 1986). PC-12 hücre dizinleri asetilkolin ile birlikte norepinefrin üretebilme yeteneğine sahiptir (Myers, Rydevik, Heckman, Powell, 1988).

Hücre kültürleri büyüme faktörlerine ve diğer içeriklere tropik etkilerin etkilerini kolin içerikli nöronların düzenlenmesi ve gözlenmesi açısından mükemmel sistemlerdir. Örnek olarak, sıçan beyinlerindeki septal bölgelerden ayrılmış hücreler kullanılarak NGF, tiroid hormon ve gangliositlerin etkilerinin septal kolin üreten nöronlar üzerine etkisinin incelenmesi verilebilir (Peters, 1990).

Yaygın nörotoksik sonlandırma noktalarında bile, prosese özel kimyasallar arasındaki çeşitlilik çoktur. Bilinen nörotoksikant hareketleriyle ilgili bilgiler hedef bölgesi tiplerinin belirlenmesine yardımcı olabilir. Nörotoksikolojide, hedef bölgelerin kimyasallarla bilinmeyen nörotoksikolojik etkiler geliştirmesi araştırma sürecinde zorluğun ortaya çıkmasına sebep olabilir. Herhangi bir kültür sistemi seçici bir nörotoksositeye karşı sitotoksik üreten kimyasallar arasındaki farkı anlama girişimleri ile ilgili kültür sistemi içinde incelenir. Hücre biyolojisi ve sinir bilimdeki geçerli bilgiler, hücre prosesindeki ek elementler hücre fonksiyon bozukluğu genel mekanizmalarla ilgili bilgilendirici olabilir. Bu zamana kadar, nörotoksikantların kullanımıyla sinir sisteminin çeşitli hücrelerinin etkilenmesi sürekli nörobiyolojik fonksiyonların belirlenmesi, in vitro analizler ve çeşitli kimyasalların aktif bölge üzerindeki etkilerini tanımlaması için büyük çaba göstermişlerdir.

İn vitro metodlar in vivo testlerin yerini tamamen alamaz çünkü in vitro testler in vivo sınır sistem karmaşıklığına ve nörobiyolojik fonksiyonların tamamının sağlanmasından ve erişilmesinden çok uzaktadır. İn vitro sistemler nörotoksisite tanımının bölgesel aksiyonlarını canlandırabilme aşamasında yetersiz ya da bilgi verememektedir. İn vitro çalışmaların sonuçları ilişkili sinir sistemi içeriğine bağlı olarak yorumlanmalıdır. Kimyasal uyarılmış in vitro değişimlerin daha güvenilir olması için in vivo'daki nörotoksik etkilerle ilişkili olmalıdır. İn vitro nörotoksisitesinin geçerliliğini sağlayan prosedür kullanımı önemlidir. Bu makalede test metodları hem ölçmeye dizayn edildiği maddelerin ölçümüne hem de ölçüm karakteristiğinin genel tanımlanmış standartlara uygun olması anlatılmıştır. İn vitro prosedürlerin sonuçları içeriğin toksik maruziyete alakalı mantıklı yorumlanması ve nörotoksik risklerin insan vücudundaki etkilerinin değerlendirilmesinde önem arzemesi gerektirir (Erices, Conget, Minguell, 2000).

İn vitro sistemlerin nörotoksisiteyi test etmesi nörotoksisitenin spesifik mekanizmasına bağlı olarak dizayn edilmesine bağlıdır. Açık uçlu genel toksisitenin nörotoksik görüntülenmesi şu aşamada garanti edilememektedir. İn vitro teknikler mekaniksel bazlı hipotezlerin deneysel incelenmesinde büyük potansiyele sahiptir. İn vitro yaklaşımlar biyolojik proseslerin kimyasal uyarılmış reseptör değişimi, nörit büyümesi, elektrofizyolojik değişimler, nörokimyasal sonlandırma noktaları belirlemede, iyon kanallarında, spesifik nörotransmitter-enzim-hormon değişimlerini anlamaya yönelik temel yaklaşımlar içermektedir. İn vitro prosedürler yapı-aktivite ilişkisinde belirgin fayda sağlarlar. İn vitronun aksonal transfer, büyüme ve gelişme ve biyoaktivasyon gibi konuların çalışılmasında potansiyeli vardır. Her durumda in vitro sistemin kulture edilmesi ve içeriğinin seçilmesi geliştirilen ve valide edilen yöntemin hipoteze uygunluğuyla değiştirilmelidir.

## **1.6 Nöroprotektif Etki ve Amaç**

İlaç etkilerini gösterdikleri sinirler üzerinde hasar oluşturdukları bilinmekle beraber bu toksik etkinin mekanizması tam olarak ortaya konmamıştır. İn vivo şartlarda üç boyutlu ortamda oluşan toksisitenin karmaşıklığını çözmek için kültür

ortamında sinir hücrelerinde oluşturulacak toksisitenin mekanizmalarını araştırmak daha anlamlı olmaktadır.

Sinir sisteminde nöronlar ve nöroglial hücreler vardır. Nöronların farkı akson ve dentritlere sahip olması ve bunlar aracılığı ile diğer nöronlar ve nöroglial hücreler ile haberleşmeyi sağlamasıdır. Dentritler nöron yüzeyini artırarak diğer hücrelerden uyarı almayı kolaylaştırır. Nöronal hücre membranının yapısal komponentlerinin korunması için gerekli faktörleri üreterek, hücre fonksiyonunu korur. Bunlardan bir tanesi olan myelin, aksonun etrafını sarar. Böylelikle hücre algılama iletişim birleştirme ve saklama işlemlerini yürütür. Hücre toksik bir etkiye maruz kalırsa perikaryonun direkt etkilenmesi veya trofik faktörlerin kaybolmasına bağlı sinapsın bozulması ile yozlaşma başlar. Burada hasarı belirleyen toksisitenin şiddet ve süresi ile kalıcılığıdır. Dejenerasyon süreci oluşan mekanizmaya bağlı olarak hızlı veya yavaş gerçekleşebilir (Song, Sanchez-Ramos, 2002; Brazelton, Rossi, Keshet, Blau, 2000).Geciken nörotoksik etki, nöropati target esteraz (NTA) enzim düzeyini kültür ortamında ölçerek gösterilebilir (Yang, Huang, Ma, 2006).

Nörotoksik maddelerin in vitro test tekniklerinde hücre üzerine etkisi selektif bir şekilde olmaktadır. Bu spesifik duyarlılık bileşimin ekstrasellüler konsantrasyonuna da bağımlıdır. Genellikle ana bileşime bağlı toksik etki meydana gelmekte ise de, bazı durumlarda metabolitlerin de toksik etkileri görülebilir. Toksik maddenin fizikokimyasal özelliklerinin toksik etkiyi direkt olarak etkilediği bilinmektedir. Hücre substratum ilişkisi toksik etkide önemlidir (Hou, Cao, Wei, Bai, Zhang, Wu, Pei, 2002; Koshizuka, Okada, Okawa, Koda, Murasawa, Hashimoto, Kamada, Yoshinaga, Murakami, Moriya, Yamazaki, 2004; Sanchez-Ramos, 2002).In vitro ortamda nöronların temel fonksiyonu olan nörit uzaması, aksonal transport gibi kritik hücresel olaylara bağlıdır. Nörit uzaması, mikrotubil birleştirici protein ve nörofilament proteini gibi nörit için özel yapısal elemanlara bağlı gelişir. Biyolojik, kimyasal ve çevresel toksik maddeler nörit uzamasını engeller. Nörit geliştiren faktör, nöronotrofik faktör ve glial maturasyon faktörü nörit uzamasının gelişim sürecinde rol oynarlar. Bu nedenlerle nörit uzamasının izlenmesi yeni moleküllerin nörotoksik aktivitelerini araştırmak için kullanılabilir (Song, Sanchez-Ramos, 2002;



Scintu, Reali, Pillai, Badiali, Sanna, Argiolu, Ristaldi, Sogos, 2006; Atlasz, Babai, Reglodi, Kiss, Tamas, Bari, Domoki, Gabriel, 2007).

Lokal anestezi, duysal iletinin vucudun bir yerinden SSS'ne ulasamaması durumudur. Lokal anestetikler, uyarilabilir dokularin sodyum kanallarini bloke eden, kimyasal olarak birbirine benzer bir ajanlar grubudur. Lokal anestetik ilaclarin cogu ester ya da basit benzen derivesi amidlerdir. Birçok kısa etkili lokal anestetik, uygulama sonrası enjeksiyon alanından hızla kana absorbe olur. Bölgeye kan akımı azaltılmadığı sürece lokal etkinin süresi kısıtlı olur. Lokal anestetikler, voltaj bağımlı sodyum kanallarını bloke ederler ve sodyum iyonlarının girişini azaltırlar. Böylece membran depolarizasyonunu engellerler ve aksiyon potansiyelinin iletisini bloke ederler. Lokal anestetikler, reseptörlerine sitoplazmadan veya hücre membranından ulaşırlar. İlaç molekülü sitoplazmaya ulaşmak için lipid membranı geçmek zorunda olduğundan, yüksek lipid çözünürlüğe sahip non iyonize, yüksüz formlar etkili intraselüler konsantrasyonlara, iyonize formlardan daha çabuk erişirler. Diğer taraftan bir kez akson içine girdikten sonra, ilacın iyonize yüklü formu daha etkin blok yapar.

Kök hücre uygulamaları ile değişik kökenli hücrelerin (Corti, Locatelli, Donadoni, Strazzer, Salani, Del Bo, Caccialanza, Bresolin, Scarlato, Comi, 2002) hedef dokuda bulunan kök hücreler gibi çalışabileceği gösterilmiştir (Corti, Locatelli, Donadoni, Strazzer, Salani, Del Bo, Caccialanza, Bresolin, Scarlato, Comi, 2002). Erişkin kök hücrelerinin yaşa ve kapasiteye bağlı zorlukları (83) embriyonik kök hücreleri ile aşılmaya çalışılmıştır (Smith, Sadler, Dodd, Edwards, Ward, Park, McLean, 2001). Embriyonik hücrelerin elde edilmesindeki teknik ve etik sorunlar erişkin kök hücrelerinin önemini korumasına neden olmaktadır. Özellikle spinal kord hasarlarında kök hücre uygulamalarının büyük ümitler vaat ettiği bilinmektedir (Jones, Anderson, Galvin, 2003). Yine kordon kanından alınan kök hücrelerinin nöral dokunun hasarında kullanılabileceği düşünülmektedir (Selander, Brattsand, Lundborg, Nordborg, Olsson, 1979). Hem kordon kanında hem de kemik iliğinde bulunan ve birçok hedef hücreye farklılanma kapasitesi olan mezenkimal hücrelerin aynı kapasiteye sahip olduklarını düşündüren sonuçlar bulunmaktadır (Jendelova,

Herynek, Urdzikova, Glogarova, Kroupova, Andersson, Bryja, Burian, Hajek, Sykova, 2004).Nöral progenitörlerin kordon kanı ve kemik iliğinden alınması ile ilgili protokol gösterilmiştir (Song, Sanchez-Ramos, 2002).

Bu çalışmada amaç kemik iliği stromal kök hücreden farklılaştırılmış nöronlar ile nöroblastoma hücre dizininde nörotoksisite tarama testinde, tıpta yaygın olarak kullanılan lokal anesteziğin nörotoksik etkili olup olmadıklarını ve varsa nörotoksisite derecelerini araştırmaktır. Nörotoksik bileşikler nöronların nörit uzamasını inhibe ederler. Bu inhibisyonun derecesi ile uygulanan maddelerin nörotoksik etki gücü paralellik gösterir. Biz de çalışmamızda farklı lokal anesteziğin olası nörotoksik etkilerini ve nöronun bu etki karşısında çoğalma ve ölme gibi davranış mekanizmalarını, in vitro olarak, oksidatif stres ve apoptozis yönünden araştırmayı amaçladık.

## 2. GEREÇLERve YÖNTEMLER

### 2.1. Kullanılan Gereçler

#### 2.1.1. Kullanılan hücre hattı

ATCC'den ticari olarak CRL-2266 katalog numaralı fare nöroblastoma hücre hattı (NB2a) satın alındı ve kullanıldı (McNeil ve ark 19xx)

#### 2.1.2. Kullanılan cihazlar

Kullanılan cihazlar sıralandığında;

- EnSpire multimode plate okuyucu (Pelkin Elmer)
- Janus otomatik pipetleme cihazı (Pelkin Elmer)
- Spektrofotometre (Shimadzu BioSpec Nano)
- Masaüstü soğutmalı tüp ve plate santrifüj (Beckman Coulter Allegra X-15R)
- Masaüstü soğutmalı eppendorf santrifüj (Beckman Coulter Microfuge 22R)
- Laminar Flow (Herasafe™ KS Class II)
- CO2 inkübatör (Heracell-Thermo Fisher Scientific)
- Hücre sayım ve canlılık tayini cihazı (Roche Cassy)
- -- 80°C derin dondurucu (Sanyo U7386S)
- Invert Mikroskop (Olympus) şeklindedir.

#### 2.1.3. Deney protokolü:

Çalışma Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Ab. D. Hücre Kültürü Laboratuvarında yapılacak olup fare Nöroblastoma hücre hattında (NB2a) çalışılacaktır.

**Hücre dizini;** Fare nöroblastoma 2a hücreleri (NB2a)

**Proliferasyon medyumu:** %5 fetal calf serum+ %5 horse serum+ %0.1 penisilin/streptomisin solüsyonu+ gentamisin solüsyonu üzerine yüksek glukozlu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ile 100ml tamamlanarak elde edildi.

**Diferensiyasyon (farklılaşma) Medyumu:** %0,1 Penisilin/streptomisin solüsyonu + 0.5mM d-cAMP + gentamisin solüsyonu üzerine 100 ml tamamlanacak şekilde yüksek glukozlu DMEM ilavesi ile elde edildi.

Nöroblastoma hücreleri kültür ortamında (flask içinde) %5 fetal calf serum, %5 horse serum, %1 penisilin/streptomisin solüsyonu (10000 U/10mg) ve %0.1 gentamisin (20 mg/ml) içeren yüksek glukoz konsantrasyonlu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ile 37C° ve %5 CO<sub>2</sub> koşulları sağlayan etüv içinde çoğaltıldı (Axelrad, Howard, McLean, 2003; Flaskos, McLean, Fowler, Hargreaves, 1998; McLean, Holme, Janneh, Southgate, Howard, Reed, 1998).

**Nörotoksisite Tarama Testi;** 24 örnek (well) içeren tabaklara (plate), her bir örnek içinde 15000 hücre/ml hücre, 500µl ilk üç örneğe proliferasyon medyumu (negatif kontrol) ve geri kalan örneklere serum içermeyen DMEM içine dibütiril cAMP (0,5 mM) eklenerek oluşturulan farklılaşma medyumu (proliferasyon medyumu) konuldu. 24 saat sonra her bir konsantrasyon için farklılaşma medyumu içeren 3 örnek içine pioglitazon (PG) 1, 3, 10, 30 µM konsantrasyonlarda konuldu. Ayrıca çözücü olarak kullanılan etanol çözücü olarak kullanıldığı miktarda 20 µl hacimde 3 örnek içine eklendi (pozitif kontrol). 24 saat sonra hücreler 20 dakika %4 formaldehid (PBS içinde) fikse edildikten sonra 5 dakika Coomassie Blue boyasında (%0.6) bekletildi. Boyanmış örnekler daha sonra 2 kez önce PBS daha sonra distile su ile yıkandı. Bir gece kurumaya bırakıldı. Işık mikroskobu altında rasgele seçilen 10 farklı sahadan 100 hücrenin nörit uzunlukları görüntü analiz sistemi ile ölçülür. Ölçülen nörit uzunluğu değerleri %inhibisyon ile değerlendirilir (McLean, Holme, Janneh, Southgate, Howard, Reed, 1998).

Pozitif kontrol nörit uzunluğu - Madde konulan nörit uzunluğu

% İnhibisyon= -----

Pozitif kontrol-Negatif kontrol

### **Klorprifosun Nörotoksik Etki Düzeyi**

Klorprifos uygulaması öncesinde hücre kültürüne eklenecek dozu tespit etmek amacıyla tüm kuyucuklara 500 µl hacimde proliferasyon medyumu içerisine her kuyucukta 16 000 hücre olacak şekilde NB2a hücresi kondu. 24 saat sonra ilk üç kuyucukta (well) proliferasyon medyumu (negatif kontrol), geri kalan tüm kuyucuklardan medyum çekilerek serum içermeyen DMEM içine dibütiril cAMP (1 mM) farklılaşma medyumu (diferensiyasyon medyumu) ve klorprifos 10 µM, 20 µM, 25 µM 30 µM, ve 40 µM konsantrasyonlarda uygulandı.

24 saat sonra hücreler 10 dakika %4 formaldehid (PBS içinde)fikse edildikten sonra 3 dakika Coomassie Blue boyasında (%0,6)bekletildi. Boyanmış örnekler daha sonra PBS ile yıkandı. Sonra ışık mikroskobu altında rasgele seçilen 10 farklı sahadan 100 hücre deki nörit uzunlukları görüntü analiz sistemi ile ölçüldü. %100 Nörit inhibisyonu yapan konsantrasyonu araştırıldı. En etkin en düşük konsantrasyon olarak 25 µM tespit edildi.

### **Klorprifos İle Oluşturulan Nörotoksisite Üzerine NTT**

İlk gün, tüm kuyucuklara 500 µl hacimde proliferasyon medyumu içerisine her kuyucukta 16 000 hücre olacak şekilde NB2a hücresi kondu. 24 saat sonra ilk üç kuyucukta (well) proliferasyon medyumu (negatif kontrol), geri kalan tüm kuyucuklardan medyum çekilerek serum içermeyen DMEM içine dibütiril cAMP (1 mM) farklılaşma medyumu (diferensiyasyon medyumu)ve klorprifos 25 µM konsantrasyonlarda eklenerek nörotoksisite oluşturuldu. Her 3 kuyucuğa, 1, 3, 10 ve 30 konsantrasyonda pioglitazon kondu. Kültür tabağındaki üç kuyucuğa herhangi bir madde eklenmedi (pozitif kontrol).Diğer üç kuyucuğa ise dproliferasyon medyumu eklendi (neğatif kontrol).

24 saat sonra hücreler 10 dakika %4 formaldehid (PBS içinde) fikse edildikten sonra 3 dakika Coomassie Blue boyasında (%0.6)bekletildi. Boyanmış örnekler daha sonra *Phosphate-buffered saline* (PBS) ile yıkandı. Sonra ışık mikroskobu altında rasgele seçilen 10 farklı sahadan 100 hücredeki nörit uzunlukları görüntü analiz sistemi ile ölçüldü. Ölçülen nörit uzunluğu değerleri % inhibisyon ile değerlendirildi.

**MTT Metabolizmasının Ölçülmesi:** MTT çalışması yani 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5 difeniltetrazolyum bromid'in mor formazan ürününe redüksiyonu, hücre yaşamı ve proliferasyonu tahmin etmek için kullanılan bir yöntemdir. Hücreler, enkübasyon periyodunun son 4 saatinde MTT'nin 0,5 mg/ml'lik çözeltisi ile enkübasyona devam etmiş; ortam daha sonra dekante edilir ve formazan tuzları dimetilsülfoksit (DMSO) ile çözülmüş ve 570 nm'de UV spektrometre ile absorbans ölçülür. Kontrol grubuna göre ölçülen absorbanslar karşılaştırılarak kimyasal verilen gruplardaki yaşam ve proliferasyon hakkında bilgi edinilir. Hücrelerin kültür ortamındaki canlılığının değerlendirilmesinde bu hücrelerin mitokondrial fonksiyonları, dolayısıyla canlı hücre yoğunluğu kolorimetrik bir test yöntemi olan MTT (mitokondrial aktivite) testi ile belirlendi.

Bu test, sarı, suda çözünebilir MTT boyasının aktif mitokondrilerdeki elektromotorik akımı yoluyla mor formazan ürünlerine dönüşmesini ölçer. MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid'in mor renkli formazan ürünlerinin azalması hücre yaşama ve çoğalmasında fikir verir. Hücreler 0,5 mg/ml MTT solüsyonu ile 4 saat inkübe edildi. Daha sonra medyum uzaklaştırıldı. Kültür kabının her gözüne dimetilsülfoksit (DMSO) eklendi. Formazan tuzları DMSO ile çözüldü ve absorbans 570 nm'de, 690 nm referans filtreye karşılık mikropiplaka okuyuculu spektrofotometre (Versa Max, Molecular Device, USA) de ölçüm yapıldı. Nöroblastoma hücreleri,  $15 \times 10^3$  hücre gelecek şekilde örneklerle konduktan sonra, pioglitazon 1, 3, 10, 30  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda ortama ilave edildi. 48 saat inkübe edildi. Süre tamamlandıktan sonra, her örneğe ortama 50  $\mu\text{l}$  MTT ilave edildikten 4 saat sonra canlı hücrelerin mitokondrilerinde formazona çevrilen MTT'yi solubl hale getirmek amacıyla 1 ml isopropanol eklendi ve optik okuyucuda 570 nm dalga boyunda optik dansiteleri spektrofotometrede okutuldu. Kontrol grubuna göre % olarak hesaplandı (Walum, Peterson, 1984; Atlasz, Babai, Reglodi, Kiss, Tamas, Bari, Domoki, Gabriel, Diazoxide, 2007). Veriler ortalama+standart hata olarak gösterildi ve tek yönlü varyans analizi ve ardından Tukey'in çok yönlü karşılaştırma yöntemiyle istatistiksel olarak değerlendirildi.  $p < 0,05$  anlamlı olarak kabul edildi.

## 2.2 TUNEL Yöntemi

TUNEL Yöntemi İle apoptotik hücre ölümünün belirlenmesinde DeadEnd Colorimetric TUNEL system, Promega G7130 kiti kullanılarak 5 µm kalınlığındaki parafin bloklardan alınmış kesitlere uygulandı. Kesitler 1 gece 60°C'lik etüvde ısı ile deparafinize edildi. Ardından 1 saat ksilen ile kimyasal deparafinize edildi. Azalan alkol serileri ile 2'şer dakika (%95, %80, %70, %60) rehidratasyon uygulandıktan sonra dokular serum fizyolojik ile oda ısısında 5 dakika (%0.85 NaCl) muamele edildi. 5 dakika PBS (fosfat buffer solusyonu) ile oda ısısında yıkandı. Doku kesitleri %4 paraformaldehit ile 15 dakika oda ısısında fiske edildi. 5 dakika PBS ile oda ısısında yıkandı. 1/500 oranında PBS ile dilüe edilen 20-µg/ml proteinase K 20 dakika doku kesitlerine uygulandı. PBS ile yıkamayı takiben %4'lük paraformaldehit ile 5 dakika yeniden fiksasyon yapıldı. 5 dakika PBS ile oda ısısında yıkandı. Kesitler 5- 10 dakika Equilibration buffer ile oda ısısında tutuldu. TdT-enzimi ile nemli atmosferik ortamda 37 °C de 60 dakika plastik cover slipler kesitleri kapatacak şekilde konarak tutuldu.

15 dakikalık SSC yıkamasının ardından 5 dakika PBS ile oda ısısında yıkandı. 3-5 dakika hidrojen peroksit uygulanması sonrası 5 dakika PBS ile oda ısısında yıkandı, 1/500 oranında PBS ile hazırlanan Streptavidin HRP solüsyonu ile 30 dakika oda ısısında inkübasyona tabi tutuldu. 5 dakika PBS ile oda ısısında yıkandı ve ardından DAB (Diaminobenzidin) ile boyama yapıldı, birkaç kere distile su ile yıkama yapıldı. Artalan boyaması Mayer's Hematoksileni ile yapıldı. Kör yöntemle TUNEL pozitif hücreler saptanmaya çalışıldı. Negatif kontrol için primer antikor yerine PBS, pozitif kontrol olarak da apoptozis olduğu bilinen testis dokuları kullanılabilir. İmmunohistokimyasal değerlendirmede preperatlara boyanın yoğunluğu ve dağılımına göre + (1), ++ (2), +++ (3) olarak körlemesine semikantitatif puanlama yapıldı (Tablo 2.5). Ortalamalar istatistiksel olarak değerlendirildi (Rygaard, Lindenberg, 2002; Vidal, Díaz, Villena, Moreno, Campos, de Vargas, 2006).

