



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RAPAMİSİN'İN FARE NÖROBLASTOMA (NB2a) HÜCRE
KÜLTÜRÜ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

HAZIRLAYAN: ECE NUR KAYA
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
PROF. DR. KAMİL VURAL

MANİSA, 2022



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RAPAMİSİN'İN FARE NÖROBLASTOMA (NB2a) HÜCRE
KÜLTÜRÜ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

HAZIRLAYAN: ECE NUR KAYA
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

Prof. Dr. Kamil VURAL	(Tez Danışmanı)
Prof. Dr. Ercüment ÖLMEZ	(Jüri Üyesi)
Dr. Öğr. Üyesi Elif AKSÖZ	(Jüri Üyesi)

MANİSA, 2022

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilemeyen 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 davranışım olmadığını beyan ederim.

Ece Nur KAYA



I. TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince emeği geçen, derin bilgilerinden istifade ettiğim, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum Sayın Dekanımız Prof. Dr. Kamil VURAL'a,

Öğrenimim boyunca bilgileriyle ışık olan anabilim dalımız öğretim üyeleri Prof. Dr. Tuğba ÇAVUŞOĞLU, Prof. Dr. Ercüment ÖLMEZ, Prof. Dr. Sedef GİDENER ve Dr. Öğr. Üyesi Ertan DARIVERENLİ'ye

Bu süreçte destekleri ve güzel arkadaşlıklarıyla yardımcı olan asistan arkadaşlarım Dr. Ömer Can ATAK, Dr. Pelin AKÇA, Dr. Gülce TATLI, Dr. Furkan ÖZTEKİN ve Dr. Hasan YILMAZ'a,

Son olarak anlayışı ve desteği ile hep yanımda olan sevgili eşim Ecz. Koray KAYA'ya, kızım Alya'ya ve hayatım boyunca destekçilerim olan canım aileme teşekkür ederim.

Saygılarımla
Ecz. Ece Nur KAYA

II. KISALTMALAR VE SİMGELER

- AKG:** Arka Kök Gangliyonu
MS: Multiple Skleroz
NB2a: Nöroblastoma Hücre Dizini
TTX: Tetrodotoksin
ALS: Amiyotrofik Lateral Skleroz
SOD: Süperoksid Dismutaz
AH: Alzheimer hastalığı
HKB: Hafif Kognitif Bozukluk
APP: Amiloid Öncül Proteini
NMDA: N-Metil-D-Aspartat
PH: Parkinson Hastalığı
EMG: Elektromiyografi
EEG: Elektroensefalografi
NCV: Sinir İletim Hızı
SCA: Spinoserebellar Ataksi
MR: *Manyetik Rezonans Görüntüleme*
FA: Friedreich Ataksisi
KBD: Kortikobazal Dejenerasyon
TNF: Tümör Nekroz Faktör
ER: Endoplazmik Retikulum
MDA: Malondialdehit
CAT: Katalaz
GSH-Px: Glutasyon Peroksidaz
G6PDH: Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz
GR: Glutasyon Redüktaz
SV2A: Sinaptik Vezikül Proteini 2A
İV: İntravenöz
GABA: Gamma-aminobütirik Asit
SE: Status Epileptikus
HİBH: Hipoksik İskemik Beyin Hasarı

MES: Maximal Elektroşok

PTZ: Pentilentetrazol

NTA: Nöropati Target Esteraz

NTT: Nörotoksisite Tarama Testi

MTT: 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromid

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

PBS: *Phosphate-buffered Saline*

ANOVA: Tek Yönlü Varyans Analizi

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

HH: Huntington Hastalığı

FTD: Frontotemporal Demanslar

TdT: Terminal deoksinükleotidil transferaz

III. İÇİNDEKİLER

I. BEYAN	i
II. TEŞEKKÜR	ii
III. KISALTMALAR VE SİMGELER	iii
IV. İÇİNDEKİLER.....	v
V. ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
1. ÖZET	viii
2. ABSTRACT	ix
3. GİRİŞ VE AMAÇ	1
4. GENEL BİLGİLER.....	2
4.1. Nöron (Sinir Hücresi)	2
4.1.1. AKG(Arka Kök Gangliyonu) ve PDN(Primer Duyu Nöronları)	3
4.1.2. Aksonal Taşıma	3
4.1.3. Akson Hasarı	4
4.1.4. Waller dejenerasyonu	4
4.1.5. Aksonal dejenerasyon.....	5
4.1.6. Segmental demiyelinizasyon	6
4.1.7. Nörodejeneratif Hastalıklar ve Aksonal Taşıma.....	6
4.2. Nörodejeneratif Hastalıklar.....	7
4.2.1. Alzheimer Hastalığı	7
4.2.2. Parkinson Hastalığı.....	9
4.2.3. Amyotrofik Lateral Skleroz	10
4.3. Klorprifos Ve Nörotoksisite	11
4.4. mTOR SİNYAL YOLAĞI	13
4.4.1. mTOR İnhibitörleri	15

4.4.1.1.	Sirolimus (Rapamisin).....	15
4.4.1.2.	Temsirolimus.....	17
4.4.1.3.	Everolimus.....	18
4.4.1.4.	Deforolimus.....	18
4.5.	Nörotoksisite ve Nöroprotektivite Deneyleri.....	19
4.5.1.	Nörotoksisite Tarama Testi (NTT)	19
4.5.2.	MTT Boyama.....	20
5.	MATERYAL VE METOD	21
5.1.	Materyal.....	21
5.2.	Yöntemler	21
5.2.1.	Hücre Kültürü Çalışmaları.....	21
5.2.2.	Hücre Canlılığı ve Proliferasyonu	22
5.2.3.	Nörotoksite Tarama Testi	24
5.2.4.	Klorprifos ile Oluşturulan Nörotoksisite Üzerine Rapamsin'in Etkisinin Değerlendirilmesi	25
5.3.	İstatistiksel Analizler	25
6.	BULGULAR	26
6.1.	Nörotoksisite Tarama Testi.....	26
6.2.	MTT Metabolizması Sonuçları.....	27
7.	TARTIŞMA.....	29
8.	SONUÇ VE ÖNERİLER	31
9.	KAYNAKLAR.....	32
EK-1	32
EK-2	45
EK-3	45
EK-4	47

IV. ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Bir nöronun yapısı	2
Şekil 2: Arka kök gangliyonu anatomisi.....	3
Şekil 3: Alzheimer hastalığının klinik evreleri	8
Şekil 4: Alzheimer hastalığında amiloid plaklar ve nörofibriler yumaklar.....	8
Şekil 5: a) Substantia nigra hücreleri striatuma kadar uzanır. b) Salınan dopamin buradaki reseptörlere tutunarak iletim sağlanır.....	9
Şekil 6: Medulla spinalisteki dejenerasyon.....	10
Şekil 7: ALS hastalarında glutamat seviyelerindeki artış.....	11
Şekil 8: mTOR organizasyonu ve sinyal kompleksleri a) mTOR'un yapısının şematik çizimi b) TORC komplekslerinin özeti ve fonksiyonları.....	14
Şekil 9: mTOR sinyal ağı.....	15
Şekil 10: Rapamisin'in mTOR sinyal yolağı üzerindeki etkisi.....	16
Şekil 11: mTOR inhibitörlerinin kimyasal yapıları.....	17
Şekil 12: Flask içindeki nöroblastoma hücrelerinin etüvde çoğaltılması.....	22
Şekil 13: Nöroblastoma hücrelerinin laminar flow kabin içerisinde kuyucuklara eklenmesi.....	23
Şekil 14: Nöroblastoma hücrelerine CellTiter-Glo® reaktif karışımının eklenmesi.....	23
Şekil 15: Hücre canlılığının ölçülmesinde kullanılan cihazın görünümü.....	24
Şekil 16: d-cAMP ile farklılaştırılan NB2a Kültür Hücresi görüntüsü x400.....	26
Şekil 17: proliferasyondaki hücre (negatif kontrol) görüntüsü x400.....	26
Şekil 18 : NB2a hücrelerinde rapamisinin farklı konsantrasyonlarında nörit inhibisyonu üzerine etkisi. $p>0.05$	27
Şekil 19: İlacın farklı konsantrasyonlarında MTT metabolizması üzerine etkileri, *** $p<0.001$	28
Şekil 20: İlacın farklı konsantrasyonlarında klorpirofosfa 25 uM uygulamasına MTT metabolizması üzerine etkileri, * $p<0.05$., *** $p<0,001$	28

1. ÖZET

Tezin Başlığı: Rapamisin'in Fare Nöroblastoma (NB2A) Hücre Kültürü Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması

Öğrencinin adı: Ece Nur KAYA

Danışman: Prof. Dr. Kamil VURAL

Anabilim Dalı: Farmakoloji Anabilim Dalı

Amaç: Bu projenin amacı bir mTOR inhibitörü olan Rapamisin adlı etken maddenin fare nöroblastoma hücre dizininde (NB2A) nörotoksik veya nöroprotektif etkilerinin araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda Rapamisin'in olası nörotoksik etkileri fare nöroblastoma hücre (NB2A) dizininde araştırıldı. Hücreler flask içinde DMEM eklenerek etüvde çoğaltıldılar. Rapamisin, stok çözelti kullanılmadan önce DMSO içerisinde çözüldü ve medyum ile seyreltildi. CellTiter-Glo® luminesans hücre canlılığı ölçüm yöntemi, kullanılarak doz yanıt eğrisi oluşturuldu. 1. gün, tüm kuyucuklara NB2A hücresi konularak 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra ilk üç kuyucuk hariç kalan tüm kuyucuklardaki medyum çekilerek farklılaşma medyumuna eklendi. Farklılaşma medyumuna içeren kuyucukların ilk üçü hariç (+ kontrol), diğerlerine farklı konsantrasyonlarda Rapamisin konuldu. Hücreler inkübe edildi ve 1 gün bekletildi. Daha sonra çukurlar Coomassie Blue ile boyandı ve image analiz programı kullanarak ölçümler gerçekleştirildi. Hücre proliferasyonunun değerlendirilmesi amacıyla MTT ve Rapamisin'in nöron kültürü üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla klorprifos 25 µM konsantrasyonlarda eklenerek NTT testi yapıldı. İstatistiksel analizler gerçekleştirildi ve $p < 0,05$ anlamlılık düzeyi olarak seçildi.

Bulgular: NTT testinde anlamlı olmayan nörit uzaması, MTT testinde ise anlamlı hücre proliferasyonu azalması gözlemlendi. Nörotoksik etkili klorprifos ile de NB2A hücrelerinde istatistiksel olarak doza bağlı bir şekilde azalma gözlemlendi.

Sonuçlar: Rapamisin adlı etken maddenin nörotoksik olduğu, nöronal harabiyet ve ölüme sebebiyet verebileceği anlaşılmıştır. Fakat kullandığımız hücre kültürünün kanser hücrelerinden oluşmasından dolayı antikanserojen etki gösterebileceği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Rapamisin, fare, nöroblastoma, hücre kültürü, mTOR, MTT, NTT, Klorprifos, nörotoksisite, nöron, nörodejeneratif hastalıklar

Title: Investigation of the Effects of Rapamisin on Mouse Neuroblastoma (NB2A) Cell Culture

Student: Ece Nur KAYA

Advisor: Prof. Kamil VURAL, MD

Department: Pharmacology Dept.

2. ABSTRACT

Aim: The aim of this study is to investigate the neurotoxic or neuroprotective effects of an active substance called Rapamycin, which is an mTOR inhibitor, in mouse neuroblastoma cell line (NB2A).

Material and Methods: In present study, the possible neurotoxic effects of Rapamycin were investigated in mouse neuroblastoma cell (NB2A) array. Cells were cultivated in an incubator by adding DMEM in a flask. Rapamycin was dissolved in DMSO and diluted with medium before using the stock solution. A dose response curve was generated using the CellTiter-Glo® luminescence cell viability measurement method. On day 1, NB2A cells were added to all wells and incubated for 24 hours. After 24 hours, the medium was withdrawn from all the wells and except the first three wells and the differentiation medium was added. Except for the first three (+ control) wells containing differentiation medium, the others were loaded with Rapamycin at different concentrations. Cells were incubated for 1 day. Then the wells were stained with Coomassie Blue and measurements were made using an image analysis program. In order to investigate the effects of Rapamycin on the cell proliferation and neurotoxicity, MTT and NTT tests were performed by adding chlorpyrifos at 25 µM concentrations. Statistical analyzes were performed and $p < 0.05$ was chosen as the significance level.

Findings: In the NTT test, neurite prolongation was not significant, and in the MTT test, significant cell proliferation reduction was observed. A dose-dependent decrease in NB2A cells was also observed with neurotoxic chlorpyrifos.

Results: It has been shown that our active ingredient, rapamycin, is neurotoxic and can cause neuronal damage and death. However, since the cell culture we used is

composed of cancer cells, it was thought that it might have an anticarcinogenic effect.

Keywords: Rapamycin, mouse, neuroblastoma, cell culture, mTOR, MTT, NTT, Chlorpyrifos, neurotoxicity, neuron, neurodegenerative diseases.



3. GİRİŞ VE AMAÇ

Sinir bilim hastalıkları, nöronların kaybı ile oluşan ve sonucunda SSS işlevinin bozulmasına neden olan bir hastalık grubudur. Bu grup hastalıklardan en fazla görülme sıklığı olan Alzheimer hastalığıdır. Bu tip hastalıkların tedavisi genellikle semptomatiktir ve kısa bir süreliğine semptomlar giderilir. Ancak hastalığın progresyonu devam eder. Son yıllarda bu hastalıkların tedavisinde yeni yaklaşımlar aranmaktadır. İlk olarak antifungal etkisiyle kullanılan Rapamisin daha sonra bağışıklık sistemini baskılayıcı ve antitümör etkisi keşfedilmiştir. Günümüzde antifungal olarak kullanılsa da Rapamisin ve analogları, organ naklinde doku reddini önlemek için, renal kanser tedavisinde monoterapi olarak kullanımı FDA tarafından onaylanmıştır.

Bu çalışmada temel olarak Rapamisin'in fare nöroblastoma hücrelerinde (NB2a) nörotoksikite taramasıyla, nörotoksik veya nöroprotektif etkilerini izlemek için uygun konsantrasyonlarda nöronlardaki değişiklikleri, üreme ve hayatın sonlanması gibi görevleri, hücre içi olarak incelenmiştir. Nörotoksikite yoksa nörotoksikite bilinen ve organofosfatlı bir insektisit olan klorprifos kullanılarak NB2a hücrelerinde nörotoksik hasar oluşturularak Rapamisin'in bu nörotoksikiteyi önleyici veya geri döndürücü muhtemel etkileri gözlenmeye çalışılmıştır.