TUNEL immunohistokimyası apoptotizis körleme yöntemle mikroskop altında histolojik ve morfometrik bakıları yapıldı.

**Tablo 1** : TUNEL Boyama Protokolü

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

### 2.3. İstatistik

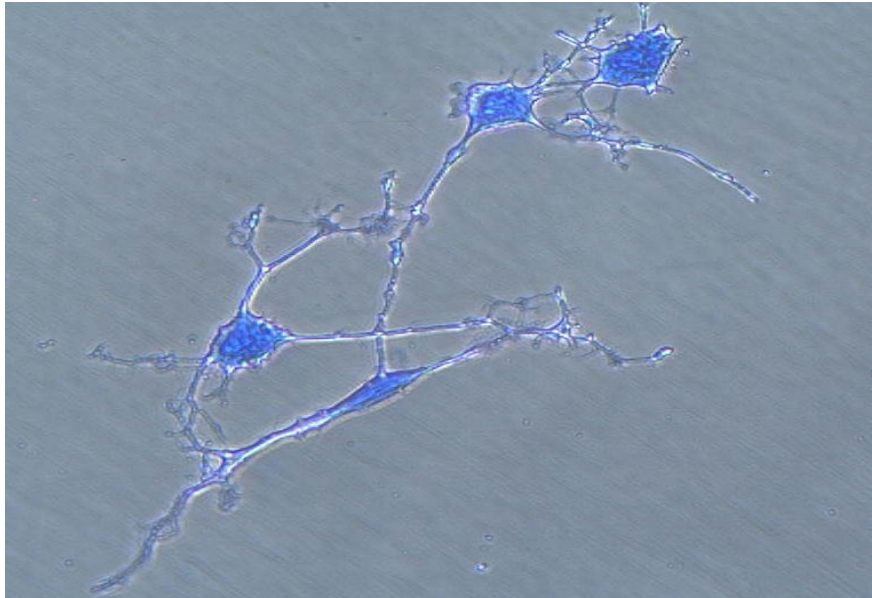
Parametrelere göre değerlendirilen veriler, ortalama ve standart sapmaları hesaplanarak ANOVA istatistiksel analiziyle incelenip posthoc test olarak tukey-B kullanılarak yapıldı.  $P < 0.05$  \* anlamlı olarak kabul edildi.



### 3. BULGULAR

PG, Diabet hastalığının tedavisinde kullanılan bir ilaç olup diyabetiklerde özellikle periferik nöropatilerde olumlu etkileri ve nöron koruyucu etkileri olduğu söylenmektedir. Ancak nöron kültüründe nörit inhibisyonuna olan etkisi ile ilgili bir kanıt yoktur. Bu nednele nöronlar üzerine PG etkisini nörit inhibisyonunu ortaya koyan nörotoksite tarama testi (NTT) ve hücreye yüksek toksik etkinin göstergesi kabul edilen ve hücre ölümüne neden olan hücre kaybını gösteren MTT metabolizması üzerine etkileri ile ortaya çıkan hücre ölümünün nekrozamı yoksa apopitozamı bağlı olup olmadığı TUNEL testi ile araştırdık.

Çalışma Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Ab. Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarında tamamlanmıştır. Hücre dizini; Fare nöroblastoma 2a hücreleri (NB2a), Kültür ortamındaki NB2a hücrelerinin farklılaşma etkeni cAMP eklenmeden bölünme ve çoğalma dönemindeki 48 saatlik kültür yaşamındaki görüntüleri alındı (Resim 1).



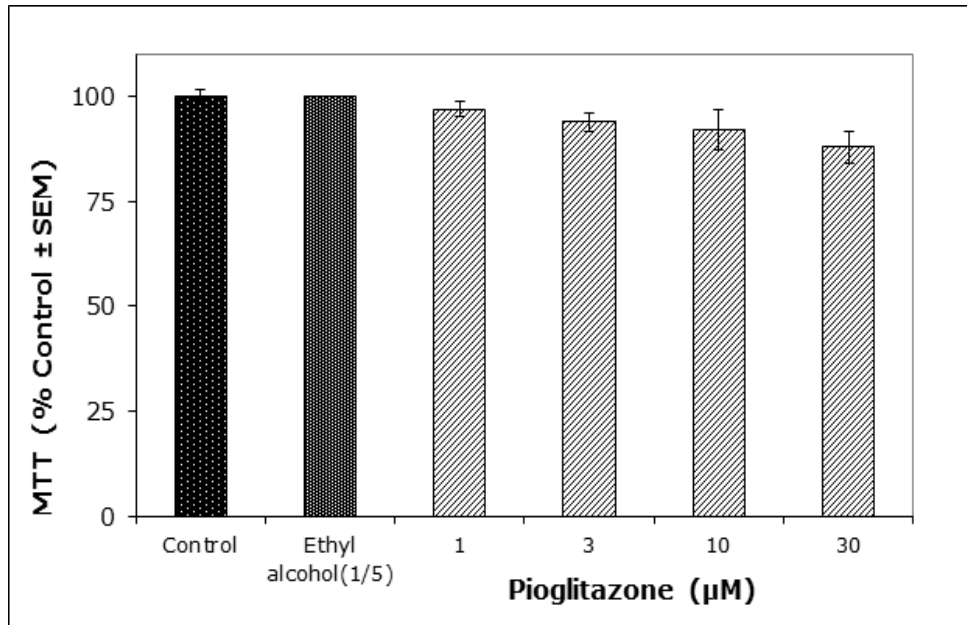
**Resim 1** : d-cAMP ile farklılaştırılan NB2a Kültür Hücresi görüntüsü x 400

## MTT Metabolizması

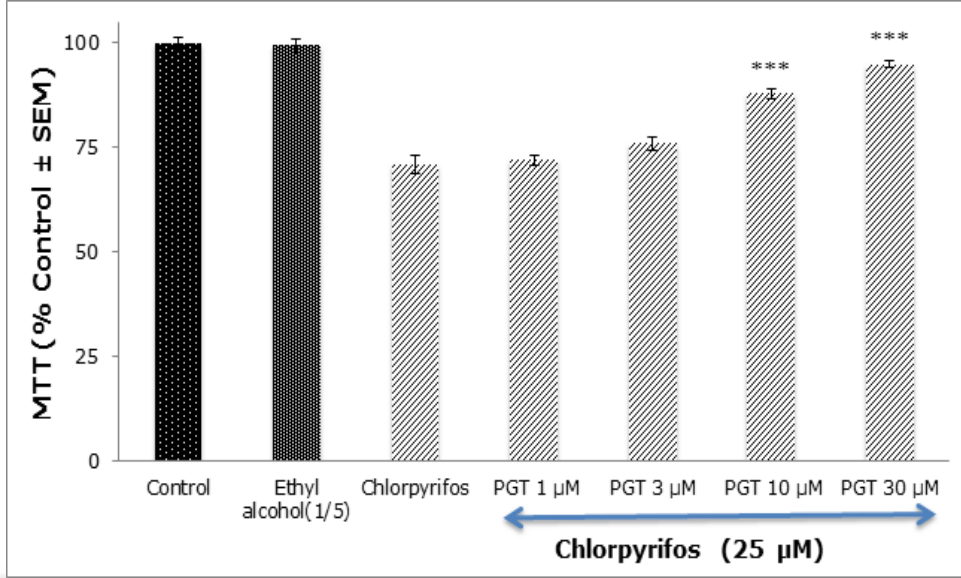
MTT 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2, 5 difeniltetrazolyum bromid'in mor formazan ürününe redüksiyonu, hücre yaşamı ve proliferasyonu tahmin etmek için kullanılan bir yöntemdir.

Kontrol grubuna göre değişik PG konsantrasyonlarda yaşayan hücre sayıları değerlendirildi. MTT yöntemiyle, Nb2a hücre sayısında, kullanılan tüm konsantrasyonlarda PG, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik göstermedi. Tüm konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak hücre ölümü saptanmamıştır ( $p>0.05$ ). (Şekil 1).

Çalışmamızın 2. Bölümünde ise klorprifos 25 uM konsantrasyonda uygulanarak NB2a hücrelerinin yaşayan hücre sayıları değerlendirildi. klorprifos 25 uM konsantrasyonda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak yaşayan hücre sayısını azalttı. (Şekil 2). Pioglitazon uygulanması 10 uM konsantrasyondan itibaren azalan hücre sayısını kontrol grubuna yaklaştırdı. 30 uM konsantrasyonda kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. ( $p<0.001$ ).



Şekil 2 : NB2a hücreleri üzerine değişik konsantrasyonlarda PG'un MTT metabolizması üzerine etkisi. Kontrol grubuna göre ( $p>0.05$ ).

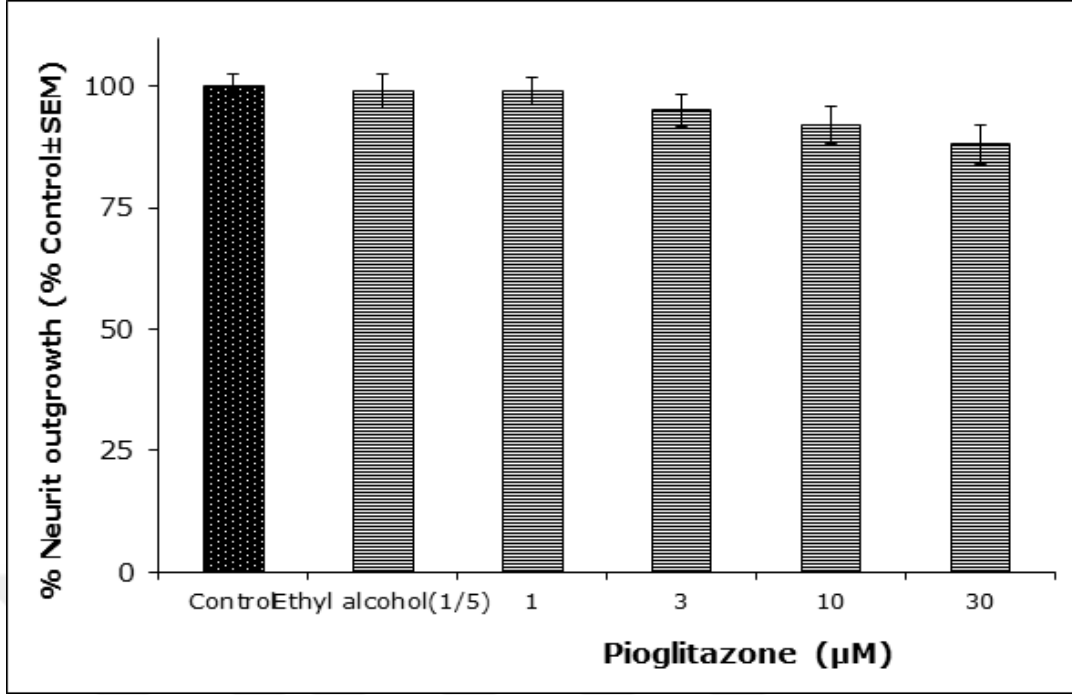


Şekil 3 : NB2a hücreleri üzerine klorprifos 25 uM konsantaryonda etkisine karşı değişik konsantrasyonlarda PG'in MTT metabolizması üzerine etkisi. Klorprifos grubuna göre \*\*\*p<0.001

### Nörotoksisite Tarama Testi

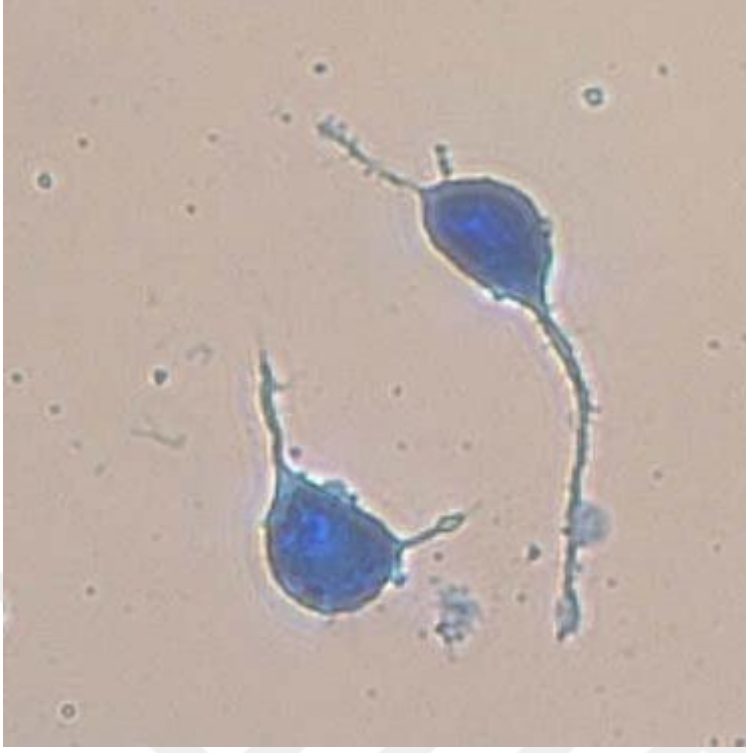
Işık mikroskobu altında rasgele seçilen 10 farklı sahadan 100 hücredeki nörit uzunlukları görüntü analiz sistemi ile ölçüldü. Ölçülen nörit uzunluğu değerleri % inhibisyon ile değerlendirildi (Huang, Thalhammer, Raymond, Strichartz, 1997).

İlımlı toksik etkinin bir göstergesi olarak kabul edilen nörit inhibisyonunun incelendiği nörotoksisite tarama testinde hücrelerin nörit uzamasına PG'un etkisi incelendi (Şekil 3).Hücrelerin kültür yaşamının sonunda fikse edilerek alınan görüntülerde yapılan morfometrik incelemede PG doza bağlı ilımlı nörotoksik etkisi gözlemlenmedi. (p>0,05).

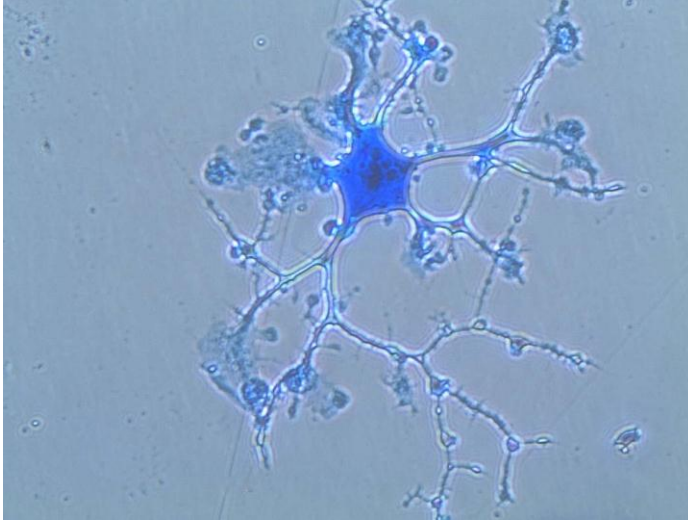


**Şekil 4** : NB2a hücreleri üzerine PG değişik konsantrasyonlarında nörit inhibisyonuna etkisi, kontrol grubuna göre anlamlı bir fark görülmedi. ( $p>0.05$ )

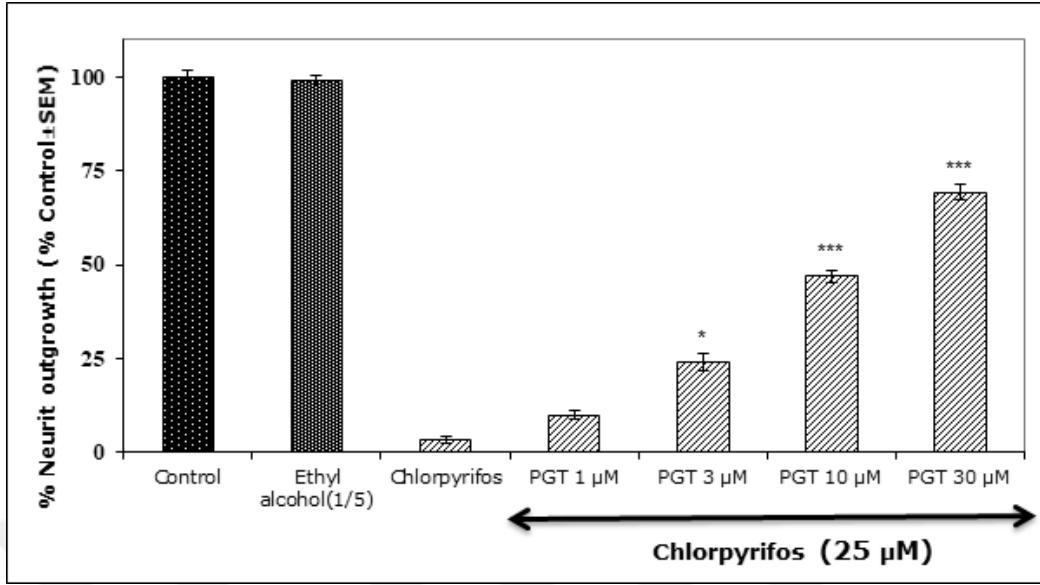
Çalışmamızın 2. Bölümünde klorprifos 25 uM konsantrasyonda uygulanarak NB2a hücrelerinin nörit uzatmaları inhibe edildi (Resim 2).Klorprifos 25 uM konsantrasyonda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde nörit inhibisyonu yaptı ( $***p<0.001$ ).Pioglitazon 3 uM konsantrasyondan itibaren klorprifosun yapmış olduğu nörit inhibisyonunu engelledi (Şekil 4).Klorprifos göre 30 uM konsantrasyonda PG oldukça anlamlı düzeyde nörit inhibisyonunu engelledi (Resim 3).PG 10 ve 30 uM konsantrasyonlarda uygulandığında norotoksik etkinin azaldığı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde nörit inhibisyonunu engellediği ve nöronun ılımlı toksik etkiden koruyabildiği görülmektedir ( $***p<0.001$ ).



**Resim 2 :** 25  $\mu$ M klorprifos uygulanan NB2a hücrelerinde oluşturulan nörit inhibisyonunun görüntüsü x400



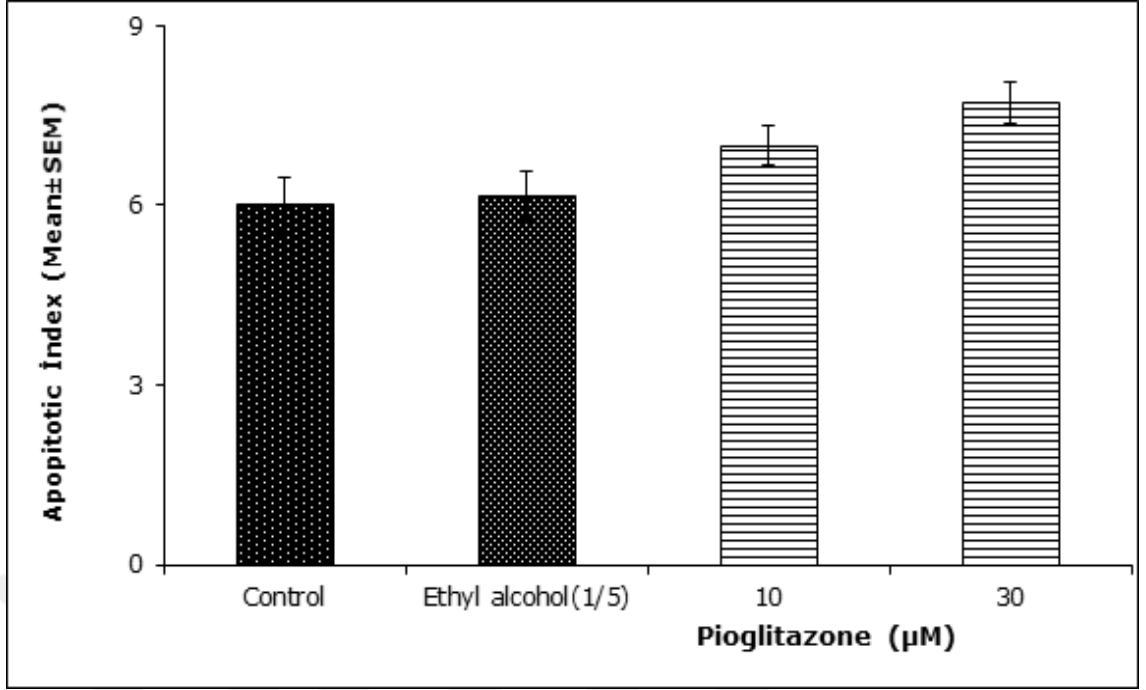
**Resim 3 :** 25  $\mu$ M klorprifos + PG 30 uM konsantrasyonda uygulandığında NB2a hücrelerinde oluşturulan nörit uzamasının görüntüsü x400.



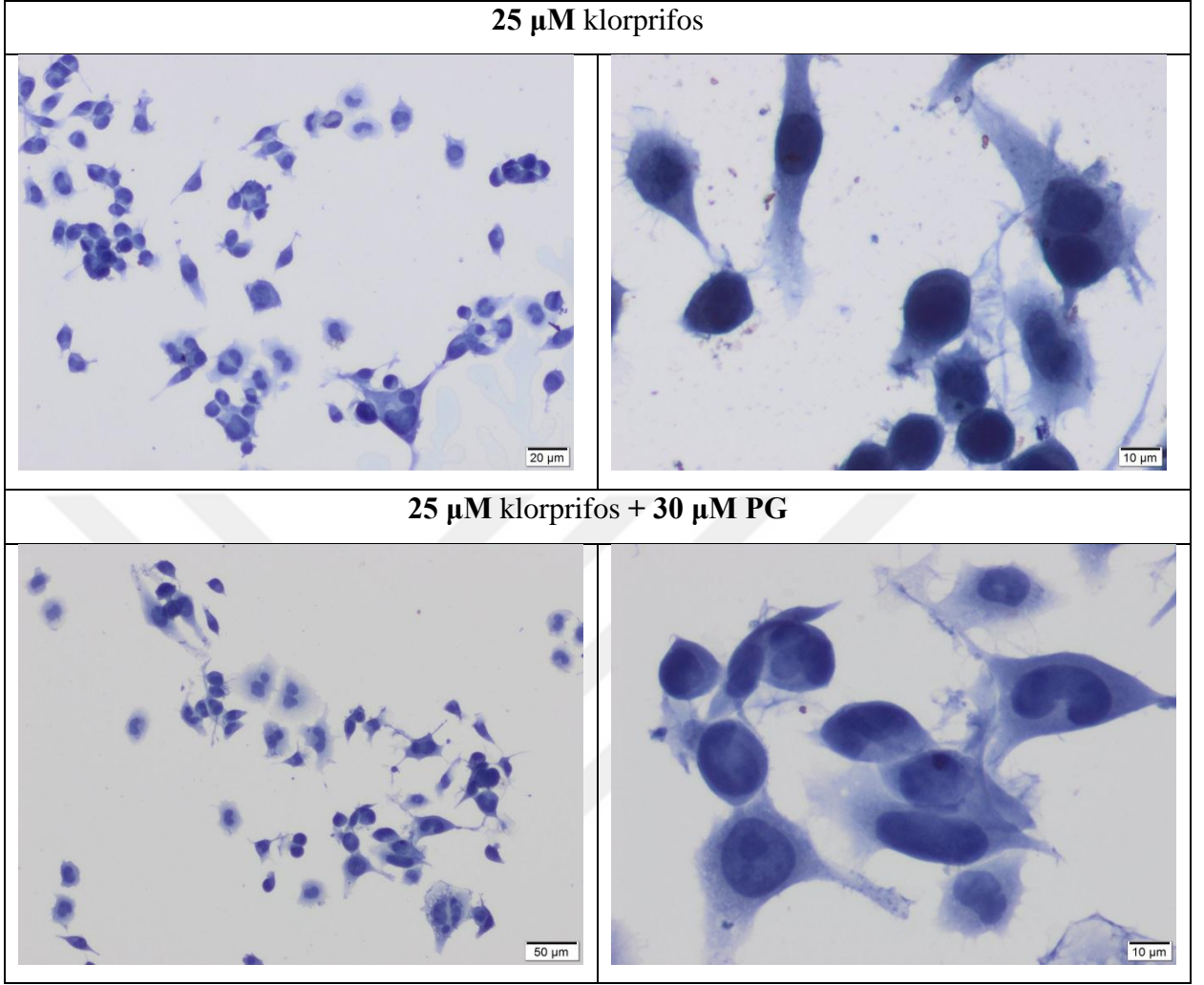
**Şekil 5** : Nörit uzamasına klorprifosun ve PG nin etkisi. Klorprifosa göre istatistiksel olarak anlamlı nörit uzamasında anlamlı bir artış görüldü (\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

### TUNEL Boyaması

Apoptotik hücre ölümünün belirlenmesinde **Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling** (TUNEL, S7101, Millipore, USA) boyama yöntemi kullanıldı. Kör yöntemle TUNEL pozitif hücreler saptandı. Daha sonra istatistiksel olarak gruplar değerlendirildi. Ölen Hücrelerin nekrozamı bağlı yoksa apoptozamı bağlı olduğunu göstermek amacıyla TUNEL testi yapıldı. Kontrol grubuna göre ölen hücre sayısının az olması sebebiyle 10 ve 30 µM dozlarda PG ile üç tekrar halinde TUNEL boyaması yapıldı. Yapılan boyamalarda ilaçların 2 farklı konsantrasyonunda toksik ve apoptotik etkileri gözlenmeye çalışıldı. Yapılan boyamalardan elde edilen gözlemlerde gelişen nöroblastoma hücrelerinin sağlıklı olduğu görüldü. Sağlıklı gelişen ve yapışan bu hücrelerin nörit uzattıkları da gözlemlendi (**Resim 5**). Görüntülenen NB2a hücreleri sağlıklı ve yapışan az miktarda nörit uzatmış hücreler olup toksik etki ve apoptotik hücre ( $p > 0.05$ ) sayısında artış görülmedi (Şekil 5).