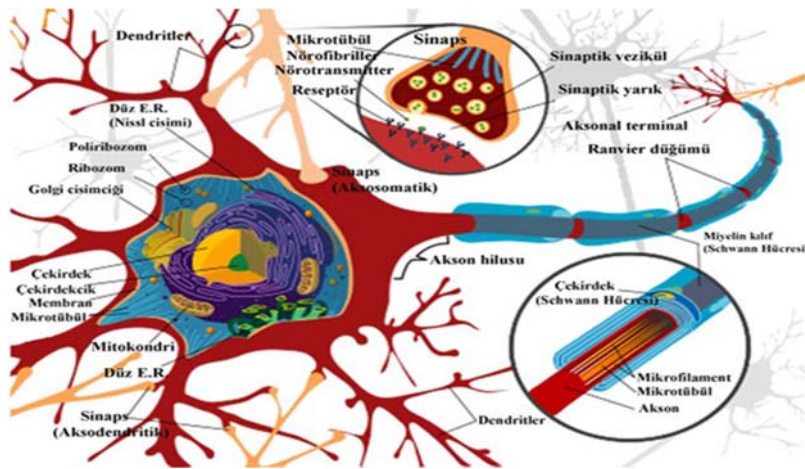
4. GENEL BİLGİLER

4.1. Nöron (Sinir Hücresi)

SSS ve periferik SS olmak üzere 2 bölümden meydana gelmektedir. Bu sistemdeki işlevselliği olan hücrelere sinir hücresi yani nöron denilir. Bu hücreler de genel olarak hücre gövdesi, dendritler ve akson ismiyle üç bölümden meydana gelirler (Keierszenbaum, 2006).

Nöronlar diğer hücrelerden farklı birtakım özelliklere sahiptir ve yüksek miktarlarda polarize haldedirler. Sinyallerin iletilebilmesi için hücre işlevlerine göre bölümlerden oluşmaktadır. Hücre gövdesi hücre hacminin çok az bir bölümüdür buna rağmen nukleus ve organelleri kapsar. Kalan kısım olan dendrit ve aksonlar ise bu gövdeden çıkan uzantılardır. Dendritler ince dallara ayrılırlar ve sinaptik bilgileri iletme için özel yapıdadırlar (Şekil 1).

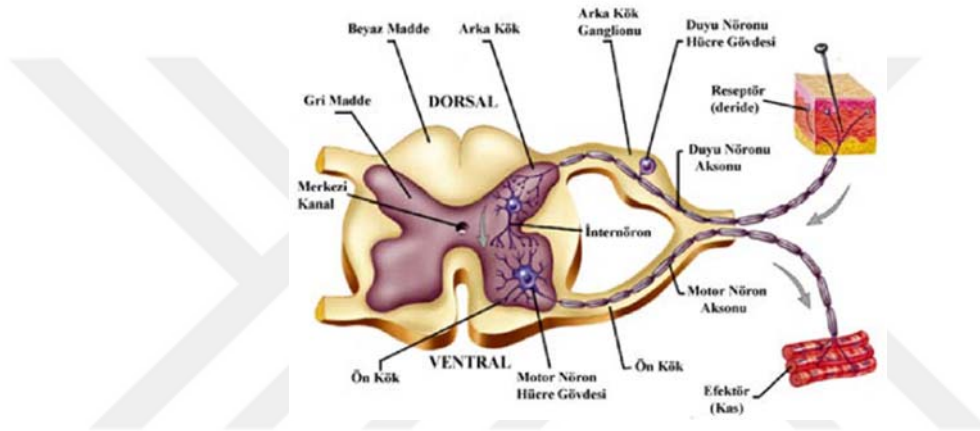
Akson ise elektriksel uyarıları iletir ve hedef kısımla sonlandırmayı yapar. Elektriksel uyarı, kanallar ve pompalar yardımıyla iç ve dış anlık iyon değişimleri sonucunda oluşmaktadır. Nöronlarda polarite özellikleri uzun süre devam edecek şekilde özelleşmiştir. Sinir hücreleri gövdedeki uzantıya göre dört, işlevine göre üç çeşitten oluşurlar (Kandel ve ark. 2000).



Şekil 1: Bir nöronun yapısı (4).

4.1.1. AKG(Arka Kök Gangliyonu) ve PDN(Primer Duyu Nöronları)

Spinal dorsal-ventral kök ve boynuzlardan meydana gelir. arka kök gangliyonu ise ön ve arka kökün buluşmasıyla oluşur(Şekil 2.2). AKG periferal duyu liflerini ihtiva eder. Periferal duyu nöronları psödounipolar yapıda olup tek aksona sahip olması ile nadir bir yapıdadırlar. Çıkan tek akson T şeklindedir. Aksonun bir kolu reseptör yapısı meydana getirir. Aksonun öteki kısmı merkezi sistemle alakalıdır. Duyu nöronları isimli bu nöronlar duyu sonlanmasıyla oluşan bu mesajları merkezi sinir sistemine iletirler (Şekil 2).



Şekil 2: Arka kök gangliyonu anatomisi (Weitz, 1998).

Hücre gövdesi metabolik fonksiyonları sağlamaktadır. Hücrenin içinde endoplazmik retikulum ve onların üzerinde de Nissl cisimcikleri vardır. Çekirdeğin içerisinde çekirdekçik ihtiva edilmektedir. Yan yana hücre gövdeleri bir araya gelerek arka kök gangliyonlarını meydana getirirler. Bu gangliyon nöronlarının küçük satellit hücreleri tarafından etrafı çevrilir (Öztürk, 1999).

4.1.2. Aksonal Taşıma

Nöronlar polarize haldedirler. Alışverişi aksonlarla ve dentritlerle meydana getirirler. Fonksiyonların oluşabilmesi için bu durum gereklidir. Polariteden, birçok protein ve hücrenin sitoskelet elemanları sorumludur (Setou, 2003). Nörofilamentler aksonlara mekanik destek oluşturur. Üç bölümden oluşan bir heteropolimerdir (Hoffman ve ark. 1984, Schlaepfer, 1987). Mikrotübüller ray şeklinde taşıma

gerçekleştirirler ve hücre iskeleti yapısını oluştururlar (Stephens ve Edds, 1976, Schwab ve Thoenen 1977). α , β tübülün heterodimerlerinden oluşmaktadırlar. İki bölümden oluşurlar ve bu sayede polarize durumda bulunurlar (Hirokawa, 1998).

4.1.3. Akson Hasarı

Periferik sinir sistemi hasarları mühim görev kaybına sebep olurlar. Bazen kalıcı olarak bazen de nöropatik ağrı gibi ikincil sorunlar nedeniyle önemli kayıplara neden olabilirler (Jaquet ve ark. 2001, Rosberg ve ark. 2005).

Sinir hasarlarından sonra meydana gelen iyileşme üç şekilde olabilir :

- a. Hasarlı aksonların rejenerasyonu ile tekrar innerve olması.
- b. Hasarsızların yeniden innerve hale getirilmesi.
- c. Bozulmuş fonksiyonların tekrar şekillenmesi (Fu ve Gordon, 1997).

Tahribatları sonrasında kesilmiş aksonların rejenere olması ve bağlantılarını yeniden oluşturabilmesi çeşitli nedenlere bağlı olarak farklılık gösterir (Navarro ve ark, 2007). 4 cm'den fazla tahribatlarda onarım neredeyse imkansızlaşır (Reyes ve ark. 2005). Periferik ve merkezi sinir sisteminde sinir yaralanmalarının sonucu birbirleriyle alakalıdır (Kaas, 1991, Wall ve ark, 2002). Siyatik sinir yaralanmasından sonra AKG'lardaki küçük nöronların büyüklere göre daha çok etkilendiği gözlenmiştir (Arvidsson ve ark. 1986, Ygge, 1989, Vestergaard ve ark. 1997, Groves ve ark. 1999, Tandrup ve ark. 2000). Bu sistemde üç adet dejenerasyon vardır.

4.1.4. Waller dejenerasyonu

Waller dejenerasyonu akson ve miyelin kılıflarının parçalandığı bir süreçtir (Fu ve Gordon, 1997). Dejenerasyon aksonun proksimal sinir güdüğünün kısa bir segmentinde oluşur (Beuche ve Friede, 1986). Dejenerasyonun artıkları Schwann hücrelerinin ve makrofajla ile yok edilir (Perry ve Brown, 1992, Stoll ve Muller, 1999).

4.1.5. Aksonal dejenerasyon

Aksonal dejenerasyon, farklı sebeplerle olabilir. Örneğin; sinir travması, toksik sebepler, inme, glokom gibi (Hilliard, 2009). Bu olay bir takım değişiklikler yapabilir (Coleman, 2005, Conforti ve ark, 2007). Eğer hücre ölmüşse tekrar eski hale dönülemez. Hasara sebep olan sıkıntılar bütünlük değişmeden uzaklaştırılırsa, akson haftalar ya da aylar sonra işlevine dönebilir (Navarro ve ark, 2007). Fakat bütünlük bozulmuşsa Waller dejenerasyonu devreye girer (Lunn ve ark, 1989).

Aksonal dejenerasyonu anlamak için en basit şekil aksonların transeksiyonudur. Transeksiyonla beraber en az üç morfolojik faz gözlenir. Akut dejenerasyon fazında aksonun proksimal ve distal kökleri akson kesilir kesilmez etkilenir (Kerschensteiner ve ark, 2005). Ardından distal aksonun sağlam kalan bölümünün elektiriksel aktiviteye devam ettiği latent faz oluşur (Tsao ve ark, 1994) ve yaralı kısımdan granüler dejenerasyon fazı gelişir (Lubińska, 1982, Griffin ve ark, 1995). Bu ardışık olaylar in vitro 12-24 saatte (Glass ve ark, 1993, Araki ve ark 2004, Wang ve ark, 2005), in vivo 24-48 saatte tamamlanır (Lubińska, 1977, George ve Griffin, 1994). Bazı koşulları farklılaştırmak bu süreyi değiştirebilir. Örneğin ortam sıcaklığını azaltmak ve ekstrasellüler kalsiyum düzeylerini düşürmek gibi değişiklikler periyodu önemli ölçüde uzatır (George ve ark, 1995, Tsao ve ark, 1999, Conforti ve ark, 2000).

N-tipi kalsiyum kanal blokörlerinin 4 gün sonraya kadar akson dejenerasyonunu önemli ölçüde geciktirdikleri anlaşılmıştır (George ve Griffin, 1994). Bu olay aksonal dejenerasyonun oluşabilmesi için hücre içi Ca^{+2} düzeylerinde artışın şart olduğunu ve bu artışın iyon spesifik kanallar vasıtası ile oluştuğunu belirtmiştir. Ancak hasarlı aksone hangi sinyal ile Ca^{+2} girişi sağlandığı belirlenememiştir. Yapılan birtakım çalışmalarda enerji azalması sonucunda NA/K/ATPaz aktivitesinde düşme veya tetrodotoksin (TTX) duyarlı Na kanallarının sinir hasarı sonucu zarar görmesi sebebiyle hücreye Na^{+} girişinde artışın olabileceği, bunun membranı depolarize edeceğini ve bu durumun içeriye Ca^{+2} akışını artırabileceği belirtilmiştir (Stirling ve Stys, 2010).

Hücre içine mühim kalsiyum deposu olan organellerden de intrasellüler Ca^{+2} salınımı olduğu anlaşılmıştır (Verkhatsky, 2005). Bu hücre içi depoların boş kalması sonucunda ekstrasellüler kalsiyumun hücre içi akışı ile tetiklenir. İstisna olarak

mitokondri seçici uniporter taşıma sayesinde sitozolik Ca^{+2} seviyelerini düzenleyebilir (Kirichok ve ark, 2004, Perocchi ve ark, 2010). Sinir hasarlarında kalsiyum, ryanodin ve IP_3 reseptörleri aracılığıyla endoplazmik retikulumdan salınır (Ouardouz ve ark 2003, Nikolaeva ve ark, 2005). Aksotomi durumunda endoplazmik retikulumun tüm kalsiyum rezervi hızla biter (Rigaud ve ark, 2009). Yapılan bütün bu çalışmalar hasarın büyüklüğü, oluşum hızı gibi parametrelerin akson hasarında önemli şekilde Ca^{+2} bağımlı olduğunu belirtmektedir.

4.1.6. Segmental demiyelinizasyon

Akson ya da miyelin kılıfta oluşur. Miyelin yenilenen bir kılıftır. Remiyelinize olan miyelinin ince ve kısa aralıkları oluşur (Atalay ve Üstün, 2004).

4.1.7. Nörodejeneratif Hastalıklar ve Aksonal Taşıma

Nörodejeneratif hastalıklarda ilk zamanlardan beri aksonal taşımanın bozulmuş olabileceği düşünülmüştür (Schwab ve Thoenen, 1977, Brimijoin, 1982). Diyabetik nöropatiden, Amiyotrofik Lateral Skleroza (ALS), Alzheimer hastalığı gibi bozukluklarda aksonal taşıma kusurları sebep olarak belirlenmiştir (Coleman, 2005, Chevalier-Larsen ve Holzbaur, 2006). Bu tip hastalıklarda nöron kaybı denilen sebebi tam anlaşılamayan mekanizmalar belirlenememiştir. Bu hastalıkların oluşmasının nedenlerinin birinin de aksonal taşımada oluşan bozukluklar olduğu açıklanmıştır (Almenar-Queralt ve Goldstein, 2001). Motor proteinlerdeki mutasyonlar bunlara neden olmaktadır. Motor protein kinesinde meydana gelen mutasyon, nörodejenerasyonun uyarılmasına sebebiyet verir. Nokta mutasyonlar ya da delesyonlar dynein görev hasarlarına neden olur (Chevalier-Larsen ve Holzbaur, 2006). ALS, Huntington gibi hastalıklarda aksonal taşımada yavaşlama belirlenmiştir (Perlson ve ark, 2010). ALS, Huntington ve Alzhemier gibi hastalıklarda protein agregatları oluşur ve bunlar motor proteinin ayrılmasına sebebiyet verdikleri açıklanmıştır. Süperoksid dismutaz (SOD1) mutantına ait deliller gözlenmiştir (Trushina ve ark, 2004, Ligon ve ark, 2005).