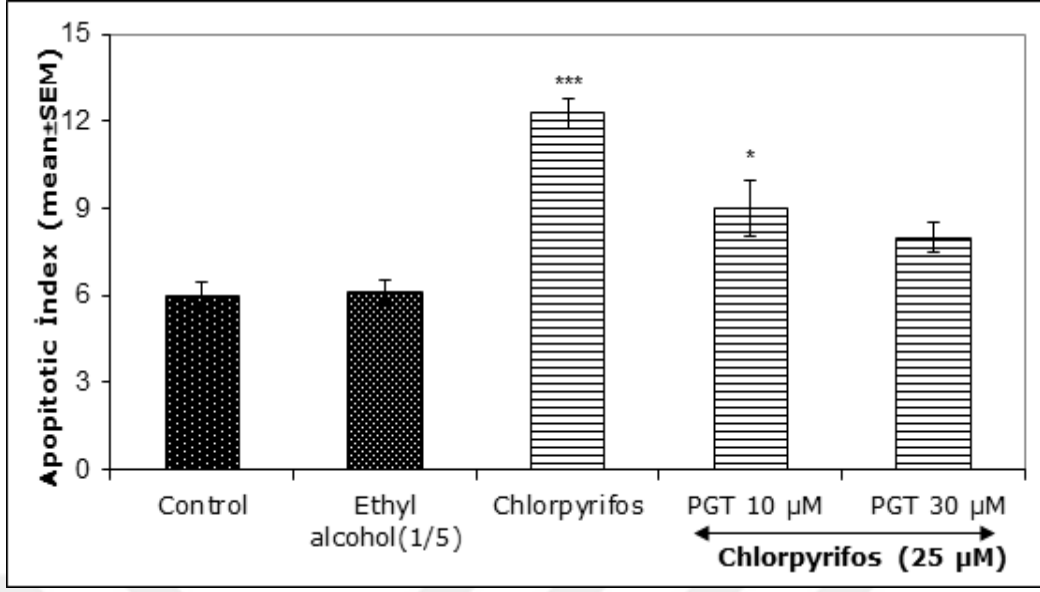
**Şekil 6** : Pioglitazon tek başına uygulandığında kontrol grubuna göre apoptotik hücre sayısında anlamlı bir fark görülmedi ( $p>0.05$ ).



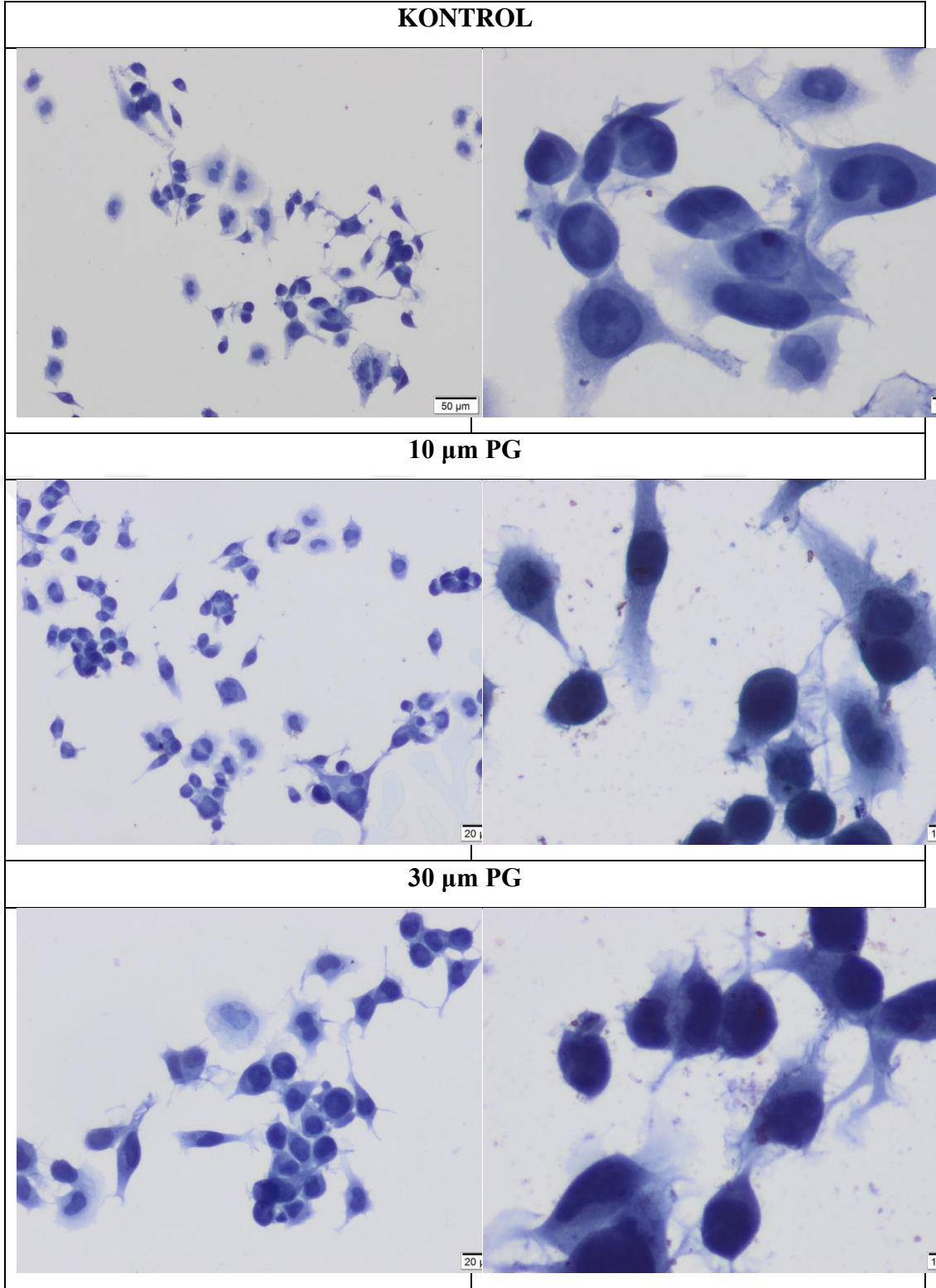
**Resim 4** :Apoptotik hücrelerin görünümü düşük (x100) ve yüksek (x400) büyütmelerde. CPS uygulanan hücreler hem morfolojik olarak diferansiye olamadığı hemde apoptotik hücre sayısında artış olduğu gözlemlendi. Birlikte PG 30 uM konsantarsyonda uygulanmdığında hem morfolojik düzelve hemde apoptotik hücre sayısında azalma görüldü.

Klorprifos uygulaması apoptotik hücre sayısını istatistiksel olarak artırmış olup ( $p < 0.001$ ) PG uygulanması ile apoptotik hücre sayısını anlamlı bir düzeyde azalmıştır (Şekil 6).Özellikle 30 uM konsantrasyonda PG uygulanması ile kontrol grubuyla aynı sayıda apoptotik hücre varlığı görülmüştür ( $p > 0.05$ ) (Resim 4).





Şekil 7 : Apoptotik hücre sayısına CPS nin ve PG nin etkisi. Kontrol grubuna göre (\*p<0.05, \*\*\*p <0.001)



**Resim 5 :** NB2a hücreleri üzerine PG etkisi altında 10 ve 30 uM konsantrasyonlarda nörit uzatmaları ile oldukça sağlıklı morfolojik görünümleri olduğu ve apoptoz ile işaretlenmedikleri izlendi.

#### 4. TARTIŞMA

Alkol kaynaklı nörotoksisitedeki temel unsurların Eksitotoksisite ve nöroinflamasyonda rol oynayan mekanizmalar olup, PPAR $\gamma$  agonistinin koruyucu etkisi, pro-inflamatuvar sitokinlerin inhibisyonuyla bağlantılı görünmektedir (Cipitelli A.ve ark 2017).Pioglitazon, Parkinson hastalığının MPTP fare modelinde nöronal hasarı zayıflatarak, MAO-B enziminin inhibisyonunu içeren bir mekanizma ile zayıflatır.(Quinn LP.ve ark.2008 )PPAR $\gamma$  aktivasyonunun, büyüme inhibisyonu, apoptosis ve bir takım tümör hücrelerinin farklılaşmasına yol açtığını bazı çalışmalarda gösterilmiştir.

Giulianove ark. çalışmasında da specific inhibitors of PPAR $\gamma$ , GW9662 or T0070907 ise WIN(*R*-[2,3-Dihydro-5-methyl-3[(4-morpholinyl)methyl]pyrrolo[1,2,3,-de]-1,4-benzoxazin-6-yl]-1-naphthalenyl methanone mesylate) ile oluşturulan sitotoksisteyi pioglitazonun engellediği gösterilmiştir.(Guiliano M. ve ark.2008).

Fenofibrat ve pioglitazonun olası nöroprotektif etki mekanizması. Hem MPTP hem de Parkinson hastalığındaki nöroinflamasyonda rol alan NF- $\kappa$ B'yi aktive eder. Fenofibrat ve pioglitazon, NF- $\kappa$ B'nin aktivasyonunu inhibe ederek nöroinflamasyonun oluşmasını önler ve nöroprotektif etkiler ortaya koyar MPTP tedavisinin apoptoz ile nöronal ölümle sonuçlanan kaspaz-3'ü aktive ettiğini, ancak nöroprotektif ilaçlarla yapılan tedavinin kaspaz-3 aktivitesini inhibe edebileceğini ve nöronal hasarı azaltabileceğini göstermiştir. Pioglitazonun, MPTP'nin intranigral infüzyonundan sonra lokomasyon frekansının ve yetiştirme frekansının azalmasına karşı nöroprotektif bir etkiye sahip olduğunu daha önceki çalışmalarda gösterdik (Miida, Hirayama, Nakamura, 2004).Bir önceki çalışmada pioglitazonun, MPTP'nin neden olduğu hipolokomotion'u tersine çevirebildiğini de göstermiştir(Scalia, Stalker, 2002).

50 mg / kg pioglitazon, MPTP'nin nörotoksik etkilerine karşı kısmi nöroproteksiyonu gösterdi, substantia nigra'da TH immünreaktivitesi ile saptandı (Miida, Hirayama, Nakamura, 2004).PPAR alt tiplerinin ortak bir fonksiyonu, oksidatif stresin ve inflamatuvar süreçlerin baskılanmasıdır (Walum, Peterson, 1984).Bu keşifler, merkezi sinir sisteminin çeşitli bozukluklarında PPAR agonistlerinin nöroprotektif etkisini değerlendirmek için asıl mantığı sağlamıştır. PPAR- $\alpha$  ve PPAR- $\gamma$  agonistlerinin nöroprotektif etkililiği daha önceki çalışmalarda gözlenmiştir.(Hou ve ark. 2002) ve (Jendelova ve ark. 2004).

B27 komponenti (-B27) çıkararak hazırlanan medyumla nöron kültürü 24 saat inkübe edildiğinde kültür ortamında dramatik olarak nöronal hücre ölümler ortaya çıkmaktadır. Telmisartanın nöroprotektif etkisi vardır. Bu etki de PPAR $\gamma$  aktivasyonu kısmen CGC'lerde telmisartanın nöroprotektif etkileriyle ilgilidir.

Ang II, AT1 ve AT2 reseptörleri olmak üzere iki reseptör tipini uyarır 34. Ang II, esas olarak AT2 reseptörü aracılığıyla glutamat ile indüklenen nöronal hücre ölümünü azaltır. AT1, fakat AT2 olmayan benzer nöroprotektif bir rol daha önce insan nöroblastoma kültürlerinde bildirildi. AT1 reseptör blokajı, önemli bir nöroprotektif sistem olan nükleer reseptör PPAR $\gamma$ 'yı aktive eder. Telmisartan veya losartanın PPAR $\gamma$ -aktive edici etkileriyle nöroprotektif etkileri oluşturdukları düşünülmektedir. Ayrıca PPAR $\gamma$  aktivasyonu, glutamat aracılı nörotoksositeye karşı nöroproteksiyonu teşvik edebilir.(Barbiero JK ve ark.2014 )Telmisartan AT1 reseptör blokajı ve PPAR $\gamma$  aktivasyonu yoluyla CGC'lerde besin yetersizliğine bağlı apoptoza karşı nöro koruyucu etkisini göstermiştir.(Pang T. ve ark. 2014 )

AMP-aktive protein kinaz (AMPK), hücre sağkalımı ve apoptoz ile ilgili sinyal yollarını düzenler ve hipokampal neurojenezin artırılmasında rol oynar (Moncada, Higgs, 1993).Farmakolojik AMPK aktivasyonu, in vitro olarak  $\beta$ -amiloid birikimini doğrudan inhibe edebildiği (Nolte, Harleman, Jahn, 1995) tarafından gösterilmiştir. hipokampal AMPK seviyeleri,  $\beta$ -amiloid birikimi ve nöronal apoptoz üzerine oral düşük doz (Yang, Huang, Ma, 2006) ve subkutanöz yüksek dozun (Atlas Z. 2007) MSG'nin etkilerinin karşılaştırıldığı çalışmada MSG toksisitesinin AMPK aktivatörü

Pioglitazone tarafından ters çevrilebileceği dair bulgular elde edilmiştir. AMPK tükenmesi, MSG nörotoksitesinin aracıcısı gibi olduğu ve Pioglitazone tarafından AMPK indüksiyonu ile ilişkili olarak Nöronal apoptoz ve  $\beta$ -amiloid birikiminin iyileştirildiğini göstermiş olmaları ile birlikte nöronal hasarı PG önlemesinin diğer yöntemler ile de gösterilmesi gerektiğini belirtmişlerdir. (Dief AE, 2014).pioglitazonun PPAR-gama aktivitesinin ve peroksizom fonksiyonunun modülasyonunun hem NO hem de hidrojen peroksit aracılı nöronal ve aksonal hasarı hafiflettiğini ve nöroinflamasyon ile ilişkili nörodejeneratif değişikliklere karşı yeni bir terapötik yaklaşım olduğunu gray ve ark. Belirtmişlerdir.(Gray E. ve ark. 2012 )

Tiazolidindionlar (TZD), primer etkileri periferik insülin direncini düşürmek olan ajanlardır. Primer etkilerini peroksizomal proliferatörle aktiveleştirilmiş reseptörler (PPAR) olarak adlandırılan spesifik reseptörleri aktif hale getirerek gösterirler. PPAR  $\alpha$ , PPAR  $\beta$  ( $\delta$ ), PPAR  $\gamma$  olmak üzere üç alt tipi vardır. TZD'ların antidiyabetik etkilerinin PPAR  $\gamma$  alt tipine bağlanma ve onu aktif hale getirme yeteneğiyle yakından ilişkili olduğu tespit edilmiştir. TZD'ların, vasküler sistem üzerinde etkileri mevcuttur. Vasküloprotektif etkilerinin çoğu insülin direncini kırıcı/antihiperlipidemik etkilerinden bağımsız olarak ortaya çıkmaktadır.

Kültür ortamında nörona yönlendirilmiş dizin hücrelerinin nörona ait diğer birçok karakteristiğinin yanında nörit uzatma özelliği üç boyutlu ortamından çıkmış, membranı ile direk temasa izin veren bir ortamın oluşmasını sağlamaktadır. Bu önemli yapılaşma in vivo şartlarda incelenen toksik etkiden farklı olarak olası toksik etkinin de bir göstergesi olmaktadır. Hücre-hücre, hücre-matriks ve hücre-büyüme faktörleri etkisi altında in vivo şartlardaki bir nöronun toksik etkiye dayanıklılığı ile çıplak halde kültürde bulunan tamamen savunmasız ve kontrolümüz altındaki nöron dayanıklılığı doğal olarak farklıdır. Bu nedenle kültürdeki nöronun toksik etkiye yanıtı birebir yanıt olmakta ve olası toksik etki hakkında bilgi vermektedir.

Hücre kültürü çalışmalarının önemli bir özelliği medyumda kontrol edilebilir düzeyde iyon bulundurulabilmesi ve toksisitesi ölçülen ilacın direkt olarak üç boyutlu

ortamın karmaşıklığından kurtulmuş, kan-beyin bariyeri permeabilitesine etkisi hiç görülmeden yapılmış çalışmalar olmalarıdır.

Sinir sisteminde nöronlar ve nöroglial hücreler vardır. Nöronların farkı akson ve dentritlere sahip olması ve bunlar aracılığı ile diğer nöronlar ve nöroglial hücreler ile haberleşmeyi sağlamasıdır. Dentritler nöron yüzeyini artırarak diğer hücrelerden uyarı almayı kolaylaştırır. Nöronal hücre membranının yapısal komponentlerinin korunması için gerekli faktörleri üreterek, hücre fonksiyonunu korur. Bunlardan bir tanesi olan myelin, aksonun etrafını sarar. Böylelikle hücre algılama iletişim birleştirme ve saklama işlemlerini yürütür. Hücre toksik bir etkiye maruz kalırsa perikaryonun direkt etkilenmesi veya trofik faktörlerin kaybolmasına bağlı sinapsın bozulması ile yozlaşma başlar. Burada hasarı belirleyen toksisitenin şiddet ve süresi ile kalıcılığıdır. Dejenerasyon süreci oluşan mekanizmaya bağlı olarak hızlı veya yavaş gerçekleşebilir. Geciken nörotoksik etki, nöropati target esteraz (NTA) enzim düzeyini kültür ortamında ölçerek gösterilebilir.

Nörotoksik maddelerin in vitro test tekniklerinde hücre üzerine etkisi selektif bir şekilde olmaktadır. Bu spesifik duyarlılık bileşiğin ekstrasellüler konsantrasyonuna da bağlıdır. Genellikle ana bileşiğe bağlı toksik etki meydana gelmekte ise de, bazı durumlarda metabolitlerin de toksik etkileri görülebilir. Toksik maddenin fizikokimyasal özelliklerinin toksik etkiyi direkt olarak etkilediği bilinmektedir. Hücre substratum ilişkisi toksik etkide önemlidir (Hou, Cao, Wei, Bai, Zhang, Wu, Pei, 2002; Koshizuka, Okada, Okawa, Koda, Murasawa, Hashimoto, Kamada, Yoshinaga, Murakami, Moriya, Yamazaki, 2004; Sanchez-Ramos, 2002). In vitro ortamda nöronların temel fonksiyonu olan nörit uzaması, aksonal transport gibi kritik hücresel olaylara bağlıdır. Nörit uzaması, mikrotubil birleştirici protein ve nörofilament proteini gibi nörit için özel yapısal elemanlara bağlı gelişir. Biyolojik, kimyasal ve çevresel toksik maddeler nörit uzamasını engeller. Nörit geliştiren faktör, nöronotrofik faktör ve glial maturasyon faktörü nörit uzamasının gelişim sürecinde rol oynarlar. Bu nedenlerle nörit uzamasının izlenmesi yeni moleküllerin nörotoksik aktivitelerini araştırmak için kullanılabilir (Flaskos, McLean, Fowler, Hargreaves, 1998; McLean, Holme, Janneh, Southgate, Howard, Reed, 1998).

Hücrenin ölümüyle ilgili kültür ortamında yapılabilecek testlerin en önemli parametresi membranda oluşan hasarın gösterilebilmesidir. Çalışmamızda MTT testi hücre yaşam kriteri olarak kullanılmış ve bu teknikle hücre ölümünün kontrol grubuna göre kullandığımız konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gösterilmiştir.

Çalışmamızda kültür ortamında hücre çoğalması ve farklılaşmasında her hangi bir problemin oluşmaması nedeniyle PG ile minimal toksik etkiye bağlı apoptozis görümemiştir.

Tiazolidindionların intrasellüler antioksidan aktivitesi dikkate değerdir. Bu özellik koruyucu antioksidan etkilerini yansıtmaktadır. Bu ajanlar serbest radikaller üzerinde direk antioksidan etki göstermezler. Fakat oksidatif stresin oluşumuna neden olan hiperglisemik durumlardan birkaç mekanizmayı bloke ederek etki gösterirler.

Volkovova K ve arkadaşları pioglitazonun diyabetik ratlarda böbrekte GSH-Px aktivitesini %60 oranında artırdığını, katalaz ve SOD aktivitesinde değişiklik olmadığını bildirmişlerdir (Deliloglu-Gürhan, 2006). Son yıllarda TZD'in ve özellikle pioglitazonun potent glikasyon ve protein çapraz bağlanmasının inhibitörü olan güçlü antioksidan olduğu Rahbar S ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada gösterilmiştir (Brazelton, Rossi, Keshet, Blau, 1997).

Hücre ölümünün nekrozamı yoksa apoptozamı bağlı olduğunun ilişkilendirilmesi için TUNEL immunoreaktivitesine bakıldı. Primer antikorun yerine PBS kullanılan negatif kontrollerde boyama saptanmaz iken TUNEL pozitif immunoreaktivitenin anlamlı bir artış olmadığı görüldü.

Çalışmamızda hücre ölümleri morfometrik olarak değerlendirilip LA toksik etkisi hem hücre ölümü hem de apoptoz ile gösterildi. İlimli toksik etki konsantrasyonlarında nörit inhibisyonu ile saptanan toksisite bu düzeyde oluşan

değişiklikler için yararlı bir yöntem olarak kullanıldı. Ancak burada da apoptozis denilen mekanizmanın varlığı bir sorun olarak ortaya çıkar. Bu hücreler canlı gibi gözükseler de en kısa zamanda ölecek veya intihar edecek hücrelerdir. Bu hücrelerin membranları henüz bozulmadığı için bir canlı hücreymiş gibi izlenim verebilirler. Burada yapılacak iş gene transfüzyon özellikle en ile hücre organellerini ve özellikle nükleusun kondansasyonunu aynı zamanda TUNEL dediğimiz terminal deoksinükleotin transferaz ile üretilen 1, 25 trifosfat biotidin bağlanması şeklindeki bir boyayla da bu hücrelerin apoptotik olduğu gösterilebilir. Apoptozis bir hücre ölüm yöntemi olarak DNA bantlaşması, membran basamağı şeklinde görülen otoforos sonrasında görüntü ve artmış hücresel kaspas aktivitesi şeklinde tanımlanmaktadır.