Mikrotübüllerde tirozinasyon, asetilasyonu gibi işlemler de aksonal taşımayı değiştirir (Dompierre ve ark, 2007, Konishi ve Setou, 2009). Adaptör proteinlerde oluşan hasarlar da nörodejeneratif hastalıklarda görülmüştür. Örneğin Bazı hastalıklardaki mutasyonlar ALS hastalığındaki aksonal nöropatinin nedenidir (Hadano ve ark, 2001, McCray ve ark, 2010). Mitokondrilerin gerekli olan kısımlara gidememesinden dolayı oluşan enerji ihtiyacı ve mitokondrial transportta oluşan hasarlar, bu tip bazı hastalıklarda gözlenmiştir (Pilling ve ark, 2006). Makrofaj zehirli madde birikimini yok eder ve yaşlanan organelleri parçalar. Otofagozom , Ag5 ya da At7 genleriyle oluşmaktadır. Bazı hastalıklarda otofagozom nedeniyle birikim oluşmaktadır (Ravikumar ve ark, 2004, Ravikumar ve ark 2005). Patojenitelerdeki en mühim kısım hücreyi hayatta tutacak veya apopitozise gidecek sinyallerin dengesindeki farklılıktır (Perlson ve ark, 2010).

4.2. Nörodejeneratif Hastalıklar

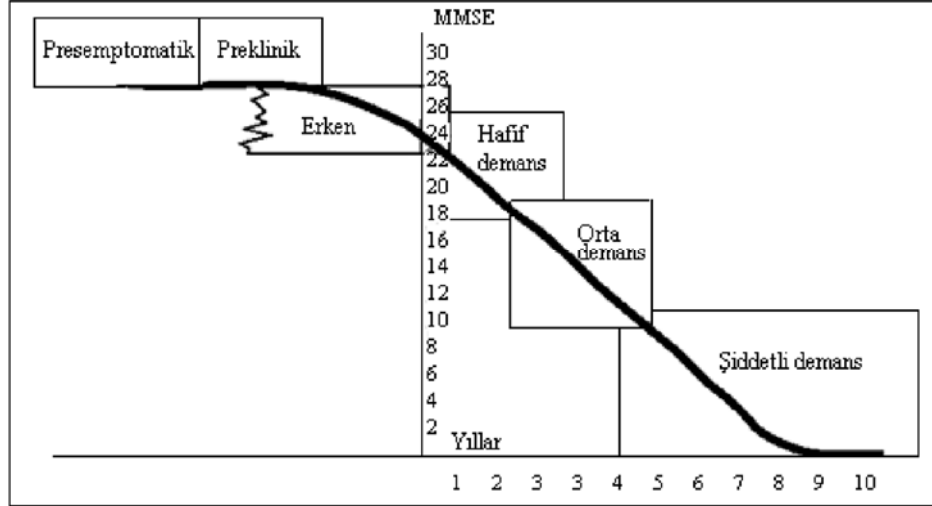
Nörodejenerasyon, nöronların hasarı olarak açıklanır; budan dolayı ortaya çıkan hastalıklara da nörodejeneratif hastalıklar denir. Bu hastalıkların, sadece semptomatik tedavileri mümkündür. Beyinde farklı bölgeleri etkilerler.

Tedavi yalnızca nörodejenerasyon oluşum mekanizmalarının anlaşılması ile mümkün olabilir. Nörodejeneratif hastalıklarda önemli gelişmeler moleküler düzeyde ilerlemeler, teknolojik gelişim kapsamına giren genomik araştırmaların sonuçlarına bağlı olarak oldukça ileri düzeyde yansımıştır (Beal ve ark, 2005).

4.2.1. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı (AH), bir çeşit demans çeşitidir. Demans; bellek kaybı, günlük yaşamın gerektirdikleriyle başa çıkamama, duygusal tepkilerde bozulma gibi belirtiler gösteren günlük yaşamın idame ettirilmesini olumsuz etkileyen ilerleyici, kronik bir beyin hastalığıdır.

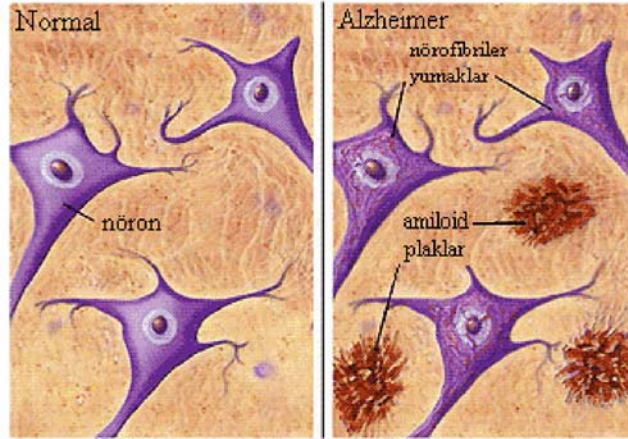
Bugün bilinen deliller Alzheimer hastalığının klinikte ortaya çıkan belirtilerine göre altı gruba ayrılarak değerlendirilmektedir(Şekil 3).



Şekil 3: Alzheimer hastalığının klinik evreleri (Topçuoğlu ve Selekler 1998).

Hastalığın nöronal dejenerasyonun bir akut faz cevabı olarak uyardığı düşünülmektedir. Bu sitokinlerde hızlı bir artışa sebep olur. Serbest radikaller de Alzheimer'a sebep veriyor olabilir.

Alzheimer hastalığında (AH) önemli süreçlerden biri, yoğun protein tortularının beyindeki nöronlarda birikmesidir. Nörofibriler tau adındaki bir proteinden oluşmaktadır (Şekil 4).



Şekil 4: Hastalıkta amiloid plak ve nörofibriler yumak (Topçuoğlu ve Selekler 1998).

AH nöro iletiler düzeylerinde önemli farklılıklar vardır. Bunlar tedavide önemli olmakla beraber, bu hastalığa sahip olan insanların beyinlerindeki daha önemli değişikliklere nazaran ikincildir.

Normalde NMDA reseptörünü uyaran glutamat ile bellek ve öğrenmeyi kolaylaştırmak için kısa, ani salınımlar yapar. AH glutamat aralıksız salınır. Bu durum bellek ve öğrenme süreçlerini aksatmaya neden olur ve nöronal ölümünle sonuçlanır (Topçuoğlu ve Selekler 1998).

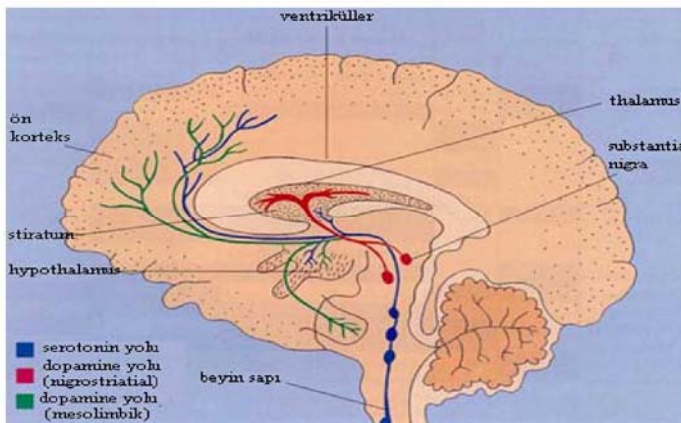
4.2.2. Parkinson Hastalığı

Parkinson Hastalığı (PH) ikinci en yaygın nörodejeneratif hastalıktır. Parkinson, genellikle yaşla ilerleyen bir klinik tablo göstermektedir. En önemli belirtilerden biri tremordür. Daha çok ellerde görülür, tremor genellikle hareket ve uyku sırasında kaybolur.