PG kullanan kişilerde plazma konsantrasyonu ölçüldüğünde 5-10 uM konsantrasyonda plazma düzeyleri ölçülmüştü. Kullandığımız konsantrasyonlarda plazma konsantrasyonuna yakındır (Xue et al., 2003)

Gene hücre kültüründe hücre ölümüyle ilgili bir hatalı parametre de hücrelerin hala çoğalmaya devam edebiliyor olmasından kaynaklanan hücre sayısının karıştırılabilmesidir. Bu durumda da BRDU şeklindeki boyamayla bu hücrelerin proliferasyona girmediklerinin gösterilmesi gerekir varsa bu sayısal hesaptan düşülmesi şeklinde anlaşılmaktadır. Çalışmamızda kültür ortamında hücre çoğalması ve farklılaşmasında her hangi bir problemin oluşmaması nedeniyle minimal toksik etkiye bağlı apoptosis mekanizmasının varlığı ayrıca nörit inhibisyonu şeklinde ortaya kondu.

Hücre kültüründe bir diğer eksik olan ortam da normal invivo şartlarda nöronun astrositler ve oligodendrositlerden aldığı desteği yitirmiş olmasıdır. Özellikle invivo şartlarda oluşturulan iskemi gibi hasarlarda bu destekle beraberinde önemli değişiklikler oluşturulmaktadır. Aksonlar kesinlikle aksiyon potansiyelini iletme anlamında nöronun en önemli fonksiyon gören ünitesidir ve aksonlar buldukları somadan çok uzun mesafelere kadar buldukları farklı extrasellüler faktörler etkisi altında uzatma yapabilmektedir. Özellikle aksonların lokal olarak ürettikleri ATP bir



enerji substratı olarak somadan almadıkları bir faktördür. Aksonun hasar görmesiyle ilgili olarak hem trofizim hedef bağımlı faktörleri beyindeki asıl merkezinden alamaması hem de metabolizmasının bozulması şeklinde ortaya konmaktadır. Örneğin aksonların kesilmesinden sonra intrasellüler Ca miktarının oldukça arttığı gözlenmiştir. Ancak eğer aksonları mekanik olarak ayrılmış olan nöronlar kültür ortamında aynı şekilde bırakılırlarsa hala aksone bağlı nöronun tekrardan akson üretmesi şeklinde bir olumlu etkisinin görüldüğü de saptanmıştır. Bu tür çevresel desteğin olmaması sonucunda oluşan toksik etkinin açıklanmasında bu etkinin de dikkate alınması gerekir.

Kültür şartlarında özellikle NMDA eksitotoksitesine karşı aksonların oldukça dirençli olduğu gösterilmiş ancak ilaç uygulamaları sırasında hızlı bir hücresel şişmenin ve nöral dendritlerdeki spine (çıkıntı) yapma karakteristiğinin kaybolduğu saptanmıştır. Aksonun myelinli olup olmaması da toksik hasarın belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Örneğin myelinli olmayan aksonlar eksotoksik hasara dirençli olmasına karşın, özellikle dışardan destek aldıkları trofik faktörlere bağlı toksik etkiye dirençsizdirler. Burada ayrımı sağlayan voltaj bağımlı Na kanallarının farklı olmasından kaynaklanan toksik etkinin de farklı gelişmesi şeklinde açıklanmıştır. Bu tür farklı toksik etkiye bir başka örnek de NMDA'nın verilmesi sonrasında nöronal dendritlerin şişmesi, kalınlaşması ve spine çıkıntılarını kaybetmesi görülürken, Na kanalı aktivatörü veratridin verildiğinde hem akson hem dendritin beraber hasar gördüğü saptanmıştır.

Toksik etkiye bağlı aksonal hasarda hem oksidatif stresin hem yükselmiş ekstrasellüler glutamatın etkili olduğu ve serbest radikallerin bu hasarı yönlendirdiği gösterilmiş ancak mekanizmaları henüz tam olarak anlaşılmamıştır. Örneğin düşük glutatyon içeriğine rağmen yüksek demir bulunması da benzeri bir toksik etki yaratmaktadır. Glutamat toksisitesinde toksik etkinin glutamat reseptörleriyle tek başına iletilmediği, aynı zamanda glutamat-sistin değişim mekanizmasının da aktive olduğunu göstermişlerdir. Bu değişim mekanizması klorid bağımlı olup enerjiden bağımsızdır ve doğal olarak intrasellüler ortama fazla miktarda sistinin gelmesinin sonucu olarak fazla miktarda glutamat oluşturmaktadır. Normal koşullarda sistin

glutatyona dönerek potent bir serbest radikal ortaya çıkartmaktadır. Ancak patolojik mekanizmalarda bu sistinin uzaklaştırılması hücrenin serbest radikallerle mücadele etmesini engellemekte hatta bazal düzeydeki bir serbest radikal üretiminin hücreyi sistin uzaklaştığı takdirde öldürdüğü bilinmektedir. Hem yaşlanmaya hem de toksik etkiye bağlı olabilecek mekanizmalardan bir tanesi de Ca kanallarıyla ilgili oluşan hasardır. Hipokampusdeki nöronlarda yapılan çalışmada kültür ortamında Ca kanal fonksiyonları arttırılan nöronların çok daha uzun süre yaşadıkları gösterilmiştir. Nörotoksik etkinin gösterilmesinde invitro yöntemlerin yararı ile ilgili yapılan bir çalışmada da risk faktörlerinin birçok gruba bölünebileceği, bunlardan zararlı olabilenlerin, doz bağımlı olabilenlerin, toksik etkiye maruz kalma yöntemlerinin ve riskin tanımlanması yöntemleri şeklinde ayrılabilir.

Bir başka çalışmada kültür yöntemlerin yararlarıyla limitasyonları karşılaştırılmıştır. Sinir sistemindeki hücrelerin birçok fonksiyonunun olması ve kompleksliği sebebiyle bizim de nöronlar hakkında özellikle biyokimyasal süreçlerle ilgili bilgilerimizin kısıtlı olması nedeniyle hangi in vitro sistemin invivo uygulanan ilaçlara karşı bir paralellik gösterebileceği ve hangisinin seçilmesi gerektiği gerçekten de zor bir sorudur. Bu anlamda kültür ortamı bize üç boyutlu ortamından uzaklaştırılmış, kontrol edilebilir bir sistem içersinde toksik etkinin mekanizmasını, hangi hücreleri hedef olarak alabildiği, hücrenin hangi organellerine karşı etki gösterdiği ve de bu toksik etkiye bağlı hücresel değişiklikleri izlememizi sağlaması açısından oldukça yararlıdır. Şu ana kadar toksik etki gösterdiği bilinen komponentlerle yapılmış klasik kültür çalışmalarıyla, henüz toksisitesi bilinmeyen ilaçların karşılaştırılması oldukça uygun bir yoldur. Ancak eğer bilmediğimiz bir başka yolla toksik etki gösterebilecek olan bir toksikanta sahipsek bu durumda yeni bir yol bulup bu yolu tanımlayıp ondan sonra ona karşı nörotoksik etkinin varlığının araştırılmasına başlanmalıdır. Bu şekilde birçok deney hayvanı harcayarak yapılabilecek özellikle temel çalışmalar kısmı kültür ortamında çok daha basit bir şekilde halledilebilmekte ondan sonra in vivo çalışmalara geçilerek üç boyutlu ortamda toksik etkinin neler yapabileceği saptanabilmektedir.

Nörotoksik etkinin potansiyel hedeflerini incelemek açısından sinir sisteminde iki tip hücre vardır. Bir tanesi nöron bir tanesi de nöroglial hücreler ki bunlar; oligodendrositler, astrositler, mikroglialar ve periferik sinir sistemindeki schwann hücreleridir. Nöronlar genellikle diğer hücelere benzemekle birlikte en önemli farkları akson ve dendrit oluşturmalarıdır. Akson ve dendritin önemli bir görevi diğer nöronlarla ve nöronal popülasyonla ilişki kurmaktır. Dendritlerin görevi ise oldukça uzama yetenekleri sayesinde hücre vücudunun ilişki kurabileceği yüzeyi arttırmak ve mümkün olabildiğince fazla miktarda veri girişini sağlamaktır. Aksonal uzantılar yüzey alanları hücrenin somasının çapından kat kat fazla olup bu şekilde sinir impulsunun iletilmesi terminal sinapslarda gerçekleşen ilişkiyle diğer hücrelerle kontakt olabilir. Burada nöronun somasının yapmaya çalıştığı iş bu tür bir organizasyon için gerekli olan yapısal proteinleri veya lipidleri üreterek membranın bu tür bir fonksiyon için uygun hale gelmesini sağlamaktır.

Bunun dışında gliyal hücrelerin uzantılarından oluşturulan bir başka membranla da aksonların myelin kılıfı kazanması sağlanmaktadır. SSS'de oligodendrositlerin yaptığı bu görevi periferik sinir sisteminde schwann hücreleri sağlamaktadır. Aynı şekilde nöronların nükleusları da akson fibrillerinden aldığı bilgiyi değerlendirmek üzere meydana gelmiş ve farklı sınıflara bölünmüştür. İn vivo şartlarda oluşan bir hasarın etkisi dejenerasyona sebebiyet vermesi ve bunu da perikaryonun veya sinaptik hedefin ortadan kaybolması ve trofik faktörlerin uzaklaştırılması şeklinde gerçekleştirilmektedir. Dejeneratif süreç sinir hücresinde çok kısa bir sürede gerçekleştirilebilir veya çok uzun bir süre alabilir. Bu farklılık da mekanizmadan kaynaklanmaktadır. Hücre hücre kontağı hem nöronlar arasında hem de nöron ve gliya arasında, hem farklılaşmanın hem de gliyal yönlendirilmiş migrasyonun gerçekleşmesi amacıyla işlev görmektedir.

Özellikle primer kültürde olmak üzere hücre yaşamının kültür ortamında kısa süreli kalması uzun süreli etkilerin de saklanmasına sebebiyet verir. Buna verilebilecek en önemli örnek gecikmiş olan nöron ölümüdür. Yine kültür ortamı toksik doz eğrisinin çizilmesi önemli bir problemdir. Kültürde çıplak olan hücelere verilen dozla, invivo şartlarda, üç boyutlu ortamdaki hücelere verilen dozlar

arasında farklılıklar vardır. Bunun da ayarlanması önemli bir faktördür. Ayrıca kültür ortamına eklenen medyum, proteinler ve kimyasallar gibi faktörlere de dikkat edilmesi gerekir. Bunların çözünebilirlikleri, uçabilirlikleri, pH'ları, medyumla olan etkileşimleri osmolaliteyi mutlaka göz önünde bulundurulması gereken faktörlerdir (Erices, Conget, Minguell, 2000). Özellikle çözünebilir ortamda verilen kimyasallar için DMSO veya etanol gibi oldukça düşük konsantrasyonlarda hazırlanmış çözdürücüler kullanılmalıdır. Bazen albümin, lipid proteinler veya spesifik taşıyıcılar gibi taşıyıcılarla da bu çözünebilirlik problemi giderilmeye çalışılmıştır. Yine kültür ortamında kültür medyasının uzun süreli kullanılmaması medyada oluşabilecek pH değişikliklerine ve osmolaliteye bağlı medyumun direkt toksik etkisi veya hücrelerin metabolizma sonucu ortaya çıkardıkları ürünlerin birikimine bağlı olarak metabolizma ürünlerinin toksisitesi önemli faktör olabilir (Deacon, Dinsmore, Constantini, 1998).

Toksikantların toksikokinetik etkisi mutlaka bilinmelidir. Bu etki absorpsiyondan, dağılımdan, metabolizmadan ve dışa atılmadan oluşan bir süreçtir. Bu süreçte alındığı andan itibaren kana geçen miktarın ölçülmesi ve bu şekilde toksikokinetik yapısının belirlenmesi kültür ortamında kullanırken dozun belirlenmesinde önemli rol oynar. Atılım açısından bir diğer problem vücutta bulunan enzimlerin ve enzimatik süreçlerin verilmiş olan toksik anta karşı gösterdikleri etkilerin dikkate alınması gereğidir (Jeppesen, Gaist, Smith, Sindrup, 1999). Kültür ortamında bu şartlar sağlanmadığı için *invivo* ve *invitro* arasında böyle bir farklılık oluşabilir. Birçok faktörün de, kültür ortamında direkt toksik etki göstermesine rağmen, vücuda alındığında aktif hale geçmesi gerekir. Bu metabolik aktivasyonun yapılabilmesini de dikkate almak önemlidir. Örneğin metil N-bütülketon bir metabolize üründür ve heksamediondan oluşmuştur. Özellikle de sinir sisteminde psödobiyotik inaktivasyon özellikle nöral dokuda görülmektedir ve öncelikle de non-normal hücreler tarafından yapılmaktadır. Eğer nörotoksik potansiyeli olan bir kimyasal *invivo* süreçte metabolik parametrelerle ilgili işlemlere bağlıysa ki bunlar biyotransformasyon, lipid aköz parti bölümlenme ve dağılım, o durumda toksik etkinin tanımlanmasında ciddi problemler var demektir. Metabolik aktif sistem içersinde rol alan enzimler kültür ortamında takit edilseler bile,

polimorfizm denilen probleme dikkat etmek gerekir. Çünkü bu durumda enzimin protein yapısında oluşabilen değişiklikler gene toksik etkinin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Örneğin invivo şartlarda sinir sisteminde gliyal hücrelerin bir toksikantın toksik etki gösterebilmesi için metabolitlerini oluşturmasında mutlaka gerekli oldukları gösterilmiştir. VGMPTP adlı toksikan MPP adlı metabolik artık ürününe dönerek glutamata glutamine çevirmekte ve ağır metal birikimine neden olarak da nörotoksik etki göstermektedir.

Toksik etkiye neden olan kimyasalın uygulanacağı süre de çok önemli bir parametredir. Bu süre bazı moleküllerde (kimyasallarda) oldukça gecikebilir. Bunlara bir örnek bizmuttur. Bizmut hem invivo hem invitro şartlarda akut olarak etki göstermezken, uzatılmış bekletme süresinde toksik etkisini ortaya çıkartmaktadır. Kısa sürede çıkmaması toksik olmadığı anlamına gelmez. Aynı zamanda kültürde yapılan toksisite testlerinde nöronun kültürdeki yaşam süresi, farklılaşma periyodu, çoğalma periyodu da dikkatle gözlenmeli ve mutlaka bilinmelidir. Çünkü matüre olmamış ve hala çoğalmakta ve gelişmekte olan hücreler toksik etkiden direkt olarak etkilenmeyebilirken, matüre olmuş hatta yaşlanmış hücreler hepsi birarada buldukları için toksik etkiyi daha az gösteriyor olabilirler. Kültür ortamında özellikle üç boyutlu ortamdan çıkarılarak alınma ifadesi de birçok faktörü içermektedir. Örneğin invivo şartlarda bir nöroendokrin sistem kontrolü vardır. Kanlanmayla gelen direkt beslenme faktörlerinin ve yanyana buldukları komşularla kurdukları hücre hücre kontağının etkileri vardır.

Bir başka önemli faktör de özellikle nöronal farklılaşmanın sağlanması için kullanılan kültür ortamına bir halı gibi yayılan substratların ve bu substratlarla medyuma eklenmiş olan serumun ilişkisidir. Bu etkilenen substratların matriks molekülü gibi davranmaları sonucu ve serumdan gelen büyüme faktörlerinin etkisiyle hücreler farklı şekillerde proliferasyondan çıkarak farklılaşmaya yönlenmekte ve burada heterojen bir kültür ortamının oluşmasına neden olmaktadır. Bu da doğal olarak toksik etkinin gerçekleşmesinde farklılık oluşturmaktadır. Toksik etkinin en önemli mekanizmalarından biri aşırı miktarda salınmış olan nörotransmitter glutamattır. Glutamatın eksitotoksitesisi ise bir aracı olan postsinaptik

N-metil D-aspartat (NMDA) denilen glutamat reseptörleri ile gerçekleştirilmektedir. Bu reseptörlere sahip olan hücreler eksitotoksisiteye çok açık olup uzamış Na ve Ca akışına neden olurlar. Bu akış da hücre içersinde apopitozisten ölüme kadar varabilen bir dizi kimyasal işlemi başlatır. Sadece glutamat değil, glutamat benzeri analog maddeler (ör; dumoikasit) benzer ekstrasitotoksik hasarlar oluşturmaktadır. Hatta bunlardan *invivo* olanına örnek; insanda amneziye neden olan hipokampüste ve neokortikal nöronlarda oluşan hasardır (Morell, Toews, Wagner, Goodrum, 1994). Bu reseptörleri içermeyen hücelere vektör transfeksiyon yoluyla bu reseptörler kazandırıldığında, daha önceden toksisiteye maruz kalmayan hücelerin artık kalabildiği gösterilmiştir.

Glutamata bağı toksik etki tek başına bir mekanizma değildir. Örneğin iyon kanallarına karşı oluşturulmuş insektisitler de bir başka yolu kullanmaktadırlar. Ancak bu tür pestisitlerle yapılan nörotoksik etkinin daha çok sitotoksik olduğu düşünülmektedir. Ancak her durumda bir membran üzerindeki Na akışında artış olduğu ve buna bağı nörotoksik etkinin olduğu da düşünülmektedir. Bir diğerk mekanizma da gecikmiş olarak ortaya çıkan nörotoksik potansiyelin gösterildiği bazı spesifik organofosfor pestisitlerdir ve endüstrideki bu kimyasallarda nöropati target esteraz (NTE) denilen bir enzimin ölçülmesi ile gösterilmektedir. Bu tür ilişki göstermektedir ki bioaktivasyon önemli bir rol oynamaktadır. Örneğin sülfür formundayken toksik olmayan bir madde bioaktivasyonla ozon forma döndüğünde ciddi olarak nörotoksik etki göstermektedir.

Hücelerin alındıkları kültür ortamında üzerine yapıştıkları yüzey şartları da bir diğerk önemli faktördür. Genellikle kullanılan kollajen, fibronektin, polizin, poliornitin ve oldukça sülfonatlı ve en temel yüzey olan doku kültürü plastikleri bu tür substratlardandır. Doku kültür plastiği denilen substrat en temel olanı olup diğerk substratlarda hücrenin yüzeye yapışması için geliştirilmiş ve hücrenin onları kullanarak çoğalabildiği diğerk yüzeylerdir. Bazı hücelere kültür ortamındaki yüzeye yapışmaya bağımlı iken ve yapışmadığı takdirde ölürken, bir kısım hücelerin ortama yapışmadığında da yaşadığı ve agregatlar oluşturduğu görülmüştür. Örneğin polilizinli kültür kaplarının kullanılması hücre-substratum adezyonunun artırılması

için gerekmede ve özellikle nöron kültürlerinde kullanılmaktadır. Örneğin polilizinle yapılan çalışmalarda polilizinin kendisinin de hücre yapısını, morfolojisini ve metabolizmasını etkilediği gösterilmiş, hatta hücrenin bu yüzeyle etkileşmesi sonucunda c-AMP sentezlediği ve normal iyon kanallarının fonksiyonuyla da etkileştiği gösterilmiştir. O yüzden de elektrofizyolojik deneylerde bu substrattan kaçınılmaktadır.

Reaktif değişiklikler olarak adlandırılan ve toksik etki sonucu ortaya çıkan, örneğin gliozisin incelenmesi gibi, GFAP'ye bakılarak veya MTT kullanılması gibi hem mitokondriyal bozukluğun gösterilmesi veya stoplazmik redüksiyon kapasitesinin azalması gibi faktörler de kullanılabilir. Tüm bunların sonucu olarak toksik etkinin oluştuğunun gösterilmesinden sonra alınan verinin değerlendirilmesi önemli olmaktadır. Bu verinin değerlendirilmesinde mutlaka oturmuş klasik bir yöntem seçilmeli, eğer yeni bir yöntem çıkarılacaksa da bunun optimizasyonunun değerlendirilmesi için detaylı çalışmalar yapılmalıdır.

## **5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER**

PG ile ilgili fazla miktarda yayın olmasına rağmen henüz nöroprotektif etkisini gösteren sonuçlara varılmamıştır. Günlük hayatımızda sıkça kullanılan ilaçların nörotoksik etkileri araştırmak, sıkça kullanılan bu ilaçların varsa nörotoksik etkilerini belirleyerek bu ilaçların nörotoksik etkisi olmayanlarla değiştirilerek olası zararlarını ve bunlara bağlı ortaya çıkabilecek iş gücü kayıplarını önlemektir. Bu yöntemi ile günlük yaşamımızda sıkça kullandığımız diğer kimyasal molekülerin nöronlar üzerine olası toksik etkileri araştırmak ve insan sağlığına zararlı olabilecek

molekülleri kullanımdan kaldırılmak veya nörotoksik olduğunu düşündüğümüz molekülleri uygulayacağımız yöntemle daha kullanıma girmeden taranarak olası zararı önlemektir.

Klorpirofos gibi moleküllerin nörotoksik etkilerin ortaya çıkarılması aksonal dejenerasyon ve nöropati gibi hastalıkların önlenmesine ve buna bağlı olası iş gücü kayıplarını azaltarak ekonomiye önemli bir katkı sağlayacaktır. Bu moleküllerin etkisinin PG ile önlenebileceği ve toksik maddelerin santral sinir sisteminde oluşturduğu hasarının niteliği de araştırılacağı için oluşmuş hasarın tedavisi ile hasarın gelişmesinin önlenmesi için yardımcı tedavilerin bulunması için de bir çıkış kaynağı olabilecektir.



## 6. KAYNAKLAR

Abdulla E.M., Campbell I.C.,. Use of neurite outgrowth as an in vitro method of assessing neurotoxicity. *Ann NY Acad Sci*, 679:276–279, 1999.

Aberg G, Dhuner KG, Sydnese G. 1977 Nov Studies on the duration of lokal anaesthesia: structure/activity relationships in a series of homologous lokal anaesthetics. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*; 41 (5): 432-43

Abraham LK, Demir R (Çevirmen)Histoloji ve hücre biyolojisi ile patolojiye giriş, Palme yayıncılık, Ankara, 200.

Agnew WF, McCreery DB, Yuen TG, Bullara LA. 1990 Jul Local anaesthetic block protects against electrically-induced damage in peripheral nerve. *J Biomed Eng*; 12 (4): 301-8.

Ahmed FA, Hegazy K, Chaudhary P, Sharma SC. Neuroprotective effect of alpha(2) agonist (brimonidine) on adult rat retinal ganglion cells after increased intraocular pressure. *Brain Res*. 2001 Sep 21;913(2):133-9.

Ahmed FA, Ingoglia NA, Sharma SC. Axon resealing following transection takes longer in central axons than in peripheral axons: implications for axonal regeneration. *Exp Neurol*. 2001 Feb;167(2):451-5

Akgür FM, Kılınç K, Aktuğ T, Olguner M. The effect of allopurinol pretreatment before detorting testicular torsion. *J Urol* 1994, 151: 171

Akgür FM, Kılınç K, Tanyel FC, et al: Ipsilateral and contralateral testicular biochemical acute changes after unilateral testicular torsion and detorsion. *Urology* 1994, 44: 413- 41

Allan, D. J., Harmon, B. V. & Kerr, J. F. R. Cell death in spermatogenesis. In: *Perspec Mamm Cell death* (ed. C. S. Potten),pp. Oxford University Press, London, 1987, 289–25

Arends M., Wyllie A.H., Apoptosis: mekanism and roles in pathology, *Int. Rev. Exp. Pathol.* 1991, 32: 223- 25

Arıkan E, Nurşen S, Firdevs G, Kenser E. 1992 Mart Çeşitli adrenalinsiz lokal anesteziyelerin periferik sinirlere etkisi ve bu etkide Verapamilin rolü. I.Histoloji-Embriyoloji Sempozyumu Bildiri ÖzetleriArthur DS, McNico.

Arıncı K, Elhan A *Anatomi Güneş Kitabevi, Ankara 1995,417- 42*

Arıdoğan IA, Bayazıt Y, Yaman M, Ersöz C, Doran S. Comparison of fine-needle aspiration and open biopsy of testis in sperm retrieval and histopathologic diagnosis. *Andrologia.* 2003 Apr;35(2):121-5

Ashkenazi A., Dixit V. M., Death receptors: Signaling and modulation, *Science.* 1998, 281:1305- 130

Atlasz T, Babai N, Reglodi D, Kiss P, Tamas A, Bari F, Domoki F, Gabriel R. Diazoxide is protective in the rat retina against ischemic injury induced by bilateral carotid occlusion and glutamate-induced degeneration. *Neurotox Res.* 2007 Sep;12(2):105-11.

Aubin JE, Osteoprogenitor cell frequency in rat bone marrow stromal populations: role for heterotypic cell-cell interactions in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 1999 Mar 1;72(3):396-410.

Ayşoğlu E. Apoptoz. *T Klin Tıp Bilimleri Dergisi.* 2001, 21: 57- 6.

Bacis Pathology. Vinay Kumar. MD. (Degenerasyon ve regenerasyon Sayfa: 732) Ramzı S. Cotran, MD. Fifth Edition.

Backes JM, Howard PA. Association of HMG-CoA reductase inhibitors with neuropathy. *Ann Pharmacother.* 2003, 37(2):274-8.

Balakumran A, Champbell G A, Maslen M T. Calcium channel blockers induce thymic apoptosis in vivo in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996,139: 122- 12

Barbiero JK, Santiago RM, Persike DS, da Silva Fernandes MJ, Tonin FS, da Cunha C, Lucio Boschen S, Lima MM, Vital MA. *Behav Brain Res.* 2014 Nov 1;274:390-9. 2014 Aug 13

Barsa J, Batra M, Fink BR, Sumi SM. 1982 A comparative in vivo study of lokal nörotoxicity of lidocaine, bupivacaine, 2-chloroprocaine and a mixture of 2-chloroprocaine and bupivacaine. *Anesth Analg;* 61: 961- 967.

Barutçu T, ligasyon ve torsiyon iskemeileri arasındaki farkın apoptosis ve oksidatif stres ile ilişkisinin histolojik incelemesi, Tez, Manisa, 2008

Baulieu EE, Schumacher M. 1997 Apr Neurosteroids, with special reference to the effect of progesterone on myelination in peripheral nerves. *Mult Scler;* 3 (2): 105-12.

Benoit P, Changeux JP. 1978 Jun 23 Consequences of blocking the nerve with a local anaesthetic on the evolution of multiinnervation at the regenerating nöromuscular junction of the rat. *Brain Res;* 149 (1): 89-96.

Benzon HT, Kim C, Benzon HP, Silverstein ME, Jericho B, Prillaman K, Buenaventura R. 1997 Sep Correlation between evoked motor response of the siyatik nerve and sensory blockade. *Anesthesiology;* 87 (3): 547-52.

Bergh A, Damber JE, Hjertkvist M. Human chorionic gonadotrophin-induced testicular inflammation may be related to increased sensitivity to interleukin- 1 *Int J Androl.* 1996 Aug,19(4):229- 36

Bergh A., Ola Collin ve Erik Lissbrant. Effects of Acute Graded Reductions in Testicular Blood Flow on Testicular Morphology in the Adult Rat. *Biology Of Reproduction* 2001;64, 13–20

Berta P, Hawkins JR, Sinclair AH, Taylor A, Griffiths BL, Goodfellow PN, Fellous M. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature*. 1990 No

Berthold CH, Fabricius C, Rydmark M, Andersen B. 1993 Nov Axoplasmic organelles at Nodes of Ranvier. I. Occurrence and distribution in large myelinated spinal root axons of the adult cat. *J Neurocytol*; 22 (11): 925-40.

Beumer T L, Roepers L H, Gademan S U, Lock M T W, Tycho K B, Kal H B, Rooij D G. Apoptosis Regulation in the testis: Involvement of Bcl- 2 Family members. *Mol Repr Development*. 2000;56: 353- 35

Biochem. Biophys. Res. Commun. 2003, 304: 437- 444 semantics. *Hum Genet*. 1992 Jul;89(5):467-79. seminiferous epithelium are involved with internalization of adhesion junctions. *Biol Reprod*. 2004 Aug;71(2):548-59.

Bischoff A. 1973 Dec 11 Ultrastructural pathology of the peripheral nervous system. *Z Neurol*; 205 (4): 257-74.

Bjorklund A, Lindvall O. Cell replacement therapy for central nervous system disorders. *Nat Neurosci* 2000 3:537.

Bjornson CRR, Rietze RL, Reynolds BA, et al. Turing brain into blood: A hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 1999 283:534

Blanco-Rodriguez J, Garcia Martinez C. Apoptosis pattern elicited by several apoptogenic agents on the seminiferous epithelium of the adult rat testis. *J Androl*. 1998;19:487- 497

Blunt RJ, Vrbova G. 1975 Jun 26 The use of lokal anaesthetics to produce prolonged motor nerve block in the study of denervation hypersensitivity. *Pflugers Arch*; 357 (3-4): 187-99.

Boekelheide K, Fleming SL, Johnson KJ, Patel SR, Schoenfeld HA. Role of Sertoli cells in injury-associated testicular germ cell apoptosis. *Proc Soc Exp Biol Med*. 200

Borg N, Holland M. The effect of glycosaminoglycans on rat gametes in vitro and the associated signal pathway. *Reproduction*. 2008 Mar;135(3):311.

Bottenstein, JE, G Sato. *Cell Culture and the Neurosciences*. New York: Plenum Press, 1985.

Brat, DJ, S Brimijoin. A paradigm for examing toxicant effects on variability, structure, and axonal transport of neurons in culture. *Mol Neurobiol*, 6:125-136, 1992.

Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM, From marrow to brain: Expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000 290:1775  
Mc Kay R. Stem cells in the central nervous system. *Science* 1997 276:

Bridenbaugh LD. 1969 Regional anesthesia for surgery of the extremities. *Clin Anesth*; 2: 193-215.

Bruguerolle B, Attolini L, Lorec AM, Gantenbein M. 1995 May Kinetics of bupivacaine after clonidine pretreatment in mice. *Can J Anaesth*; 42 (5 Pt 1): 434-7.

Bruhwyler J, Chleide E, Liegeois JF, Carreer F: Nitric oxide: A new messenger in the brain; *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 1993, Vol 17: 373- 384

Bryniarski K, Szczepanik M, Ptak M, Ptak W. Modulation of testicular macrophage activity by collagenase. *Folia Histochem Cytobiol.* 2005;43(1):37-41.

Buchi J, Kestermann H, Perlia X. 1974 Apr Relation between the physical-chemical properties, the chemical reactivity and the lokal anesthetic action of 4-alkylbenzoic acid diethylamino ethyl ester (Paralkains).30]. [Article in German] *Arzneimittelforschung*; 24 (4): 485-93.

Butterworth JF 4th, Moran JR, Whitesides GM, Strichartz GR. 1987 Aug Limited nerve impulse blockade by "leashed" lokal anesthetics. *J Med Chem*; 30 (8): 1295-302

Caesar R, Kaplan G. Incidence of the bell clapper deformity in an autopsy series. *Urology* 1994, 44: 114

Carreau S, Bois C, Zanatta L, Silva FR, Bouraima-Lelong H, Delalande C. Estrogen signaling in testicular cells. *Life Sci.* 2011 Jun 15.

Cavino,BG. 1971 Comparative clinical pharmacology of lokal anesthetic agents. *Anesthesiol*; 35: 158.

Chaki S. P. , Ghosh M. Misro M. Simultaneous increase in germ cell apoptosis and oxidative stress under acute unilateral testicular ischaemia in rats, *international journal of andrology*, 2003,26:319–328

Chanh PH, Tuyen HV, Phuong VV, Pinhas H, Buu-Hoi NP. 1971 Dec A powerful lokal anesthetic: 2-N-(beta-(4-propionyl-phenoxy)ethyl)amino-1-phenylpropane. [Article in French] *Arch Int Pharmacodyn Ther*; 194 (2): 270-84.

Chen C, Ouyang W, Grigura V, Zhou Q, Carnes K, Lim H, Zhao GQ, Arber S, Kurpios N, Murphy TL, Cheng AM, Hassell JA, Chandrashekar V, Hofmann MC,

Hess RA, Murphy KM. ERM is required for transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche. *Nature*. 2005 Aug 18;436(7053):1030-4.

Chen CJ, Ou YC, Liao SL, Chen WY, Chen SY, Wu CW, Wang CC, Wang WY, Huang YS, Hsu SH. Transplantation of bone marrow stromal cells for peripheral nerve repair. *Exp Neurol*. 2007 Mar;204(1):443-53.

Chen TL. Inhibition of growth and differentiation of osteoprogenitors in mouse bone marrow stromal cell cultures by increased donor age and glucocorticoid treatment. *Bone*. 2004 Jul;35(1):83-95. Erratum in: *Bone*. 2006 Apr;38(4):604.

Chiarini-Garcia H, Raymer AM, Russell LD. Non-random distribution of spermatogonia in rats: evidence of niches in the seminiferous tubules. *Reproduction*. 2003 Nov;126(5):669-80.

Childs EW, Udopi KF, Wood JG, et al: In vivo visualization of reactive oxidants and leukocyte-endothelial adherence following hemorrhagic shock. *Shock* 2002, 8: 16-25

Choi RH, Birknes JK, Popitz-Bergez FA, Kissin I, Strichartz GR. 1997. Pharmacokinetic nature of tachyphylaxis to lidocaine: peripheral nerve blocks and infiltration anesthesia in rats. *Life Sci*; 61 (12): PL 177-84.

Cippitelli A, Domi E, Ubaldi M, Douglas JC, Li HW, Demopoulos G, Gaitanaris G, Roberto M, Drew PD, Kane CJM, Ciccocioppo R. *Brain Behav Immun*. Protection against alcohol-induced neuronal and cognitive damage by the PPAR $\gamma$  receptor agonist pioglitazone. 2017 Aug;64:320-329. 2017 Feb 3.

Clark BR, Keating A. Biology of bone marrow stroma. *Ann N Y Acad Sci*. 1995 Dec 29; 770: 70-8.

Clarke DL, Johnsson CB, Wilberts J, et al. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 2000 288:1660

Cohen J J. Apoptosis. Immunol Today 1993,14: 126- 130

Cohen J J. Apoptosis. Immunol Today 1993,14: 126- 130

Cohen J J. Apoptosis: The physiological pathway of cell death. Hosp Pract 1993,15: 35- 43

Cohen J J. Apoptosis: The physiological pathway of cell death. Hosp Pract 1993,15: 35- 43

Colburn RW, DeLeo JA, Rickman AJ, Yeager MP, Kwon P, Hickey WF. 1997 Nov  
Dissociation of microglial activation and neuropathic pain behaviors following  
peripheral nerve injury in the rat. J Neuroimmunol; 79 (2): 163-75.

Cooper G. M. Cell signaling, In: The Cell: a molecular approach, ASM press, 2th,  
Washington D.C. 2000, 13, PP:523- 552

Corti S, Locatelli F, Donadoni C, Strazzer S, Salani S, Del Bo R, Caccialanza M,  
Bresolin N, Scarlato G, Comi GP. Neuroectodermal and microglial differentiation of  
bone marrow cells in the Mouse spinal cord and sensory ganglia. J Neurosci Res.  
2002 Dec 15;70(6):721-33.

Corti S, Locatelli F, Strazzer S, Guglieri M, Comi GP. Neuronal generation from  
somatic stem cells: current knowledge and perspectives. on the treatment of acquired  
and degenerative central nervous system disorders. Curr Gene Ther. 2003  
Jun;3(3):247-72.

Cosentino MJ, Nishida M, Rabinowitz R, Cockett AT. Histological changes  
occurring in the contralateral testes of prepubertal rats subjected to various durations  
of unilateral spermatic cord torsion. J Urol 1985; 133: 906.



Cosentino MJ, Nishida M, Rabinowitz R, Cockett AT. Histopathology of prepubertal rat testes subjected to various durations of spermatic cord torsion J Androl. Jan-Feb 1986,7(1):23- 31

Covas DT, Siufi JL, Silva AR, Orellana MD. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells Braz J Med Biol Res. 2003 Sep;36(9):1179-83. Epub 2003 Aug 19.

Covino BG. 1972 Local anesthesia. N.Engl. J. Med; 286: 975-1035.

Covino BG. 1978 Systemic toxicity of local anesthetic agents. Anesth. Analg; 5: 387.

Cravioto H 1965 Studies on the normal ultrastructure of peripheral nerve: axis cylinders, Schwann cells and myelin. Bull Los Angeles Neurol Soc Dec;30(4):169-90.

Cravioto H 1965 The role of Schwann cells in the development of human peripheral nerves. An electron microscopic study. J Ultrastruct Res Jun;12(5):634-51.

Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death, Biochem. J. 1999, 341:233- 249

Cummings M C, Winterford C M, Walker N I. Apoptosis. Am J Surg Pathol 1997, 21: 88- 101

Curtis BM, Scurlock JE. 1981 Apr The mechanism of action of local anesthesia by tetraethylammonium derivatives. Anesthesiology; 54 (4): 270-7.

Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant Therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. Pharmacol Rev 2001, 53: 135

Damber JE, Bergh A. Testicular microcirculation a forgotten essential in andrology? [editorial]. *Int J Androl* 1992; 15: 285–292

Damestoy A, Perrard MH, Vigier M, Sabido O, Durand P. Transforming growth factor beta-1 decreases the yield of the second meiotic division of rat pachytene spermatocytes in vitro. *Reprod Biol Endocrinol*. 2005 Jun 7; 3: 22.

De Waegh SM, Brady ST. 1991 Sep Local control of axonal properties by Schwann cells: neurofilaments and axonal transport in homologous and heterologous nerve grafts. *J Neurosci Res*; 30 (1): 201-12.

Deacon T, Dinsmore J, Constantini LC, et al: Blastula-stage stem cells can differentiate into dopaminergic serotonergic neurons after transplantation. *Exper Neurol* 1998,149:28.

Deliloglu-Gürhan, S.I., Tuğlu, I., Vatansever, H. S., Özdal-Kurt, F., Ekren, H., Taylan, M., Sen. B.H. The Effect of Osteogenic Medium on the Adhesion of Rat Bone Marrow Stromal Cell (BMSC) to the Hydroxyapatite (HA). *Saudi Medical Journal*. Mar;27(3):305-11. 2006.

Deliloglu-Gürhan, S.I., Vatansever, H. S., Özdal-Kurt, F., Tuğlu. I., Characterization analysis of osteoblast derived from bone marrow in modified culture system. *Acta histochemica*. 108, 49-57. 2006.

Demir R. *Histolojik Boyama Teknikleri*, Palme yayıncılık, Ankara, 2009

Denecker G., Vercammen D., Declercq W., Vandenabeele P., Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors, *Cell Mol Life Sci*. 2001, 58: 356- 370

Deveraux Q.L., Roy N., Stennicke H.R., ve ark. IAPs block apoptotic events induced by caspase- 8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases, *EMBO J*. 1998, 17: 2215- 2223

Dief AE, Kamha ES, Baraka AM, Elshorbagy AK. Monosodium glutamate neurotoxicity increases beta amyloid in the rat hippocampus: a potential role for cyclic AMP protein kinase. *Neurotoxicology*. 2014 May;42:76-82. doi: 10.1016/j.neuro.2014.04.003.

Dive C. ve Hickman J.A., drug-targets interactions: only the first step in the commitment to a programmed cell death? *Br. J. Cancer*. 1991, 64: 192- 196

Dixon, A. D:Multiple Myelin Sheaths in Single Schwann Cells. *Nature*, 193: 1004, 1962

Dobrinski I, Hill JR, Herrid M, Vignarajan S, Davey R. Successful transplantation of bovine testicular cells to heterologous recipients. *Reproduction*. 2006 Oct;132(4):617-24.

Dobrinski I. Germ cell transplantation and testis tissue xenografting in domestic animals. *Anim Reprod Sci*. 2005 Oct;89(1-4):137-45.

Dobrinski I. Germ cell transplantation. *Semin Reprod Med*. 2005 Aug; 23 (3): 257 65.

Dong G, Peng L, Xu P, Ren LB, Wang CL, Aragon M, Zhou XD, Ye L. Expression of Wnt5a in tooth germs and the related signal transduction analysis. *Arch Oral Biol*. 2010 Feb;55(2):108-14.

Dong W, Hua J, Pan S, Yang C, Dou Z, Sidhu KS. Derivation of male germ cell-like lineage from human fetal bone marrow stem cells. *Reprod Biomed Online*. 2009 Jul;19 (1): 99-105.

Drusenheimer N, Nayernia K, Meinhardt A, Jung B, Arnold HH, Engel W. Overexpression of *lis1* in different stages of spermatogenesis does not result in an aberrant phenotype. *Cytogenet Genome Res*. 2011;134 (4): 269-82.

Drusenheimer N, Wulf G, Nolte J, Lee JH, Dev A, Dressel R, Gromoll J, Schmidtke J, Engel W, Nayernia K. Putative human male germ cells from bone marrow stem cells. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 2007;63:69-76.

Duchen LW, Scaravilli F. 1977 Jul The structure and composition of peripheral nerves and nerve roots In the Sprawling mouse. *J Anat*; 123 (3): 763-75.

Dyhre H, Lang M, Wallin R, Renck H. 1997 Nov The duration of action of bupivacaine, levobupivacaine, ropivacaine and pethidine in peripheral nerve block in the rat. *Acta Anaesthesiol Scand*; 41 (10): 1346-52.

E Walum, A Peterson. On the application of cultured neuroblastoma cells in chemical toxicity screening. *J Toxicol Environ Health*, 13:511-520, 1984.

Eglitis MA, Mezey E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brain of adult mice. *Proc Natl Acad Sci* 1997 94:4080.

Ehrich, M., L Correll, B Veronesi. Neuropathy target esterase inhibition by organophosphorus esters in human neuroblastoma cells. *Neurotoxicology*, 15(2):309-13, 1994.

Elmas C, Elmas Y, Gautschi P, Uehlinger P. 1992 Oct Combined siyatik 3-in-1 block. Application in lower limb orthopedic surgery. *Anaesthesist*; 41 (10): 639-43

Erengül A.Prof.Dr. 1985 Anesteziyoloji ve Reanimasyon. Nobel Tıp Kitap evi.

Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol.* 2000 Apr;109(1):235-42.

Eylar EH, Ishaque A, Szymanska I. 1980 Guillain-Barre syndrome and allergic neuritis: is the P2 protein a common denominator. *Prog Clin Biol Res*; 39: 337-56

Fabricius C, Berthold CH, Rydmark M. 1993 Nov Axoplasmic organelles at Nodes of Ranvier. II. Occurrence and distribution in large myelinated spinal cord axons of the adult cat. *J Neurocytol*; 22 (11): 941-54

Fink BR, Cairns AM; Differential slowing and block of conduction by lidocaine in individual afferent myelinated and unmyelinated axons. *Anesthesiology*; 60: 111-120.

Fitzgerald M, Woolf CJ, Gibson SJ, Mallaburn PS. 1984 Feb Alterations in the structure, function, and chemistry of C fibers following local application of vinblastine to the sciatic nerve of the rat. *J Neurosci*; 4 (2): 430-41.

Fletcher D. 1996 Postoperative analgesia after surgery of the knee. [Article in French] *Cah Anesthesiol*; 44 (3) :253-9.

Focking M, Besselmann M, Trapp T Statins potentiate caspase-3 activity in immortalized murine neurons. *Neurosci Lett*. 2004 Jan 23;355(1-2):41-4.

Friede RL, Samorajski T 1969 The clefs of Schmidt-Lantermann: a quantitative electron microscopic study of their structure in developing and adult sciatic nerves of the rat. *Anat Rec* Sep;165(1):89-101.

Friede RL, Samorajski T 1970 Axon caliber related to neurofilaments and microtubules in sciatic nerve fibers of rats and mice. *Anat Rec* Aug;167(4):379-87.

Friede RL, Samorajski T 1968 Myelin formation in the sciatic nerve of the rat. A quantitative electron microscopic, histochemical and radioautographic study. *J Neuropathol Exp Neurol* Oct;27(4):546-70.

Friede RL, Samorajski T. 1967 Jul Relation between the number of myelin lamellae and axon circumference in fibers of vagus and sciatic nerves of mice. *J Comp Neurol*; 130 (3): 223-31.

Friede RL, Samorajski T. 1970 Aug Axon caliber related to neurofilaments and microtubules in sciatic nerve fibers of rats and mice. *Anat Rec*; 167 (4): 379-87.

Friedlander M, Dorrell MI, Ritter MR, Marchetti V, Moreno SK, El-Kalay M, Bird AC, Banin E, Aguilar E. Progenitor cells and retinal angiogenesis. *Angiogenesis*. 2007;10(2):89-101.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The Obligatory Role of Endothelial Cells in the Relaxation of Arterial Smooth Muscle by Acetylcholine. *Nature*, 1980;288:373- 6

Gaist D, Garcia Rodriguez LA, Huerta C, Hallas J, Sindrup SH. Are users of lipid-lowering drugs at increased risk of peripheral neuropathy? *Eur J Clin Pharmacol*. 2001, 56(12):931-3.

Ganong WF; Çeviren: Doğan A. 1995 *Tıbbi Fizyoloji*. Barış kitapevi. İstanbul.

Gantenbein M, Abat C, Attolini L, Pisano P, Emperaire N, Bruguerolle B. 1997 Ketamine effects on bupivacaine lokal anaesthetic activity and pharmacokinetics of bupivacaine in mice. *Life Sci*; 61 (20): 2027-33.

Gantenbein M, Attolini L, Bruguerolle B. 1996 Aug Potassium channel agonists modify the lokal anaesthetic activity of bupivacaine in mice. *Can J Anaesth*; 43 (8): 871-6.

Garcia-Valenzuela E, Sharma SC, Piña AL. Multilayered retinal microglial response to optic nerve transection in rats. *Mol Vis*. 2005 Mar 31;11:225-31.

Garcia-Valenzuela E, Sharma SC. Laminar restriction of retinal macrophagic response to optic nerve axotomy in the rat. *J Neurobiol*. 1999 Jul;40(1):55-66.

Garrido C, L Galluzzi, M Brunet, PE Puig, C Didelot and G Kroemer Mechanisms of cytochrome c release from Mitochondria 2006, 13: 1423–1433

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson S A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992,119: 493-501

Gentili F, Hudson AR, Hunter D, Kline DG. 1980 Nerve injection injury with lokal anesthetics agents: a light and electron microscopic, fluorescent microscopic and horse radish peroxidase study. *Neurosurgery*; 6: 263-272

Gerem. B.B. : The Formation From the Schwann Cell Surface of Myelin in the Peripheral Nerves of Chick Embryos. *Exper. Cell Res*, 7:558,1954.

Gissen AJ, Datta S, Lambert D. 1984 The chloroprocaine controversy II. Is chloroprocaine nörototoxic? *Reg Anesth*; 9: 135-145

Giuliano M, Pellerito O, Portanova P, Calvaruso G, Santulli A, De Blasio A, Vento R, Tesoriere G. *Biochimie*. Apoptosis induced in HepG2 cells by the synthetic cannabinoid WIN: involvement of the transcription factor PPARgamma 2009 Apr;91(4):457-65. 2008 Nov 27.

Glaser T, Opitz T, Kischlat T, Konang R, Sasse P, Fleischmann BK, Engel W, Nayernia K, Brüstle O. Adult germ line stem cells as a source of functional neurons and glia. *Stem Cells*. 2008 Sep;26(9):2434-43.

Glawert AM. 1980 Fixation, dehydration and embedding of biological specimens. *Practical Methods in Electron Microscopy*. North. Holland Publishing Company. Oxford.

Gonzalez-Flecha, B.S., Cutrin, J., Boveris, A.,. Time course and mechanism of oxidative stress and tissue damage in rat liver subjected to in vivo ischemia–reperfusion. *J. Clin. Invest* 1993, 91, 456–464.

Gray E<sup>1</sup>, Ginty M, Kemp K, Scolding N, Wilkins A. *J Neuroinflammation*. 2012 Apr 5;9:63

Green, Measuring Apoptosis at the Single Cell Level Methods. 2008 March; 44(3): 222–228

Griffin JW, Li CY, Ho TW, Xue P, Macko C, Gao CY, Yang C, Tian M, Mishu B, Cornblath DR. 1995 Jun Guillain-Barre syndrome in northern China. The spectrum of nöropathological changes in clinically defined cases. Brain; 118 (Pt 3): 577-95.

Grinberg M., Sarig R., Zaltsman Y., Frumkin D., Grammatitakis N., Reuveny E, Gross A., tBid Homooligomerizes in the mitochondrial membrane to induce apoptosis, J. Biol. Chem., 2002, 277:12237- 12245

Guan K, Wolf F, Becker A, Engel W, Nayernia K, Hasenfuss G. Isolation and cultivation of stem cells from adult mouse testes. Nat Protoc. 2009;4(2):143-54.