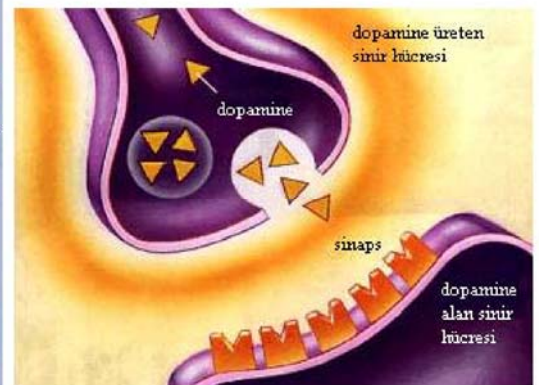
Bu hastalıkta başka bir belirti ise kas tonusundaki artıştır. Hastada bir katılaşma vardır. Hasta hareket ettirilmeye çalışıldığında bir direnç gözlemlenir. Yürüyüş yavaş adımlarla, kolları sallamadan ve vücut öne eğik şeklindedir. Ayrıca mimiklerde azalma, monoton ve kısık sesle konuşma da eşlik eder. Her vakada rastlanmamakla birlikte depresyon ve ileri devrelerde demans da gözlemlenebilir. Bu tablo herkeste farklılık gösterir. Bazen hastalık sadece uzun yıllar tremor ve kasılmayla kalır. Bu vakanın adı Hemiparkinsonizm'dir. Bazı durumlarda tremor olmadığı halde hareketlerde yavaşlama, adalelerde katılaşma ve duruş bozuklukları görülür ve hızla ilerleme gösteren hastalar da gözlenir.

Bu hastalıkta substansiya nigra pars kompakta daki (Şekil 4) dopamin üreten hücreler zarar görür ve eksilir. Bu hücrelerin hasara uğramalarının nedeni belli değildir. Corpus striatumda dopamin üretilmediğinden tremor, kassertliği, hareket yavaşlığı ve postür bozukluğu gözlenir.(Şekil 5).

(a)



(b)



Şekil 5: a) Substantia nigra hücreleri striatuma uzanır. b) Dopamin reseptörlere iletim sağlar.

Parkinson dopaminin azalmasıyla meydana gelen bir hastalık olduğu için tedavide de dopaminin yerine konmasına bağlı bir tedavi yolu izlenmektedir. Ayrıca cerrahi tedavi de olabilmektedir (Weiner ve ark, 2006, Şahin ve Akbostancı, 2008).

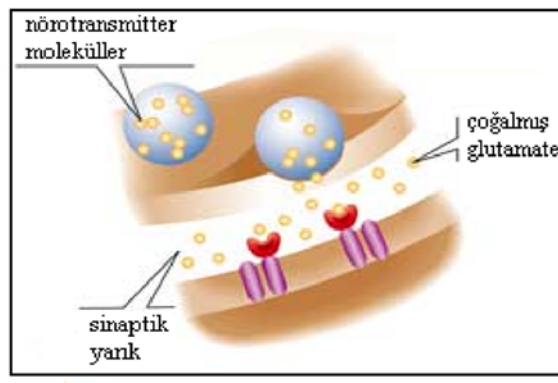
4.2.3. Amyotrofik Lateral Skleroz

Amyotrofik lateral skleroz (ALS), beyin kabuğu, beyin sapı ve omurilikteki motor nöronların ölmesiyle gözlemlenen bir hastalıktır. ALS adı bir taraftan kas atrofisine ayrıca piramidal yolun tutuluşuna işaret eder. Motor nöron hastalığı diye bahsedilenve hastalıktaki belirtileri gösteren hem birinci hem de ikinci motor nöronun tutulmasıdır. İkinci nöron tutulması kranial çekirdeklerin ve medulla spinalisteki önboynuz hücrelerinin dejenerasyonu sebebi ile olur (Şekil 6) (Miller ve ark, 2004).



Şekil 6: Medulla spinalisteki dejenerasyon

ALS'nin nedeni bulunamamaktadır. Hastalık üzerinde yapılan çalışmalar ayrıca dejenerasyonda glutamatın rolünü belirlemeye de çalışmıştır. Glutamat seviyeleri, hastalarda daha fazladır. Ortamda çok fazla ve uzun süreli glutamat olması sinir hücrelerinin ölmesine neden olarak gösterilmiştir. (Şekil 7) (Miller ve ark, 2004).



Şekil 7: ALS hastalarında glutamat seviyelerindeki artış.

Vücudun sağlam hücrelere saldırması sonucunda otoimmün sisteminin de bunu cevaplama motor nöron dejenerasyonunun bir sebebi olabilir. Birtakım araştırmacılar, antikörlerin direkt veya indirekt sinir hücrelerinin işlevlerini azalttığı hakkında bir teori ileri sürmüştür (Miller ve ark, 2004).

ALS'ye ait ilk belirtiler bazen farkedilmeyebilir. İlk belirtiler, kaslarda seğirme, titreme, kas zayıflığıyla birlikte kolların veya bacakların etkilenmesidir. ALS'ye yakalanan hastaların yaklaşık %25 kadarında ise daha başka belirtiler gözlenmiştir. En sık konuşma zorluğu ve net konuşamamadır (Miller ve ark, 2004).

Hastalıkta kasların etkilenmesinden sonra, ilerleyen aşamalarda tüm vücudu etkilemeye başladığı görülür. Alt motor nöronlarının da hasar görebilir bu da kaslarda oluşan zayıflık ve kramp gibi belirtiler sayesinde belirlenir. Bir hastaya ALS tanısının konulabilmesi için, bu hasarların başka bir nedenden dolayı olmadığına emin olunmalıdır (Miller ve ark, 2004).

ALS'nin gelişimi ve yayılması hastadan hastaya değişir. Fakat sonuçta hastalığa yakalanan kişiler ayağa kalkamaz, yürüyemez, ellerini ve kollarını kullanamaz. Çiğneme güçlükleri çektikleri için normal bir şekilde yemek yiyemezler buna bağlı olarak da yemek sırasında hastanın boğulma riskini artır. Hareket edemeden kaynaklı kilo problemleri gözlenir (Miller ve ark, 2004).

ALS hastalarından normal popülasyona göre omurilik sıvısında bulunan üç proteinin miktarının daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bu proteinlerin seviyelerine bakıldığında, bu değerlerin ALS tanısında %95 oranında kesin sonuç verdiğini göstermiştir (Miller ve ark, 2004).

4.3. Klorprifos Ve Nörotoksisite

Klorprifos [0,0-diethyl-0-(3,5,6-trichloro-2-pyridinyl) phosphorothioate], zararlılara karşı yaygın olarak kullanılan bu yüzden de hepimizin maruz kaldığı

organofosfatlı bir insektisittir (Hunter ve ark, 1999). Klorprifosun metabolitleri, klorprifos-okson ve 3,5,6- trikloro-2-ridinol klorprifosdan daha toksiktir (Hunter ve ark, 1999, Muscarella ve ark, 1984).

Klorprifosun metaboliti, klorprifos-okson sinir kavşaklarında asetilkolin esterazı inhibe ederek ciddi kolinerjik toksisite oluşturmaktadır (Li ve ark, 1995, Bigbee ve ark, 1999). In vivo ve in vitro deneysel çalışmalarda, akut ve kronik organofosfat uygulamalarının sonucunda ortaya çıkan toksik etkilerde oksidatif doku hasarının rol oynadığı belirlenmiştir (Li ve ark, 1995, Bigbee ve ark, 1999). Serbest radikaller, özellikle DNA, protein ve hücre fosfolipitlerinin çoklu doymamış yağ asitleri olmak üzere organik ve inorganik bileşiklerle reaksiyona girerler. Özellikle DNA'ya saldıran serbest radikaller önemli hasarlara sebebiyet verirler. Bu zararlar karsinojenik mutasyonlara neden olabilir (Kazanç, 1997). Karsinojenik ksenobiyotikler, hücre içindeki sitokrom p450, peroksizomlar ve mitokondrideki enzimatik sistemleri değiştirerek veya indükleyerek serbest radikaller oluştururlar. Ek olarak, serbest radikalleri toplayarak hücreyi koruyan enzimatik veya enzimatik olmayan sistemleri tüketirler veya inhibe ederler veya taşıyabileceklerinden fazla yük yüklerler. Hücrede oksidatif hasar oluşturarak lipit peroksidasyonu, deoksiribonükleik asit hasarı veya protein değişikliklerine neden olurlar. Bunlar da azalmış gap junction aracılıklı haberleşme, transkripsiyon faktörlerinin (AP-1, NF-kB) aktivasyonu, intrasellüler kalsiyum ve pH değişiklikleri veya hücre ölümü gibi hücre fonksiyon değişikliklerine neden olabilir (Stephen ve ark, 1997).

Yapılan çalışmalarda, organofosfat uygulanmasını takiben karaciğer, beyin, tiroid gibi çeşitli doku örneklerinde lipit peroksidasyonunun bir göstergesi olan malondialdehit (MDA) düzeyinde artış ve enzimatik antioksidan savunma elemanlarından süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PDH) ve glutatyon redüktaz (GR) aktivitelerinde farklılıklar gözlenmiştir (Li ve ark, 1995, Bigbee ve ark, 1999, Stephen ve ark, 1997).

Klorprifosun bu bütün etkilerinden başka kolinesteraz inhibisyonundan bağımsız olarak nörotoksisite oluşturduğu söylenmiştir. Bu iddia çeşitli deney hayvanlarında ve hücre hatlarında yapılan çalışmalarla desteklenmiş ve klorprifosun gelişimsel nörotoksik etkilere sahip olduğu belirlenmiştir (Jett ve ark, 2001). Bu göstergeler Amerika'da Çevre Koruma Ajansının klorprifos kullanımını sınırlamasına neden olmuştur (Schuh ve ark, 2002). Daha sonrasında yapılan laboratuvar çalışmaları da

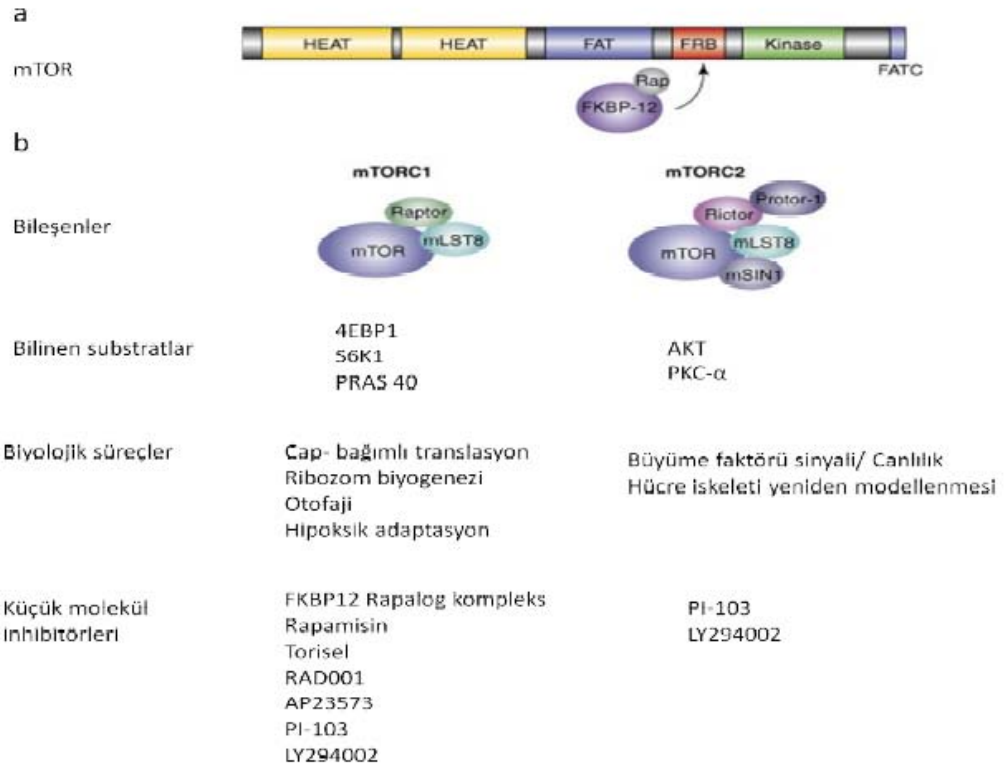
klorprifosun nöronal proliferasyonu inhibe ettiğini (Sachana ve ark, 2001) ve kognitif fonksiyonları bozduğunu belirlemiştir (Jett ve ark, 2001, Schuh ve ark, 2002).

Birtakım bilim insanları klorprifosun gelişimsel nörotoksik etkilerinin asetilkolinesteraz inhibisyonu ile olmadığını ; çalışmalarında uyguladıkları kolinerjik reseptör antagonistleriyle bu etkileri geri döndüremediklerini ortaya çıkarmışlardır (Garcia ve ark, 2002). Yapılan in vivo çalışmalar ile hücre kültürü modellerinde yapılan çalışmalar birbiri ile uyumlu sonuçlar oluşturmuştur. Örneğin Das ve Barone 1999 yılında yaptıkları çalışmada klorprifosun PC12 hücre hattında nörit uzamasını asetilkolinesteraz inhibisyonu olmadan da inhibe ettiğini ortaya koymuşlardır (Das ve Barone, 1999). Yapılan bazı çalışmalarda ise ilacın hem antimitotik hem de proapoptotik bir ajan olduğu söylenmektedir (Slotkin ve Seidler, 2012). Klorprifosun nöronlarda meydana getirdiği hasar sonrasında nörit uzamasının durması, proliferasyonun inhibisyonu ile birlikte nekrotik ve apoptotik süreçlerin başlaması beklenmektedir.