Gurp M.V., Festjens N., Loo G.V., Saelens X., Vandenabeele P., Mitochondrial intermembrane proteins in cell death, Science Direct. 2003, 304: 487- 497

Gutteridge JMC. Iron and oxygen radicals in brain. Ann Neurol 1992, 32: 516- 521  
Guyton & Hall, Hayrünisa Çavuşoğlu (Çevirmen), Berrak Çağlayan Yeğen (Çevirmen), Nobel Tıp Kitabevi, 2007

Guyton A.C. 1991 Basic Neuroscience. Anatomy & Physiology W.B Saunders Company. Phyladelphia, London; 52-54.

Gülay RG, Sıçan Testislerinde Biyopsinin Oluşturduğu Travmatik Hasarın Onarımına Kök Hücrelerin Katkısının Mikroskopik Olarak İncelenmesi, Tez, KTÜ, 2006

Ha TY, Kim HS, Shin T. Expression of constitutive endothelial, neuronal and inducible nitric oxide synthase in the testis and epididymis of horse, J Vet Med Sci. 2004 Apr;66(4):351- 6



Hadziselimovic F, Synder H, Duckett J: Testikuler histology in children with unilateral testicular torsion, J Urol 1986, 136, 208- 210

Hansson V, Ritzen EM, French FS. Androgen transport mechanisms in the testis and epididymis. Acta Endocrinol Suppl (Copenh).1974;191:191-8.

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

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

Heath JW, Kidd GJ, Trapp BD, Dunkley PR. 1991 Jul 22 Myelin maintenance by Schwann cells in the absence of aksons. Neurosci Lett; 128 (2): 277-80.

Heindel RM, Pakyz RE, Reinking Ln, Cosentino MJ. The effect of various degrees of unilateral spermatic cord torsion on fertility in the rat. J. Urol 1990;144:366- 369

Heiskanen P, Billig H, Toppari J, Kaleva M, Arsallo A, Rapola J, Dunkel L. Apoptotic Celi Death in the Normal and Cryptorchid Human Testis: The Effect of Human Chorionic Gonadotropin on Testicular Cell Survival. Pediatric Research. 1996, 40: 351- 356

Hermo L, Dworkin J. Transitional cells at the junction of seminiferous tubules with the rete testis of the rat: their fine structure, endocytic activity, and basement membrane. Am J Anat. 1988 Feb;181(2):111-31.

Hermo L, Pelletier RM, Cyr DG, Smith CE. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: back ground to

spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes. *Microsc Res Tech.* 2010 Apr; 73 (4): 241-78.

Hess, A: The fine structure and morphological organization of nonmyelinated nerve fibers. *Proc. Roy. Soc. B.* , 144:496,1956.

Hikim S, Amiya P, Wang C, Leung A, Swerdloff R S. Involvement of Apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin releasing hormone antagonist treatment. 2000,57: 136- 141

Hill JR, Dobrinski I. Male germ cell transplantation in livestock. *Reprod Fertil Dev.* 2006;18(1-2):13-8.

Hilton D.A., Love S., Barber R., Demonstration of apoptotic cells in tissue sections by in situ hybridization using digoxigenin-labeled poly-A oligonucleotide probes to detect thymidine-rich DNA sequences, *J. Histochem. Cytochem.* 1997, 42: 13- 20

Hofmann K., Bucher P., Tschopp J., The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem.*, 1997, 22:155- 156

Horvat JC. 1991 Reconstruction of the spinal cord and its motor connections using embryonal nervous tissue transplantation and peripheral nerve autotransplantation. A study in the adult rat. [Article in French] *Neurochirurgie*; 37 (5): 303-11.

Hou L, Cao H, Wei G, Bai C, Zhang Y, Wu Z, Pei Xt X. [Study of in vitro expansion and differentiation into neuron-like cells of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells] *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.* 2002 Aug;23(8):415-9.

Hsueh A J W, Eisenhauer K, Chun S, Hsu S, Billig H. Gonadal Cell Apoptosis. *Recent Progress in Hormone Research.* 1996,51: 432- 457

Huang H, Thalhammer JG, Reymond SA, Strichartz GR. 1995 Effects of lidocaine on siyatik nerve conduction in rats: an in vivo single unit study. Soc Neurosci Abstr; 21: 1411.

Huang JH, Thalhammer JG, Raymond SA, Strichartz GR. 1997 Aug Susceptibility to lidocaine of impulses in different somatosensory afferent fibers of rat siyatik nerve. J Pharmacol Exp Ther; 282 (2): 802-11.

Huckins C. The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation. Anat Rec. 1971 Mar;169(3):533-57.

Huckins, C. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. Anatomical Record 1978, 190: 905–906

Huppertz B., Frang H. G., Kaufmann P., The apoptosis cascade-morphological and immunohistochemical methods for its visualization, Anat.Embryol., 1999, 200:1-18

Ikeda M, Kodama H, Fukuda J. Shimizu Y, Murata M, Kumagai J, Tanaka T. Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. Biol Repr1999, 61: 393- 399

Ishii T, Matsuki S, Iuchi Y, Okada F, Toyosaki S, Tomita Y, Ikeda Y, Fujii J. Accelerated impairment of spermatogenic cells in SOD1-knockout mice under heat stress. Free Radic Res.2005 Jul;39(7):697-705.

Ishikawa T, Kondo Y, Goda K, Fujisawa M. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase in transgenic mice accelerates testicular germ cell apoptosis induced by experimental Cryptorchidism, J Androl. 2005 Mar-Apr;26(2):281- 8

Iskit SH, Tugtepe H, Tugay M, Kiyan G, Kotiloglu E, Dagli TE. Testicular biopsy during orchidopexy procedure: does it have an adverse effect on fertility? Urol Int. 2005;75(3):227-30.

Itoh M, Terayama H, Naito M, Ogawa Y, Tainosho S. Tissue microcircumstances for leukocytic infiltration into the testis and epididymis in mice. *J Reprod Immunol.* 2005 Oct;67(1-2):57-67.

isoforms in the testes of pigs. *Anat Histol Embryol.* 2007 Apr;36(2):135- 8

J Flaskos, WG McLean, MJ Fowler, AJ Hargreaves. Tricresyl phosphate inhibits the formation of axon-like processes and disrupts neurofilaments in cultured mouse N2a and rat PC12 cells. *Neurosci Lett,* 242(2):101-4, 1998.

Jahnukainen K, Chrysis D, Hou M, Parvinen M, Eksborg S, Soder O. Increased apoptosis occurring during the first wave of spermatogenesis is stage-specific and primarily affects midpachytene spermatocytes in the rat testis. *Biol Reprod.* 2004 Feb;70(2):290-6.

Janqueira LC, Carneiro J. *Temel Histoloji (Basic Histology, 10th Edition, 2003. Çev. Ed. Aytekin Y, Solakoğlu S) s. 431-442, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2010.*

JC Axelrad, CV Howard,. WG McLean. The effects of acute pesticide exposure on neuroblastoma cells chronically exposed to diazinon. *Toxicology,* 185:67-78, 2003.

Jean Bossy, Bastide G, Godlewski G, Guérin J, Lasjaunias P, Lefebure D, Prat D, Roland J, Salama J; 1990 *Anatomie Clinique Neuro-anatomie; 10-11 Springer-Verlag Paris Berlin Heildenberg New York Londres Tokyo Hog Kong.*

Jefferson K P, Persad R A, Holly M P. Apoptosis and Relevance to Urologists. *Br J Urol.* 2000,86: 598- 606

Jégou A, Ziyat A, Barraud-Lange V, Perez E, Wolf JP, Pincet F, Gourier C. CD9 tetraspanin generates fusion competent sites on the egg membrane for mammalian fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Jul 5;108(27):10946-51.

Jendelova P, Herynek V, Urdzikova L, Glogarova K, Kroupova J, Andersson B, Bryja V, Burian M, Hajek M, Sykova E. Magnetic resonance tracking of transplanted bone marrow and embryonic stem cells labeled by iron oxide nanoparticles in rat brain and spinal cord. *J Neurosci Res.* 2004 Apr 15;76(2):232-43.

Jeppesen U, Gaist D, Smith T, Sindrup SH. Statins and peripheral neuropathy. *Eur J Clin Pharmacol.* 1999, 54(11):835-8.

Jessen KR, Mirsky R. 1998 Jun 1 Origin and early development of Schwann cells. *Microsc Res Tech;* 41 (5): 393-402.

Jia L, Cepurna WO, Johnson EC, Morrison JC. Patterns of intraocular pressure elevation after aqueous humor outflow obstruction in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000 May;41(6):1380-5.

Jiang FX. Behaviour of spermatogonia following recovery from busulfan treatment in the rat. *Anat Embryol (Berl).*1998 Jul;198(1):53-61.

Jonas JB, Witzens-Harig M, Arseniev L, Ho AD. Intravitreal autologous bone marrow-derived mononuclear cell transplantation: a feasibility report. *Acta Ophthalmol Scand.* 2007 Sep 26;

Jones DG, Anderson ER, Galvin KA. Spinal cord regeneration: moving tentatively towards new perspectives. *NeuroRehabilitation.* 2003;18(4):339-51.

Jost A, Magre S. Control mechanisms of testicular differentiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1988 Dec 1;322(1208):55-61.

Jung-Testas I, Baulieu EE. 1998 Apr Steroid hormone receptors and steroid action in rat glial cells of the central and peripheral nervous system. *J Steroid Biochem Mol Biol;* 65 (1-6): 243-51.

Kalichman MW, Moorhouse DF, Powell HC, Myers RR. 1993 May Relative neural toxicity of local anesthetics. *J Neuropathol Exp Neurol*; 52 (3): 234-40.

Kalichman MW, Powell HC, Myers RR. 1988 Pathology of local anesthetic-induced nerve injury. *Acta Neuropathol (Berl)*; 75 (6): 583-9.

Kalichman MW, Powell HC, Myers RR. 1989 Jul Quantitative histologic analysis of local anesthetic-induced injury to rat sciatic nerve. *J Pharmacol Exp Ther*; 250 (1): 406-13.

Kalichman MW, Powell HC, Reisner LS, Myers RR. 1986 Sep. The role of 2-chloroprocaine and sodium bisulfite in rat sciatic nerve edema. *J Neuropathol Exp Neurol*; 45 (5): 566-75.

Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Inoue K, Ogonuki N, Toyokuni S, Ogura A, Shinohara T. Germline niche transplantation restores fertility in infertile mice. *Hum Reprod*. 2005 Sep;20(9):2376-82.

Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Iwano T, Lee J, Kazuki Y, Inoue K, Miki H, Takehashi M, Toyokuni S, Shinkai Y, Oshimura M, Ishino F, Ogura A, Shinohara T. Genetic and epigenetic properties of mouse male germline stem cells during long-term culture. *Development*. 2005 Sep;132(18):4155-63.

Katusic ZS, Cosentino F. Nitric oxide synthase: from molecular biology to cerebrovascular physiology. *News Physiol Sci*. 1994;9: 64- 67

Kayaalp SO 1988 tıbbi farmakoloji 1.cilt Hacettepe taş kitapevi Ltd. Ankara.

Kerr J B. Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of cell types and frequency during the spermatogenic cycle. *J Reprod Fertil*, 1992, 95: 825- 830

Kerr J.F.R., Wyllie A.H., Currie A.R., Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br J Cancer*, 1972, 26:239-257

Kidd GJ, Heath JW. 1988 Apr Double myelination of aksons in the sympathetic nervous system of the mouse. II. Mechanisms of formation. *J Neurocytol*; 17 (2): 263-76.

Kidd GJ, Heath JW. 1991 Dec Myelin sheath survival following aksonal degeneration in double myelinated nerve fibers. *J Neurosci*; 11 (12): 4003-14.

Kim HC, Byun JS, Lee TK, Jeong CW, Ahn M, Shin T. Expression of nitric oxide synthase Maclean JA 2nd, Wilkinson MF. Gene regulation in spermatogenesis. *Curr Top Dev Biol*.2005; 71: 131-97.

Kimes, H Tarikas, D Schubert. Neurotransmitter synthesis by two clonal nerve cell lines: changes with culture growth and morphological differentiation. *Brain Res*, 79:291-295, 1974.

Klotz, T., Vorreuther, R., Heindenreich, A., Zumb\_e, J., Engelman, U., . Testicular tissue oxygen pressure. *J. Urol*. 1996,155:1488–1491

Kniel PC, Junker U, Perrin IV, Bestetti GE, Rossi GL 1986 May. Varied effects of experimental diabetes on the autonomic nervous system of the rat. *Lab Invest*; 54 (5): 523-30.

Kobayashi M, Kuroiwa T, Shimokawa R, Okeda R, Tokoro T. Nitric oxide synthase expression in ischemic rat retinas. *Jpn J Ophthalmol*. 2000 May-Jun;44(3):235-44.

Kogan SJ Testis and scrotum: Acute and chronic scrotal sewllings. In: Gillenwater JY, Grayhock JT, Howards SS, Ducket JW (eds).*Adult and Pediatric Urology*. 2.nd. ed., MosbyYearbook 1991,pp 2195-2215

Konishi Y., Lebden M., Donovan N., Bonni A., Cdc2 phosphorylaion of BAD links the cell cyclic to the cell death machinery, *Mol. Cell*. 2002, 1: 1005- 1016

Konradsen L, Ravn JB, Sorensen AI. 1993 May Proprioception at the ankle: the effect of anaesthetic blockade of ligament receptors. *J Bone Joint Surg Br*; 75 (3): 433-6.

Korsmeyer S J. Regulators of cell death. *Reviews*. 1995,11: 101- 105

Koshizuka S, Okada S, Okawa A, Koda M, Murasawa M, Hashimoto M, Kamada T, Yoshinaga K, Murakami M, Moriya H, Yamazaki M. Transplanted hematopoietic stem cells from bone marrow differentiate into neural lineage cells and promote functional recovery after spinal cord injury in mice. *J. Neuropathol Exp Neurol*. 2004 Jan;63(1):64-72.

Kroupova J, Horak D, Pachernik J, Dvorak P, Slouf M. Functional polymer hydrogels for embryonic stem cell support. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2006 Feb;76(2):315-25.

Krysko DV, Vanden Berghe T, D'Herde K, Vandenabeele P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*. 2008 Mar;44(3):205- 21.

Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Conservation of spermatogonial stem cell self-renewal signaling between mouse and rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Oct 4;102(40):14302-7.

Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Culture conditions and single growth factors affect fate determination of mouse spermatogonial stem cells. *Biol Reprod*. 2004 Sep; 71(3):722-31.

Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Nov



Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Nov 23;101(47): 16489-94

Kubota H, Avarbock MR, Schmidt JA, Brinster RL. Spermatogonial stem cells derived from infertile Wv/Wv mice self-renew in vitro and generate progeny following transplantation. *Biol Reprod*. 2009 Aug;81(2):293-301.

Kubota H, Wu X, Goodyear SM, Avarbock MR, Brinster RL. Glial cell line-derived neurotrophic factor and endothelial cells promote self-renewal of rabbit germ cells with spermatogonial stem cell properties. *FASEB J*. 2011 Aug;25(8):2604-14.

Kus I, Songur A, Ozogul C, Kavakli A, Zararsiz I, Sarsilmaz M Effects of photoperiod on the ultrastructure of Leydig cells in rat. *Arch Androl*. 2004 May-Jun; 50 (3):193-200.

Lambert LA, Lambert DH, Strichartz GR. 1994 May Irreversible conduction block in isolated nerve by high concentrations of lokal anesthetics. *Anesthesiology*; 80 (5): 1082-93

Lamirande E, O'Flaherty C. Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Jan;1784(1):106- 15. Epub 2007 Sep 5.

Langer JC, Sohal SS, Blennerhasselt P: Mucosal permeability after subclinical intestinal ischemia/reperfusion injury: An exploration of possible mechanisms. *J pediatr Surg* 1995 30: 568- 572

Larsen JO. 1998 Nov 1. Stereology of nerve cross sections. *J Neurosci Methods*; 85 (1): 107-18.

Lee NP, Cheng CY. Nitric oxide/nitric oxide synthase, spermatogenesis, and tight junction dynamics. *Biol Reprod*. 2004 Feb;70(2):267- 76. Epub 2003 Oct 1.

Lee NP, Mruk DD, Wong CH, Cheng CY. Regulation of Sertoli-germ cell adherens junction dynamics in the testis via the nitric oxide synthase (NOS)/cGMP/protein kinase G (PRKG)/beta-catenin CATNB) signaling pathway: an in vitro and in vivo study. *Biol Reprod.* 2005 Sep;73(3):458- 71. Epub 2005 Apr 27

Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood.* 2004 Mar 1;103(5):1669-75. Epub 2003 Oct 23.

Lee TL, Pang AL, Rennert OM, Chan WY. Genomic landscape of developing male germ cells. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2009 Mar; 87 (1): 43-63.

Levy AA, Wallace DN, Dobkin AB. 1975 Mar Uptake of lokal anaesthetics: movement of ethanol into frog siyatik nerve. *Can Anaesth Soc J*; 22 (2): 186-99.

LG Costa. Interactions of neurotoxicants with neurotransmitter systems. *Toxicology.* 49:359-66, 1998.

Li DR, Bahar M, Cole G, Rosen M. 1985 Neurological toksisite of the subarachnoid infusion of bupivacaine, lignocaine or 2-chloroprocaine in the rat. *Br J Anesth*; 57: 424-429.

Li L, Xie T. Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* Lin EP, Bhatt S, Rubens DJ, Dogra VS. Testicular torsion: twists and turns. *Semin Ultrasound CT MR.* 2007 Aug;28(4):317- 28

Lin W W, Lamb D J, Lipshultz L I, Kim E D. Demonstration of testicular apoptosis in human male infertility states using a DNA laddering technique. *Int UrolNephrol.* 1999,31(3): 361- 37

Lisa, M. W., Suzarine, H., Pamela, J. F., & John, M. H. Apoptotic cell death and fertility in three unilateral cryptorchid rat models. *Urological Research* 2000, 28, 332–337

Lisignoli G, Zini N, Remiddi G, Piacentini A, Puggioli A, Trimarchi C, Fini M, Maraldi NM, Facchini A. Basic fibroblast growth factor enhances in vitro mineralization of rat bone marrow stromal cells grown on non-woven hyaluronic acid based polymer scaffold. *Biomaterials* 2001 Aug;22(15):2095-105.

Liu FH, Yang DZ, Wang YF, Liang XP, Peng WM, Cao CA, Li Q, Ma Y, Chen XG, Guo Loo D.T., Rillema J.R., Measurement of cell death, In: Mather JP., Barnes D., *Animal Cell Culture Methods*, Academic Press, 1998, 57, PP:252- 265

Lowe J.S, Stevens A. 1997 *Human Histology Second Ed.* Mosby. London etc; 82-85 and 92-95.

LR. 1986 Jul Local anaesthetic techniques in paediatric surgery. *Br J Anaesth*; 58 (7): 760-78 Ashwell K, Ken W S, Waite P. Advances in spinal cord injury: Role of Apoptosis. *Spine* 2000,25: 1859- 1866

Ludmer RI, Sabelli HC. 1968 Role of water in drug action on nerve. *Recent Adv Biol Psychiatry*; 10: 42-52.

Lui WY, Mruk DD, Cheng CY. Interactions among IQGAP1, Cdc42, and the cadherin/catenin protein complex regulate Sertoli-germ cell adherens junction dynamics in the testis. *J Cell Physiol.* 2005 Jan;202(1):49-66.

Lundborg G. 1970 Ischemic nerve injury. Experimental studies on intraneural microvascular pathophysiology and nerve function in a limb subjected to temporary circulatory arrest. *Scan J Plast Reconstr Surg Suppl*; 6: 3-113.

Luo X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C., Wang X., Bid, a Bcl-2interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors, *Cell*. 1998, 94: 481- 490

LW, Scaravilli F. 1977 Jul The structure and composition of peripheral nerves and nerve roots in the Sprawling mouse. *J Anat*; 123 (3): 763-75.

Madgar I. , Lunenfeld B, Mashiach R, Effect of testicular torsion contralateral testis and fertility in mature rats. *Arch Androl* 1987,19: 237- 241

Maeda K, Sawada A, Matsubara M, Nakai Y, Hara A, Yamamoto T. A novel neuroprotectant against retinal ganglion cell damage in a glaucoma model and an optic nerve crush model in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004 Mar;45(3):851-6.

Majno G, Torisl A. Apoptosis oncosis and necrosis. *Am J Pathol* 1995,46: 3- 15

Maksimov GV, Pashchenko VZ, Rubin AB. 1989 Feb olecular mechanisms of the action of lokal anesthetics. *Fiziol Zh SSSR*; 75 (2): 184-8.

Marcelo G. Rodriguez, Claudia Rival, María S. Theas, Livia Lustig. Immunohistopathology of the contralateral testis of rats undergoing experimental torsion of the spermatic cord *Asian J Androl* 2006; 8 (5): 576–583

Mardanpour P, Guan K, Nolte J, Lee JH, Hasenfuss G, Engel W, Nayernia K. Potency of germ cells and its relevance for regenerative medicine. *J Anat*. 2008Jul;213(1):26-9.

Markey CM, Jequier AM, Meyer GT, Martin GB. Testicular morphology and androgen profiles following testicular ischaemia in rams. *J Reprod Fertil*, Aug 1994,101(3): 643- 50

Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem.* 1993;268:12231- 12234

Mason P, Attema B, DeVries GH. 1991 Fall In vitro use of Schwann cells to elucidate neurotoxic injury. *Neurotoxicology*; 12 (3): 459-71.

Mateu L, Luzzati V, Vargas R, Vonasek E, Borgo M. 1990 Oct 5 Order-disorder phenomena in myelinated nerve sheaths. II. The structure of myelin in native and swollen rat sciatic nerves and in the course of myelinogenesis. *J Mol Biol*; 215 (3): 385-402.

Mateu L, Luzzati V, Villegas GM, Borgo M, Vargas R. 1992 Jul 20 Order-disorder phenomena in myelinated nerve sheaths. IV. The disordering effects of high levels of local anaesthetics on rat sciatic and optic nerves. *J Mol Biol*; 226 (2): 535-48.

Mateu L, Moran O, Padron R, Borgo M, Vonasek E, Marquez G, Luzzati V. 1997 Jun The action of local anesthetics on myelin structure and nerve conduction in toad sciatic nerve. *Biophys J*; 72 (6): 2581-7.

McArthur JC, Stocks EA, Hauer P, Cornblath DR, Griffin JW. 1998 Dec. Epidermal nerve fiber density: normative reference range and diagnostic efficiency. *Arch Neurol*; 55 (12): 1513-20.

McLean WG1, Ward SA. In vitro neurotoxicity of artemisinin derivatives. *Med Trop (Mars)*. 1998, 58:28-31.

McLean, WG, AD Holme, O Janneh, A Southgate, CV Howard, Reed MG. The effect of benomyl on neurite outgrowth in mouse NB2A and human SH-SY5Y neuroblastoma cells in vitro. *Neurotoxicology*, 19:629-32, 1998.

Meng J, Holdcraft RW, Shima JE, Griswold MD, Braun RE. Androgens regulate the permeability of the blood-testis barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Nov

Menger MD, Rücker M, Vollmar B. Capillary dysfunction in striated muscle  
Middendorff R, Müller D, Wichers S, Holstein AF, Davidoff MS. Evidence for  
production and functional activity of nitric oxide in seminiferous tubules and blood  
vessels of the human testis.

Mezey E, Chandross JK, Harta G. Turing blood into brain: Cells bearing neuronal  
antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 2000 290:1779

Miida T, Hirayama S, Nakamura Y. Cholesterol-independent effects of statins and  
new therapeutic targets: ischemic stroke and dementia *J Atheroscler Thromb.*  
11(5):253-64, 2004

Mikuz G Testicular torsion: simple grading for histological evaluation of tissue  
damage. *Appl Pathol* 1985,3: 134

Miramar M.D., Constantini P., Ravagnan L., et al. NADH oxidase activity of  
mitochondrial apoptosis-inducing factor, *J.Biol. Chem.* 2001, 276:391- 398

Mishell B.B., Shiiqi S.M., Henry C., ve ark. Selected methods in cellular  
immunology, 1980, 21- 22

Mizuguchi T, Hui T, Palm K, Sugiyama N, Mitaka T, Demetriou AA, Rozga J.  
Enhanced proliferation and differentiation of rat hepatocytes cultured with bone  
marrow stromal cells. *J Cell Physiol.* 2001 Oct;189(1):106-19.

Moncada S, Higgs A: The L-arginine-nitric oxide pathway; *The New England  
Journal of Medicine*, 1993 Dec 30: 2002- 2012

Monso A, Santaliestra J, Barbal F, Fito F, Riudeubas J. 1996 Jan Sciatic nerve block  
at the popliteal fossa for foot surgery. [Article in Spanish] *Rev Esp Anesthesiol  
Reanim*; 43 (1): 27-9.

Moon C, Ahn M, Kim S, Yasuzumi F, Shin T. Increased expression of both  
constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in the delayed phase of  
acute experimental testicular torsion. *J Vet Med Sci.* 2005 Apr;67(4):453- 6

Moore DC, Spierdijk J, vanKleef JD, Coleman RL, Love GF. 1982 Chloroprocaine toksisite: four additionl cases. *Anesth Analg*; 61: 155-159

Moore KL, Persaud TVN. *The Developing Human*. Fifth edition. p. 281-301. W.B Langman's *Essential Medical Embryology* 2009.

Moosmann B, C Behl. Selenoprotein synthesis and side-effects of statins. *Lancet*. 2004, 363:892-94

Morell P, Toews AD, Wagner M, Goodrum JF. 1994 Spring Gene expression during tellurium-induced primary demyelination. *Neurotoxicology*; 15(1): 171-80

Morris GF, Lang SA. 1997 Sep-Oct Continuous parasacral siyatik nerve block: two case reports. *Reg Anesth*; 22 (5): 469-7

Morrison JC, Moore CG, Deppmeier LM, Gold BG, Meshul CK, Johnson EC. A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage. *Exp Eye Res*. 1997 Jan;64(1):85-96.

Muir, A.R. The relationship between axons and schwann cells during developmental of peripheral nerves in the rat. *Quant. J. Exper. Physiol.* , 44:117,1959.

Muppidi J,Porter M, Siegel RM. Measurement of apoptosis and other forms of cell death. *Curr Protoc Immunol*. 2004 May; Chapter 3:Unit 3.17.

Murphy BA, Dawson NJ, Slack JR. 1995 Mar Sacroiliac joint manipulation decreases the H-reflex. *Electromyogr Clin Neurophysiol*; 35 (2): 87-94

Myers RR, Heckman HM. 1989 Nov Effects of lokal anesthesia on nerve blood flow: studies using lidocaine with and without epinephrine. *Anesthesiology*; 71 (5): 757-62

Myers RR, Kalichman MW, Reisner LS, Powell HC. 1986 Jan Neurotoxicity of lokal anesthetics: altered perineurial permeability,edema, and nerve fiber injury. *Anesthesiology*; 64 (1): 29-35

Myers RR, Murakami H, Powell HC. 1986 Sep. Reduced nerve blood flow in edematous nöropathies: a biomechanical mechanism. *Microvasc Res*; 32 (2): 145-51

Myers RR, Powell HC. 1984 Nov. Galactose nöropathy: impact of chronic endoneurial edema on nerve blood flow. *Ann Neurol*; 16 (5): 587- 94

Myers RR, Rydevik BL, Heckman HM, Powell HC. 1988 Dec Proximodistal gradient in endoneurial fluid pressure. *Exp Neurol*; 102 (3): 368-70

N, Kroemer G. Methods for assessing autophagy and autophagic cell death. *Methods Mol Biol*. 2008;445: 29- 76

Nagy I, Woolf CJ. 1996 Jan Lignocaine selectively reduces C fibre-evoked neuronal activity in rat spinal cord in vitro by decreasing N-methyl-D-aspartate and neurokinin receptor-mediated post-synaptic depolarizations; implications for the development of novel centrally acting analgesics. *Pain*; 64 (1): 59-70.

Nakagawa A, Shiratsuchi A, Tsuda K, Nakanishi Y. In vivo analysis of phagocytosis of apoptotic cells by testicular Sertoli cells. *Mol Reprod Dev*. 2005 Jun;71(2):166-77.

Nakane A, Kojima Y, Hayashi Y, Kurokawa S, Mizuno K, Kohri K. Effect of testicular biopsy in childhood on spermatogenesis, fertility, and paternity in adulthood--a mouse model study. *Urology*. 2005 Sep;66(3):682-6.

Nayernia K, Lee JH, Lako M, Armstrong L, Herbert M, Li M, Engel W, Elliott D, Stojkovic M, Parrington J, Murdoch A, Strachan T, Zhang X. Retraction - In Vitro Derivation of Human Sperm from Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Dev*. 2009 Jul 7.

Nayernia K. Stem cells derived from testis show promise for treating a wide variety of medical conditions. *Cell Res*. 2007 Nov;17 (11): 895-7.

Neuroanatomy. M.J.T. Fitz Gerald MD, PhD, DSc (Degenerasyon ve regenerasyon Sayfa: 16-22).

Newman MB, Davis CD, Kuzmin-Nichols N, Sanberg PR. Human umbilical cord blood (HUCB) cells for central nervous system repair. *Neurotox Res*. 2003;5(5):355-68.



Nolte J, Michelmann HW, Wolf M, Wulf G, Nayernia K, Meinhardt A, Zechner U, Engel W. PSCDGs of mouse multipotent adult germline stem cells can enter and progress through meiosis to form haploid male germ cells in vitro. *Differentiation*. 2010 Nov-Dec;80(4-5):184-94. Epub 2010 Sep 1.

Nolte T, Harleman JH, Jahn W. Histopathology of chemically induced testicular atrophy in rats *Exp Toxicol Pathol*. 1995 Sep;47(4):267- 86

Odenwald WF, Askanas V. 1981 Ultrastructural and cytochemical characteristics of cultured rat Schwann cells. *Acta Neuropathol (Berl)*; 54 (2): 135-42.

of Schwann cell proliferation and differentiation. *Dev Neurosci*; 7 (5-6): 364-73

O'Flaherty C, de Lamirande E, Gagnon C. Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. *Free Radic Biol Med*. 2006 Aug 15;41(4):528- 40. Epub 2006 May 6. Review

Ohta H, Aizawa S, Nishimune Y. Functional analysis of the p53 gene in apoptosis induced by heat stress or loss of stem cell factor signaling in mouse male germ cells. *Biol Reprod*. 2003 Jun;68(6):2249-54. Epub 2003 Jan 22.

Orwig KE, Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL. Functional analysis of stem cells in the adult rat testis. *Biol Reprod*. 2002, 66(4): 944–9.

Ovalı E., Apoptozis, In: Ustaçelebi Ş., Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Ankara, Güneş Kitabevi, 1999, PP:195-203

Özokutan H, Mustafa Küçükaydın, Sebahattin Muhtaroglu, Yücel Tekin Kayseri The Role of Nitric Oxide in Testicular Ischemia-Reperfusion Injury, *J Pediatr Surg* 2000,35:101- 143.

Pang T, Sun LX, Wang T, Jiang ZZ, Liao H, Zhang LY. *Acta Pharmacol Sin*. 2014 Jun;35(6):727-37. 2014 May 5.

Paredes Esteban RM, Ramirez Chamond R, Carracedo Anon J, Rodriguez Portillo

M, Garrido Perez JI, Ocana Losa JM, Pizarro de Celis F. Apoptosis of the contralateral testis after unilateral testicular injury. Experimental study. *Cir Pediatr.* 2000 Jan;13(1):3-6.

Pavy TJ, Doyle DL. 1996 Oct Prevention of phantom limb pain by infusion of lokal anaesthetic into the siyatik nerve. *Anaesth Intensive Care*; 24 (5): 599-600

Pedrosa, R.C., De Bem, A., Locatelli, C., Curi-Pedrosa, R., Geremias, R., Wilhelm Filho, D.,. Timedependent oxidative stress caused by benznidazole. *Redox Rep.* 2001, 6, 265–270

Peters, A. ; The formation and structure of myelin sheaths in the central nervous system. *F. Biophys. Biochem. Cytol.* , 8:431,1960

Petrosillo G., Ruggiero F.M., Pistolese M., Paradies G., Reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain induce cytochrome c dissociation from beef-heart submitochondrial particles via cardiolipin peroxidation. Possible role in apoptosis, *FEBS Lett.* 2001, 509:435- 438

Pineau C, Velez de la Calle JF, Pinon-Lataillade G, Jegou B. Assessment of testicular function after acute and chronic irradiation: further evidence for an influence of late spermatids on Sertoli cell function in the adult rat. *Endocrinology.* 1989 Jun;124(6):2720-8.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999 Apr 2;284(5411):143-7.

Pizzolato P, Renegar OJ. 1959 Histopathologic effects of long exposure to lokal anesthetics on peripheral nerves. *Anesth Analg*; 38: 138-141

Pleasure D, Kreider B, Shuman S, Sobue G. 1985 Tissue culture studies

Polli EE. Transplanting bone-marrow stem cells into the central nervous system. *Haematologica* 2000 85:1009

Popitz-Bergez FA, Leeson S, Strichartz GR, Thalhammer JG. 1995 Sep Relation between functional deficit and intraneural lokal anesthetic during peripheral nerve block. A study in the rat siyatik nerve. *Anesthesiology*; 83 (3): 583-92

Popitz-Bergez FA, Leeson S, Thalhammer JG, Strichartz GR. 1997 Jul-Aug Intraneural lidocaine uptake compared with analgesic differences between pregnant and nonpregnant rats. *Reg Anesth*; 22 (4): 363-71

Powell HC, Kalichman MW, Garrett RS, Myers RR. 1988 Aug Selective vulnerability of unmyelinated fiber Schwann cells in nerves exposed to lokal anesthetics. *Lab Invest*; 59 (2): 271-80

Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997 Apr 4;276(5309):71-4.

Purohit TM, Purohit MB, Dabhi BJ.: Study of semen analysis and testicular biopsy in infertile male. *Indian J Pathol Microbiol*. 2004, 47(4):486-90.

Putchu G.V., Moulder K.L., Golden J.P., et al. Induction of BIM, a proapoptotic BH3-only BCL- 2 family member, is a critical for neuronal apoptosis. *Neuron*. 2001, 29: 615- 628

Qiu G, Tang S, Zhang L, Wen R. [A pilot study of bone marrow stromal cells intraocular transplantation in the S334 transgenic rats and Sprague-Dawley rats] *Yan Ke Xue Bao*. 2002 Jun;18(2):110-4. Chinese.

Quinn LP<sup>1</sup>, Crook B, Hows ME, Vidgeon-Hart M, Chapman H, Upton N, Medhurst AD, Virley DJ. *Br J Pharmacol*. The PPARgamma agonist pioglitazone is effective in the MPTP mouse model of Parkinson's disease through inhibition of monoamine oxidase B2008 May;154(1):226-33. 2008 Mar 10.

Rabinstein AA, Dispenzieri A, Micallef IN, Inwards DJ, Litzow MR, Wijdicks EF. Acute neuropathies after peripheral blood stem cell and bone marrow transplantation. *Muscle Nerve*. 2003 Dec;28(6):733-6.

Ralitchkova, L., Nanov, Z., Gotchev, D., Hinev, A., Libald, T., Wolnik, R., Experimental testicular torsion early and late morphological and enzymohistochemical changes. *Z. Exp. Chir. Transpl. Kunst.*

Ramasamy R, Yagan N, Schlegel PN. Structural and functional changes to the testis after conventional versus microdissection testicular sperm extraction. *Urology.* 2005 Jun; 65 (6):1190-4.

Ransler CW, Allen TD. Torsion of the spermatic cord. *Urol Clin. North Am.* 1982; 245- 249

Ravindran RS, Bond VK, Tasch MD, Gupta CD, Luerssen TG. 1980 Prolonged neural blockade following regional anesthesia with 2-chloroprocaine. *Anesth Analg.*; 59: 447-451

Raymond SA, Shin HC, Steffensen SC. 1991 A role for changes in axonal excitability in general anesthesia. *Ann N Y Acad Sci.* 625: 307-1

Raymond SA. 1992 Sub-blocking concentration of local anesthetics: effects on impulse generation and conduction in single myelinated sciatic nerve axons in frog. *Anesth Analg.*; 75: 906-921.

Ready LB, Plumer MH, Haschke RH, Austin E, Sumi SM. 1985 Neurotoxicity of intrathecal local anesthetics in rabbits. *Anesthesiology*; 63: 364-370

Reed JC., Warner-Lambert/Pfizer-Davis award lecture: Mechanism of apoptosis., *Am. J. Pathol.* 2000, 157:1415- 30

Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB: Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg* 1991, 161: 488- 503

Reisner LS, Hochman BN, Plumer MH. 1980 Persistent neurologic deficit and arachnoiditis following intrathecal 2-chloroprocaine injection. *Anesth Analg.*; 59: 452-454

Reyes M, Jahagirdar B, Koodie L, Verfaillie C. In vitro and in vivo differentiation of single derived multipotent adult progenitor cell into astrocytes, oligodendrocytes, and functional dopaminergic, serotonergic or gaba-ergic neurons. *Blood* 2001 89:714.

Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992 255:1707.

Rhee, H.W., Yoon, M.S., The effect of testicular torsion on the contralateral testis in rats. *J. Cathol. Med. Coll.* 1988,41: 957–968

Ribeiro MO, Antunes E, de Nucci G, Lovisolo SM, Zatz R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension* 1992;20: 298- 303

Richardson LL, Kleinman HK, Dym M. Altered basement membrane synthesis in the testis after tissue injury. *J Androl.* 1998 Mar-Apr;19(2):145-55.

Ringdahl E, Teague L. Testicular torsion. *Am Fam Physician.* 2006 Nov 15, 74(10):1739- 43

Robb GW, Amann RP, Killian GJ. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J Reprod Fertil.* 1978 Sep;54(1):103-7.

Robertson J D. 1959 Preliminary observations on the ultrastructure of Nodes of Ranvier. *Zellforschung* 50: 553-560

Rodriguez I, Christiane O, Araki K, Garcia I, Vassali P. An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *Embo J*, 1997,24: 2262- 2270

Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells.* 2003;21(1):105-10.

Romeo C, Ientile R, Impellizzeri P, Turiaco N, Teletta M, Antonuccio P, Basile M, Gentile C Preliminary report on nitric oxide-mediated oxidative damage in adolescent varicocele. *Hum Reprod.* 2003 Jan;18(1):26- 9

Romine JS, Bray GM, Aguayo AJ. 1976 Jan Schwann cell multiplication after crush injury of unmyelinated fibers. *Arch Neurol*; 33 (1): 49-54

Rongstad K, Mann RA, Prieskorn D, Nichelson S, Horton G. 1996 Jul Popliteal siyatik nerve block for postoperative analgesia. *Foot Ankle Int*; 17 (7): 378-82

Rosch P J. Peripheral neuropathy. *Lancet.* 2004, 364:1663-4.

Rosen MA, Baysinger CI, Shnider SM, Dailey PA, Norton M, Curtis JD, Collins M, Davis RL. 1983 Evaluation of nörotoxicity after subarachnoid injection of large volumes of lokal anesthetics solutions. *Anesth Analg*; 62: 802-808

Rosenstein D, McAninch JW. Urologic emergencies *Med Clin North Am.* 2004 Mar; 88 (2): 495- 518

Ross M.H, Reith E.J, Romvell L.J. 1989 *Histology. A text and atlas.* Second Ed. Williams & Wilkins; 241-258 Baltimore, Philadelphia, Hong Kong, London, Munich, Sydney, Tokyo

Ryan PC, Whelan C, Gaffney EF, Fitzpatrick JM. The effect of unilateral experimental testicular torsion on spermatogenesis and fertility. *Br J Urol* 1988, 62: 359

Rygaard K, Lindenberg S. Stem cells for obstetricians and gynecologists. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2002 May;81(5):383-8.

Ryu BY, Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Conservation of spermatogonial stem cell self-renewal signaling between mouse and rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Oct4;102(40):14302-7. Epub 2005 Sep 23.

Saba M, Morales CR, De Lamirdane E, Gagnon C. morphological and biochemical changes following acute unilateral testicular torsion in prepubertal rats. *J Urol* 1997;157: 1149- 1154

Sade, M., Amato, S., Buyuksu, C., Mertan, S., Canda, M.S., Kaplanoglu, N.,. The effect of testicular torsion on the contralateral testis and the value of various types of treatment. *Br. J. Urol.* 1988,62, 69–71

Saitou M, Lange UC, Western PS, Barton SC, Surani MA. The fragilis interferon-inducible gene family of transmembrane proteins is associated with germ cell specification in mice. *BMC Dev Biol.* 2003 Mar 19; 3: 1.

Saitou M, Payer B, Lange UC, Erhardt S, Barton SC, Surani MA. Specification of germ cell fate in mice. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2003 Aug 29;358(1436):1363-70.

Samorajski T: A relation between the number of myelin lamellae and axon circumference in fibers of vagus and sciatic nerves of mice. *F. Comp. Neural.* , 130:223,1967

Samorajski T, Friede RL 1968 A quantitative electron microscopic study of myelination in the pyramidal tract of rat. *J Comp Neurol* Nov;134(3):323-38

Samorajski T, Friede RL 1968 Size-dependent distribution of axoplasm, Schwann cell cytoplasm, and mitochondria in the peripheral nerve fibers of mouse. *Anat Rec* Jul;161(3):281-92

Sanchez-Ramos JR. Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. *J Neurosci Res.* 2002 Sep 15;69(6):880-93.

Santo Neto H, Teodori RM, Somazzi MC, Marques MJ. 1998 Oct Axonal regeneration through muscle autografts submitted to local Anaesthetic pretreatment. *Br J Plast Surg*; 51 (7): 555-60

Saunders Company, Philadelphia, 1993. England MA, Waddell H. *Life Before Birth.* Second Edition. p.166-170, Mosby Wolf, London, 1996.

Savas C., C. Özoğul, E. Karaöz ve M. Bezir Ischemia, whether from Ligation or Torsion, Causes Ultrastructural Changes on the Kontralateral Testis Scand J Urol Nephrol, 2002, 36: 302–306

Sawada H, Esaki M. Electron microscopic observation of <sup>137</sup>Cs-irradiated rat testis: production of basal laminae for germ cells, despite their absence. J Electron Microsc (Tokyo). 2003;52(4):391-7.

Scalia R, Stalker TJ. Microcirculation as a target for the anti-inflammatory properties of statins Microcirculation. 2002, 9(6):431-42.

Scaravilli F, Duchon LW. 1980 Jun The development of sensory ganglion cells in normal and Sprawling mutant mice. J Neurocytol; 9 (3): 363-71

Schlatt S, Ehmcke J, Jahnukainen K. Testicular stem cells for fertility preservation: preclinical studies on male germ cell transplantation and testicular grafting. Pediatr Blood Cancer. 2009 Aug;53(2):274-80.

Schlatt S, Jahnukainen K, Ehmcke J, Quader MA, Saiful Huq M, Epperly MW, Hergenrother S, Nurmio M. Testicular recovery after irradiation differs in prepubertal and pubertal non-human primates, and can be enhanced by autologous germ cell transplantation. Hum Reprod. 2011 Aug; 26 (8): 1945-54.

Schlatt S. Germ cell transplantation. Mol Cell Endocrinol. 2002 Jan 25; 186 (2):163-7.

Schlegel PN. Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision. Hum Reprod. 1999 Jan;14(1):131-5.

Schumacher M, Robel P, Baulieu EE. 1996 Development and regeneration of the nervous system: a role for neurosteroids. Dev Neurosci; 18 (1-2): 6-21

Schwartzman R A, Cidloski J A. Apoptosis; the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. Endocrine Reviews 1993,14:133- 144



Scintu F, Reali C, Pillai R, Badiali M, Sanna MA, Argiolu F, Ristaldi MS, Sogos V. Differentiation of human bone marrow stem cells into cells with a neural phenotype: diverse effects of two specific treatments. *BMC Neurosci.* 2006 Feb 16;7:14.

Scorrano L., Korsmeyer S.J., mechanism of cytochrome c release by proapoptotic Bcl-2 family members,

Selander D, Brattsand R, Lundborg R, Nordborg C, Olsson Y. 1979 Local anesthetics: importance of mode of application, concentration and adrenalin for the appearance of nerve lesions. *Acta Anesthesiol Scand*; 23: 127-136

Selander D, Dhuner KG, Lundborg G. 1977 Peripheral nerve injury due to injection needles used for regional anesthesia; an experimental study of the acute effects of needle point trauma. *Acta Anesthesiol Scand*; 21: 182-188

Shareef SR, Garcia-Valenzuela E, Salierno A, Walsh J, Sharma SC. Chronic ocular hypertension following episcleral venous occlusion in rats. *Exp Eye Res.* 1995 Sep;61(3):379-82.

Sharpe R M: Regulation of spermatogenesis. in *The Physiology of Reproduction*. Edited by Knobil E, Neill J D. Raven Press. New York, 1994, 1364- 1434

Shaul DB, Xie HW, Diaz JF, Mahnovski V, Hardy BE. Surgical treatment of testicular trauma: effects on fertility and testicular histology. *J Pediatr Surg.* 1997 Jan;32(1):84-7.

Sheikh M.S., Fornace A.J., Role of p53 family members in apoptosis, *J. Cell Physiol*, 2000, 182:171-181

Shikone, T. , Billing, H. & Hsueh Aaron, J. W. Experimentally induced cryptorchidism increases apoptosis in rats testis. *Biology of Reproduction* 1994,51: 865–872

Shinohara T, Kanatsu-Shinohara M, Takashima S, Ishii K. Dynamic Changes in EPCAM Expression during Spermatogonial Stem Cell Differentiation in the Mouse Testis. *PLoS One.* 2011; 6 (8): e23663.

Shinohara T, Orwig KE, Avarbock MR, Brinster RL. Restoration of spermatogenesis in infertile mice by Sertoli cell transplantation. *Biol Reprod.* 2003 Mar;68(3):1064-71.

Shiraishi K, Naito K, Yoshida K. Nitric oxide promotes germ cell necrosis in the delayed phase after experimental testicular torsion of rat. *Biol Reprod.* 2001 Aug;65(2):514-21

Silber SJ, van Steirteghem A, Nagy Z, Liu J, Tournaye H, Devroey P. Normal pregnancies resulting from testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection for azoospermia due to maturation arrest. *Fertil Steril.* 1996 Jul;66(1):110-7

Silber SJ. Microsurgical TESE and the distribution of spermatogenesis in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod.* 2000 Nov;15(11):2278-84.

Sinha Hikim A P, Wang C, Lue Y, Johnson L, Wang X-H, Swerdloff R S. Spontaneous germ cell apoptosis in humans: evidence for ethnic differences in the susceptibility of germ cells to programmed cell death. *J Clin Endoc and Metab,* 1998,83: 15

Smith BE, Siggins D. 1988 Jan Low volume, high concentration block of the sciatic nerve. *Anaesthesia;* 43 (1): 8-11

Snell R. 1987 *Clinical Neurology for Medical Students.* Second Ed. Little, Brown and Company. Boston, Toronto.

Sokoloff L. 1993 Sites and mechanisms of function-related changes in energy metabolism in the nervous system. *Dev Neurosci;* 15 (3-5): 194-206

Sommer C, Lalonde A, Heckman HM, Rodriguez M, Myers RR. 1995 Sep Quantitative neuropathology of a focal nerve injury causing hyperalgesia. *J Neuropathol Exp Neurol;* 54 (5): 635-43.

Somuncu S, Cakmak M, Erdogan S, Caglayan O, Akman H, Kaya M. , Protective effects of trapidil in ischemia-reperfusion injury due to testicular torsion and detorsion: an experimental study, *Int J Urol.* 2006 May;13(5):601- 5

Song S, Sanchez-Ramos J. Preparation of neural progenitors from bone marrow and umbilical cord blood. *Methods Mol Biol.* 2002;198:79-88.

Sotgiu ML, Biella G, Riva L. 1994 Dec 20 A study of early ongoing activity in dorsal horn units following sciatic nerve constriction. *Neuroreport*; 5 (18): 2609-12

Sotiropoulou E, Kourounakis PN. 1994 Jan Pharmacology of novel aminoketonephthalimide, delta 4-tetrahydrophthalimide, and arylsuccinimide derivatives with local anaesthetic activity. *Arch Pharm (Weinheim)*; 327 (1): 21-6.

Spencer PS, Raine CS, Wisniewski H. 1973 Jun Axon diameter and myelin thickness. Unusual relationships in dorsal root ganglia. *Anat Rec*; 176 (2): 225-43

Spencer PS, Schaumburg HH. 1974 Aug A review of acrylamide neurotoxicity. Part II. Experimental animal neurotoxicity and pathologic mechanisms. *Can J Neurol Sci*; 1 (3): 152-69

Sprick M. R., Walczak H., The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis, *Biochimica et Biophysica Acta.* 2004, 1664: 125- 132

Srinivasan A., Roth K.A., Sayers R.O., Shindler K.S., Wong A.M., Fritz L.C., Tomaselli K., In situ immunodetection of activated caspase- 3 in apoptotic neurons in the developing nervous system, *Cell Death Differ*, 1998, 5:1004- 1016

Stadelmann, C. & Lassmann, H. Detection of apoptosis in tissue sections. *Cell & Tissue Research* 2000,301: 19–31

Steinberger E, Tjioe DY. Spermatogenesis in rat testes after experimental ischemia. *Fertil Steril.* 1969 Jul-Aug;20(4):639-49.

Stevens A, Lowe J. *Human Histology.* Second edition. p. 309-319. Mosby, London, 1997.

Stevens WD, Fortin T, Pappas BA. Retinal and optic nerve degeneration after chronic carotid ligation: time course and role of light exposure. *Stroke.* 2002 pr;33(4):1107-12.

- Stolc S, Stankovicova T. 1986 Effect of lokal anaesthetics and pH: new aspects. *Drugs Exp Clin Res*; 12 (9-10): 753-60
- Stone, JD., AP Peterson, J Eyer, TG Oblak, DW Sickles. Neurofilaments are nonessential to the pathogenesis of toxicant-induced axonal degeneration. *J Neurosci*, 21(7):2278-2287, 2001.
- Streckfuss-Bömeke K, Vlasov A, Hülsmann S, Yin D, Nayernia K, Engel W, Hasenfuss G, Guan K. Generation of functional neurons and glia from multipotent adult mouse germ-line stem cells. *Stem Cell Res*. 2009 Mar; 2 (2): 139-54.
- Sukhotnik I, Iness Miselevich Michael Lurie, Ofer Nativ Arnold G. Coran Jorge G. Mogilner, The time relationship between ipsilateral testicular ischemia and germ cell apoptosis in the contralateral testis in rat Springer-Verlag Jul, 2005; 21(7): 512- 6
- Synek VM. 1987 The pyriformis syndrome: review and case presentation. *Clin Exp Neurol*; 23: 31-7
- Szabo C, Dawson VL. Role of poly (ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischemia-reperfusion. *Trends Pharmacol Sci* 1998: 19: 287
- Tagariello V. 1998 May Sciatic nerve blocks: approaches, techniques, lokal anaesthetics and manipulations. *Anaesthesia*; 53 Suppl 2: 15-7
- Taketo-Hosotani T, Merchant-Larios H, Thau RB, Koide SS. Testicular cell differentiation in fetal mouse ovaries following transplantation into adult male mice. *J Exp Zool*. 1985 Nov;236(2):229-37.
- Taneli F, Vatansever S, Ulman C, Giray G, Genc A, Taneli C. Pre-ischemic administration of nitric oxide synthase inhibitors reduced germ cell apoptosis after spermatic vessel ligation in the rat testis. *Urol Int*. 2005;75(1):70- 4
- Tanyel, F.C., Buyukpamuku, N., Hicsönmez, A.,. Contralateral testicular blood flow during unilateral testicular torsion. *Br. J. Urol*. 1989,63, 522–524

Tapanainen JS, Tilly JL, Vihko KK, Hsueh AJ. Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Mol Endocrinol.* 1993 May;7(5):643- 50

Tasdemir E, Galluzzi L, Maiuri MC, Criollo A, Vitale I, Hangen E, Modjtahed

Tayal G, Srivastava RK, Arora RB. 1976 Feb Local anaesthetic activity of some substituted propiophenones. *Jpn J Pharmacol*; (1): 111-4

TB Shea. Selective stabilization of microtubules within the proximal region of developing axonal neurites. *Brain Res Bull*, 48(3):255-61, 1999.

Temeltas G, Dagci T, Kurt F, Evren V, Tuglu I. Bladder function recovery in rats with traumatic spinal cord injury after transplantation of neuronal-glialrestricted precursors or bone marrow stromal cells. *J Urol.* 2009, Jun;181(6):2774-9.

Tesfaye S, Harris N, Jakubowski JJ, Mody C, Wilson RM, Rennie IG, Ward JD. 1993 Dec Impaired blood flow and arterio-venous shunting in human diabetic nöropathy: a novel technique of nerve photography and fluorescein angiography. *Diabetologia*; 36 (12): 1266-74

Thornberry N.A., Lazebnik Y., Caspases: Enemies within, *Science*, 1998, 281:1312-1316

Tjioe DY, Steinberger E. A quantitative study of the effect of ischaemia on the germinal epithelium of rat testes. *Reprod Fertil.* 1970 Apr;21(3):489- 94

Touchette N, Fogle S. Apoptosis: it chimes with mitosis. *JNIH Res* 1991,3:75

Toyooka Y, Tsunekawa N, Akasu R, Noce T. Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Sep 30;100 (20):11457-62.

Toyooka Y, Tsunekawa N, Takahashi Y, Matsui Y, Satoh M, Noce T. Expression and intracellular localization of mouse Vasa-homologue protein during germ cell development. *Mech Dev.* 2000 May;93(1-2):139-49.

Tripsa M, Sahini VE, Nae C, Vasilescu V. 1986 Aug Structure/nerve membrane effect relationships of some lokal anaesthetics. *Gen Physiol Biophys*; 5 (4): 371-6

Turk JL. 1996 Jan-Mar Host parasite response in nerve in leprosy. *Indian J Lepr*; 68 (1): 113-7

Turner TT, Brown KJ. Spermatic cord torsion: loss of spermatogenesis despite return of blood flow, *Biol Reprod*. 1993 Aug; 49 (2):401- 7.

Turner TT, Tung KSK, Tomosama H, Wilson LW Acute testicular ischemia results in germ cell-specific apoptosis of the rat 1997; *Biol Reprod* 57: 1267

Turner TT. Acute experimental testicular torsion: no effect on the contralateral testis, *J Androl* 1985;6: 65- 72

Turner TT. On unilateral testicular and epididymal torsion: no effect on the contralateral testis 1987,1285

Turner, T.T., Caplis, L.A., Rhoades, C.P.,. Testicular vascular permeability: effects of lesions associated with impaired testis function. *J. Urol*. 1996,155, 1078–1082.

Urcola JH, Hernández M, Vecino E. Three experimental glaucoma models in rats: comparison of the effects of intraocular pressure elevation on retinal ganglion cell size and death. *Exp Eye Res*. 2006 Aug;83(2):429-37. Epub 2006 May 6.

Uzun H., Kalkan M., Tunç B, Aktaş Ş, Çetinkaya M., Alıcı B., Testiküler torsiyonda hiperbarik oksijen tedavisinin etkinliği hyperbaric oxygen therapy ın testicular torsion,2004,30 (3): 273- 278

Üstün H, Akgül KT, Ayyıldız A, Yağmurdur H, Nuhoglu B, Karagüzel E, Oğuş E, Germiyanoğlu C. Effect of phosphodiesterase 5 inhibitors on apoptosis and nitric oxide synthases in testis torsion: an experimental study. *Pediatr Surg Int*. 2008 Feb;24(2):205- 11. Epub 2007 Nov 6.

Van der Zee CE, Brakkee JH, Gispen WH. 1991 May Putative nörotrophic factors and functional recovery from peripheral nerve damage in the rat. *Br J Pharmacol*; 103 (1): 1041-6

Van Pelt AM, Roepers-Gajadien HL, Gademan IS et al: Establishment of cell lines with rat spermatogonial stem cell characteristics. *Endocrinology*. 2002, 143(5):1845–50.

Veronesi B, Ehrich M. Differential cytotoxic sensitivity in mouse and human cell lines exposed to organophosphate insecticides. *Toxicol Appl Pharmacol*, 120:240-246,1993.

Vidal L, Díaz F, Villena A, Moreno M, Campos JG, de Vargas IP. Nitric oxide synthase in retina and optic nerve head of rat with increased intraocular pressure and effect of timolol. *Brain Res Bull*. 2006 Oct 16;70(4-6):406-13.

Vincent S, Segretain D, Nishikawa S, Nishikawa SI, Sage J, Cuzin F, Rassoulzadegan M. Stage-specific expression of the Kit receptor and its ligand (KL) during male gametogenesis in the mouse: a Kit-KL interaction critical for meiosis. *Development*. 1998 Nov;125(22):4585-93.

Von Schalburg KR, McCarthy SP, Rise ML, Hutson JC, Davidson WS, Koop BF. Expression of morphogenic genes in mature ovarian and testicular tissues: Potential stemcell niche markers and patterning factors. *Mol Reprod Dev*. 2006 Feb;73(2):142-52.

Vural, K 1, Tuğlu MI. Neurotoxic effect of statins on mouse neuroblastoma NB2a cell line. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2011 Sep;15(9):985-91.

Wali FA, Brain AI. 1989 Inhibition of nerve conduction by electromagnetic induction of the frog siyatik nerve-gastrocnemius muscle preparation. *Jpn J Physiol*; 39 (2): 303-10

Wang BC, Hillman DE, Spielholz NI, Turndorf H. 1984 Chronic nörological deficits and Nesacaine-CE- an effect of the anesthetic,2-chloroprocaine, or the antioxidant sodium bisulfite? *Anesth Analg*; 63: 445-44.

Wang GK, Vladimirov M, Shi H, Mok WM, Thalhammer JG, Anthony DC. 1998 Feb Structure-activity relation of N-alkyl tetracaine derivatives as nörolytic agents for siyatik nerve lesions. *Anesthesiology*; 88 (2): 417-28.

WG McLean, AD Holme, O Janneh, A Southgate, CV Howard, Reed MG. The effect of benomyl on neurite outgrowth in mouse NB2A and human SH-SY5Y neuroblastoma cells in vitro. *Neurotoxicology*, 19:629-32, 1998.

White DM, Mansfield K, Kelleher K. 1996 Apr 19 Increased neurite outgrowth of cultured rat dorsal root ganglion cells following transection or inhibition of aksonal transport of the siyatik nerve. *Neurosci Lett*; 208 (2): 93-6

Wiebe JP, Kowalik A, Gallardi RL, Egeler O, Clubb BH. Glycerol disrupts tight junction-associated actin microfilaments, occludin, and microtubules in Sertoli cells. *J Androl*. 2000 Sep-Oct;21(5):625-35.

Wiggins RC. 1982 Jun Myelin development and nutritional insufficiency. *Brain Res*; 257 (2): 151-75

Williams P.L, Warwick R, Dyson M, Bannister L.H. 1989 Gray's Anatomy. 37.Ed. Churchill Livingstone. Edinburg; 1145-49 and 896-903

Wynsberghe D.V, Noback C.R, Carola R. 1995 Human Anatomy and Physiology. Third Ed. Mc Graw-Hill, Inc. New York; 355-372

Xu D, Qin DN, Wang Y, Zhuang CX, Li WQ. Effect of local testicular heating on spermatogenic cell apoptosis in rat. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2003 Jun;9(3):170-4.

Yağmurdur H, Ayyıldız A, Karagüzel E, Akgül T, Üstün H, Germiyanoğlu C. Propofol reduces nitric oxide-induced apoptosis in testicular ischemia-reperfusion injury by downregulating the expression of inducible nitric oxide synthase. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2008 Mar;52(3):350- 7. Epub 2008 Jan 16.

Yamamoto H, Schmidt-Kastner R, Hamasaki DI, Yamamoto H, Parel JM. Complex neurodegeneration in retina following moderate ischemia induced by bilateral



common carotid artery occlusion in Wistar rats. *Exp Eye Res.* 2006 May;82(5):767-79. Epub 2005 Dec 13.

Yamamoto, C. M., Sinha Hikkip, A. P., Huynh, P. N., Shapiro, B., Lue, Y., Salameh, W. A., Wang, C. & Swerdloff, R. S. Redistribution of bax is an early step in an apoptotic pathway leading to germ cell death in rats, triggered by mild testicular hyperthermia. *Biology of Reproduction* 2000,63: 1683–1690.

Yamato, M., Egashira, T., Utsumi, H.,. Application of in vivo ESR spectroscopy to measurement of cerebrovascular ROS generation in stroke. *Free Radic. Biol. Med.* 2003, 35, 1619–1631

Yang LY, Huang TH, Ma L. Bone marrow stromal cells express neural phenotypes in vitro and migrate in brain after transplantation in vivo. *Biomed Environ Sci.* 2006 Oct;19(5):329-35.

Yılmaz N ve Pençe S. *Kaspazlar derleme ibni-sina tıp dergisi* 7- 2002

Yin Y, Hawkins K L, Devvolf W C, Morgantaler A. Heat stres causes testicular germ celi apoptosis in adult mice. *J Androl.* 1997,18: 159- 165

Yip KH, Huang Y, Waye MM, Lau HY. Induction of nitric oxide synthases in primary human cultured mast cells by IgE and proinflammatory cytokines. *Int Immunopharmacol.* 2008 May;8(5):764- 8. Epub 2008 Feb 15. 2

Young B, Heath JW, Stevens A, Lowe JS, Deakin PJ. *Wheater's Functional Histology. A Text and Color Atlas.* p. 328-336. Churchill Livingstone, Edinburgh, 2000.

Young HE, Duplaa C, Romero-Ramos M et al. Adult reserve stem cells and their potential for tissue engineering. *Cell Biochem Biophys.* 2004; 40 (1):1–80.

Yu S, Tanabe T, Dezawa M, Ishikawa H, Yoshimura N. Effects of bone marrow stromal cell injection in an experimental glaucoma model. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Jun 16;344(4):1071-9. Epub 2006 Apr 27.

Yu S.W., Wang H., Poitras M.F., et al. Mediation of poly (ADP- ribose) Polymerase -1-dependent cell death by apoptosis- inducing factor, *Science*. 2002, 297:259- 63

Zetlaoui PJ. 1996 Blocs des nerfs sciatiques. [Article in French] *Cah Anesthesiol*; 44 (2): 119-26

Zhang X, Ebata KT, Robaire B, Nagano MC. Aging of male germ line stem cells in mice. *Biol Reprod*. 2006 Jan;74(1):119-24.

Zirkin BR, Santulli R, Awoniyi CA, Ewing LL. Maintenance of advanced spermatogenic cells in the adult rat testis: quantitative relationship to testosterone concentration within the testis. *Endocrinology*. 1989 Jun;124(6):3043-9.








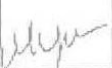
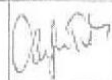
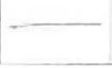

ZM. Transplantation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells into the xenogeneic testis *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2005 Jul;11 (7): 499-502.

Zovoilis A, Nolte J, Drusenheimer N, Zechner U, Hada H, Guan K, Hasenfuss G, Nayernia K, Engel W. Multipotent adult germline stem cells and embryonic stem cells have similar microRNA profiles. *Mol Hum Reprod*. 2008 Sep;14(9):521-9.

## 7. EKLER

Ek 1

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

KARAR TARİH / NO	10 / 05 / 2017 / 20.470.486 -						
ARAŞTIRMANIN ADI	Tiazolidindion grubu pioglitazonun NB2a hücre kültürü üzerindeki etkilerinin araştırılması						
SORUMLU ARAŞTIRMACI	Doç. Dr. Kamil VURAL - MCBÜ Tıp Fak. Farmakoloji AD.						
ARAŞTIRMA EKİBİ	Ecz. Okan Seyrek						
ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	UZMANLIK TEZİ <input type="checkbox"/>		YÜKSEK LİSANS-DOKTORA TEZİ <input checked="" type="checkbox"/>		AKADEMİK AMAÇLI <input type="checkbox"/>		
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	07 / 04 / 2017 / Tarih ve 15850 sayılı; araştırma dosyası						
KARAR BİLGİLERİ	Araştırma dosyası incelenmiş, bilimsel ve etik açıdan UYGUN olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir						
Unvanı/Adı/Soyadı		Araştırma ile İlgili Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye	Unvanı / Adı / Soyadı		Araştırma ile İlgili Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye
Prof. Dr. Zeki ARI Tıbbi Biyokimya AD		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Doç. Dr. Aysen TÜREDİ-YILDIRIM Çocuk Hematolojisi AD		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof. Dr. Murat DEMET Psikiyatri AD		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Yrd. Doç. Dr. Selim ALTAN Tıbbi Etik AD		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Doç. Dr. Beyhan Cengiz ÖZYURT Halk Sağlığı AD		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Yrd. Doç. Dr. Dilek ÇEÇEN Cerrahi Hemşireliği AD		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Doç. Dr. Tuğba ÇAVUŞOĞLU Farmakoloji AD		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Mukadder YILMAZER Avukat		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Doç. Dr. Serdar TOK BESYO		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	İhsan ANCI Sivil Üye		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
<p>Etik Kurulumuzun kararı yukarıda belirtilmiştir. Araştırmanız Her Hangi Bir Aşamada Etik Kurulumuzun "İzleme - Denetim" Görevi Gereği <u>Luzumu Halinde Haberli / Habersiz Olarak Denetlenebilir</u>, Araştırma Başvuru Formunun Taahhütname - Bölüm E kısmında belirtilmiş olan hususlara dikkate alınarak istenilen bilgilerin Etik Kurulumuza zamanında iletilmesi konusunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.</p>							
 Prof. Dr. Zeki ARI Başkan							



T.C.  
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÖNETİM KURULU KARAR ÖRNEĞİ

Karar Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar Sayısı
05.06.2014	15	30

**Karar 19-** Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'nın Yüksek Lisans öğrencisi Okan SEYREK için tez konusunun, Etik kurul onayı kaydı ile "Tiazolidindion Grubu Pioglitazonun Nb2a Hücre Kültürü Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması" olarak değiştirilmesine **OY BİRLİĞİ** ile karar verildi

İmza Prof. Dr. İbrahim TUĞLU Enstitü Müdürü		
İmza Doç. Dr. Enis CEZAYIRLI Müdür Yardımcısı	İmza Doç. Dr. Kamil VURAL Müdür Yardımcısı	İmza Prof. Dr. Necip KUTLU Üye
İmza Doç. Dr. Sezgi ÇINAR PAKYÜZ Üye	İmza Doç. Dr. Mehmet GÖRAL Üye	
Özcan GERÇEKER Enstitü Sekreteri Raportör		

Ash Gibidir  
26/04/2018  
Aynur PALAMUTÇUOĞLU  
Enstitü Sekreteri



**T.C.**  
**MAİNSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU**  
**FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA**

Tez Adı... **Tiazolidindion Grubu Pioglitazonun NB2a Hücre Kültürü Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması**

Tezime ilişkin.....13/03...../2018..... tarihinde yapılan Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 10..'tür.

Belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Tarih ve İmza



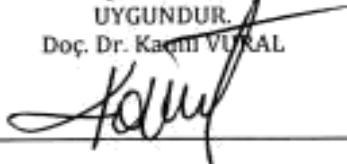
14.03.2018

**Adı Soyadı** :Okan Seyrek  
**Öğrenci No** :2913130001  
**Anabilim Dalı** :Farmakoloji  
**Programı** :Farmakoloji Yüksek Lisans

**DANIŞMAN ONAYI**

UYGUNDUR.

Doç. Dr. Kaçın VURAL



**Açıklamalar**

- 1-Tez Çalışması Orijinallik Raporu (TÇOR), TURNITIN İntihal Tespit Programı kullanımı için kişisel hesap alma hakkı bulunan tez danışmanları, Enstitülerde görevlendirilen personeller, Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı'nda görevlendirilen kütüphaneciler tarafından alınır.
- 2-Sayfa sayısı 400'den az olan tezler için tez savunmasından önce ve başarılı olması durumunda düzeltmelerden sonra olmak üzere 2 kez TÇOR alınır.(400 sayfadan fazla olan tezler 400 ve katları şeklinde bölünerek Turnitin veri tabanına yüklenmesi gerekmektedir. Bu gibi durumlarda benzerlik oranının hesaplanmasına ilişkin detaylı forma, kütüphane web sayfasında bulunan Turnitin kullanım kılavuzlarının altından erişilebilir.)
- 3-TÇOR, tezin yalnızca Kapak Sayfası, Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan kısmının tek bir dosya olarak intihal tespit programına yüklenmesi ile alınır.  
Programa yükleme yapılırken Dosya Başlığı (document title) olarak tez başlığının tamamı, Yazar Adı (author's first name) olarak öğrencinin adı, Yazar Soyadı (author's last name) olarak öğrencinin soyadı bilgisi yazılır.
- 4- TURNITIN İntihal tespit programına yüklenen dosyanın süreçlenmesinde, ilgili programdaki filtreleme seçenekleri aşağıdaki şekilde ayarlanır: - Kaynakça hariç, - Alıntılar hariç, - 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 5 words)
- 5-İsteğe bağlı ayarlar kısmından; "Ödevleri şuraya gönder?" seçeneği mutlaka DEPO YOK şeklinde işaretlenmesi gerekmektedir; aksi durumda aynı tezin ikinci kez yüklenmesi durumunda benzerlik %100 çıkacaktır ve depodan tezi silmek çok uzun süreç gerektirecektir.
- 6- Raporlama işlemi tamamlandıktan sonra, kaydedilmiş olan ekranın görüntüsünü sağ üst köşesinde yüzdelik sayı olarak belirtilen "benzerlik oranı," raporlamaya tabi tutulmuş olan dosyanın "toplam sayfa sayısı" ve raporlama işleminin yapıldığı "tarih" bilgisi, "Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orijinallik Raporu" formuna işlenir.
- 7- Benzerlik oranında tüm sorumluluk öğrenciye aittir.
- 8-Tez savunma sınavı sonrasında başarılı bulunan öğrenci, tez savunma sınavı tarihi sonrasında tezde yapılmış muhtemel değişiklikleri içeren dosya kullanılarak alınmış ikinci bir intihal raporundaki bilgiler kullanılarak hazırlanmış ve tez danışmanı tarafından onaylanarak imzalanmış ikinci bir "Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orijinallik Raporu"nu Enstitüye teslim etmekle yükümlüdür.
- 9-Turnitin Hakkında Bilgiler: <http://kutuphane.cbu.edu.tr/turnitin.9370.tr.html>

## ÖZGEÇMİŞ

<b>Adı</b>	OKAN	<b>Soyadı</b>	SEYREK
<b>Doğum Yeri</b>	ANKARA	<b>Doğum Tarihi</b>	11.06.1986
<b>Uyruğu</b>	T.C	<b>Tel</b>	0505 351 45 25
<b>E-mail</b>	okanseyre01@gmail.com		

### Eğitim Düzeyi

	<b>Mezun Olduğu Kurumun Adı</b>	<b>Mezuniyet Yılı</b>
<b>Doktora/Uzmanlık</b>		
<b>Yüksek Lisans</b>	Manisa Celal Bayar Üni. / S.B.E. Farmakoloji AD.	2018
<b>Lisans</b>	Anadolu Üniversitesi / Eczacılık Fak.	2008
<b>Lise</b>	Muş Anadolu Öğretmen Lisesi	2004

### İş Deneyimi

<b>Görevi</b>	<b>Kurum</b>	<b>Süre (Yıl - Yıl)</b>
Eczacı	Okan Eczanesi	2008- Halen

<b>Yabancı Dilleri</b>	<b>Okuduğunu Anlama*</b>	<b>Konuşma*</b>	<b>Yazma*</b>
İngilizce	İyi	İyi	İyi

<b>Almanca</b>	<b>Zayıf</b>	<b>Zayıf</b>	<b>Zayıf</b>					
<b>Yabancı Dil Sınav Notu #</b>								
YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	53, 750							

	<b>Sayısal</b>	<b>Eşit Ağırlık</b>	<b>Sözel</b>
<b>ALES Puanı</b>	83,377	83, 621	83, 063
<b>(Diğer)Puanı</b>			

### **Bilgisayar Bilgisi**

<b>Program</b>	<b>Kullanma becerisi</b>
MS Office	Orta