4.4. mTOR SİNYAL YOLAĞI

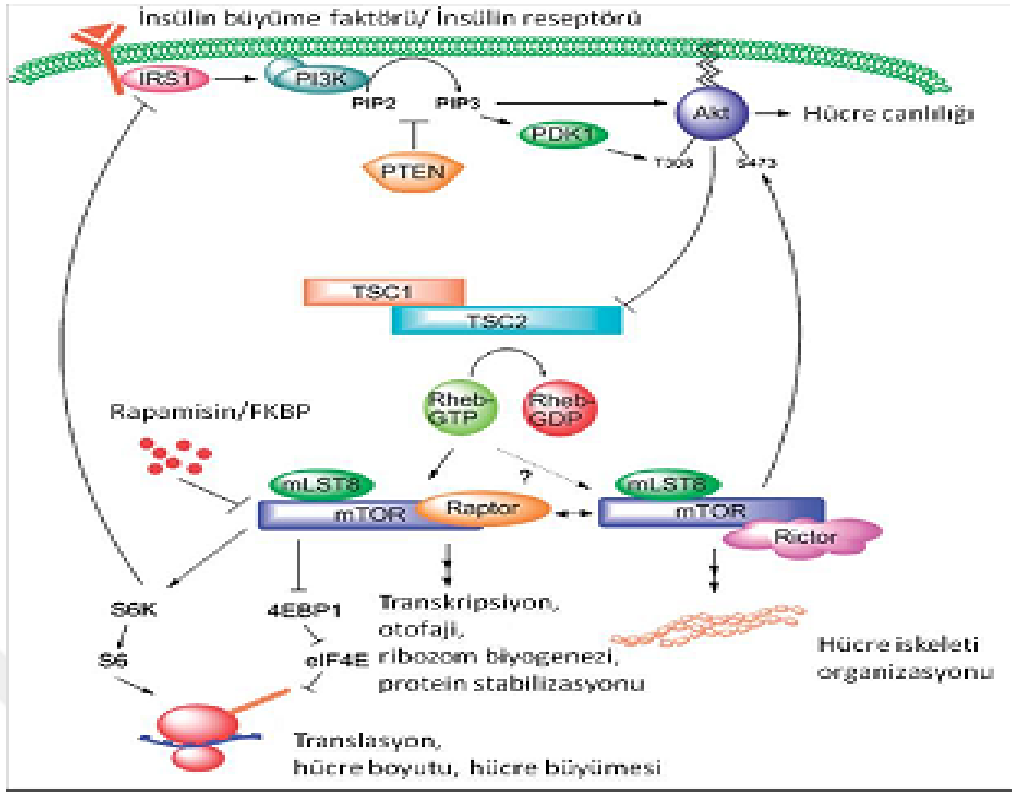
mTOR proteini 289kDa ağırlığında bir serintreonin kinazdır, mTORC1 ve mTORC2 proteinlerinden meydana gelir (Guertin ve Sabatini, 2007). mTORC1 büyümeyi, anabolik olayların etkisini artırarak ve katabolik olayları sınırlayarak gerçekleştirmektedir (Şahin). mTORC1 kompleksi beş bölümden meydana gelir: (Peterson ve ark, 2009). (Şekil 8).

Rapamisin'in memeli hedefi (mTOR) sinyal yolağı, hücre içi ve dışı sinyalleri toplar ve hücre metabolizması, büyümesi, çoğalması ve kurtuluşunda merkezi bir düzenleyicidir (Laplante ve Sabatini, 2009).



Şekil 8: mTOR organizasyonu ve sinyal kompleksleri. (a) mTOR'un yapısının şematik çizimi. (b) mTORC komplekslerinin özeti ve fonksiyonları, Chiang ve Abraham, 2007 çalışmasından modifiye edilmiştir.

mTORC1; ökaryotik başlatma faktörü 4E (eIF4E)-bağlanma proteini 1 (4E-BP1) ve p70 ribozomal S6 Kinaz 1 (S6K1)'i fosforilayarak protein sentezini tetikler (Şekil 9). 4E-BP1'in fosforilasyonu sonucunda cap-bağımlı translasyon (Richter ve Sonenberg, 2005) ve S6K aktivasyonu sonucunda da mRNA biyogenezi, cap-bağımlı translasyon ve uzama, ribozomal protein translasyonu artar (Ma ve Blenis, 2009).

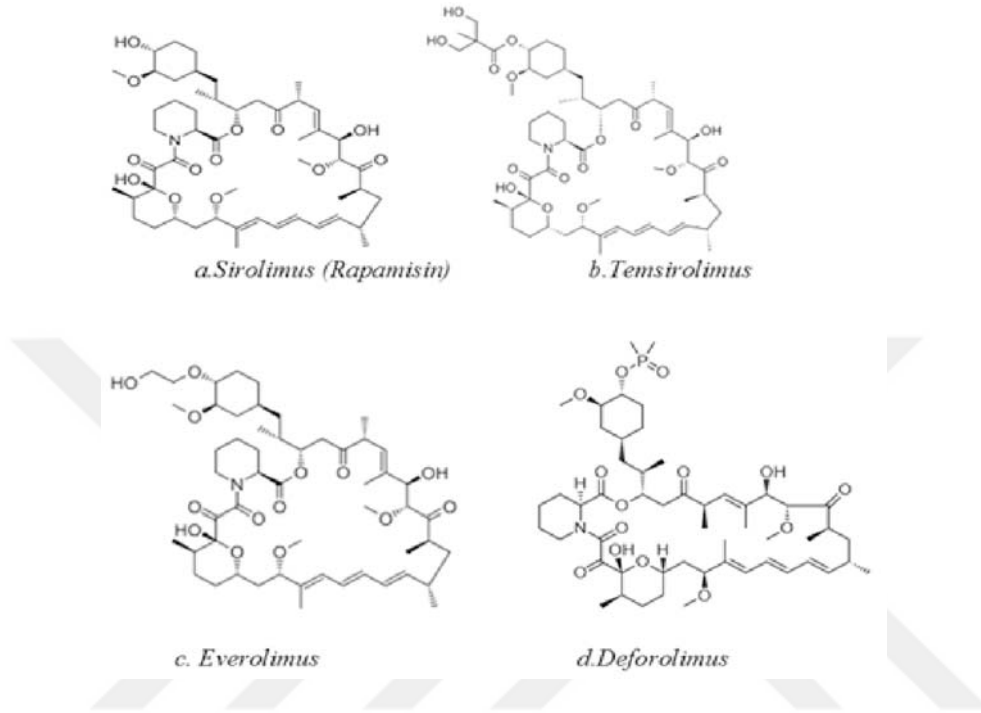


Şekil 10: Rapamisin'in mTOR sinyal yolağı üzerindeki etkisi. Rapamisin mTORC1'in aktivasyonunu inhibe etmektedir. mTORC1'in baskılanması sonucu alt yolağında bulunan S6K ve 4EBP1 proteinlerinin fosforilasyonunu baskılanmakta ve transkripsiyon, ribozom biyogenezi gibi olaylar gerçekleşmemektedir (Corradetti ve Guan, 2006)

Rapamisin, *Streptomyces hygroscopicus* tarafından üretilen, makrosiklik bir laktondur (Şekil 11) (Berrak, 2014).

Böbrek transplantasyonu araştırmaları sırasında, rapamisinin siklosporin ve kortikosteroidler ile beraber alınmasıyla akut reddedilmenin azaldığı gözlenmiştir. Böylece kortikosteroidler erkenden sonlandırılıp, siklosporin alımı azaltılmıştır (Üstünes, 2011). Rapamisin organ transplantasyonu rejeksiyonunun profilaksisinde kalsinörin inhibitörleri ve glukokortikoidlerle birlikte endikedir (Kahan ve ark, 1999). Kalsinörin inhibitörlerine bağlı nefrotoksitesisi olan ya da bu riski taşıyan hastalarda, kalıcı böbrek hasarından korunmak için rapamisin glukokortikoid ve mikofenolat mofetil ile birlikte kullanılmaktadır (Demirci ve Töz, 2008). Bu yüzden rapamisin kullanımı için yeni bir endikasyon da, hasta stabil dahi olsa böbrek fonksiyonlarını korumak için kalsinörin inhibitörlerinden uzak durulmalıdır (Stegal ve ark, 2003)

Kaposi sarkomu hastalarına 6 aylık bir süre için rapamisine tedavisi önerilmektedir (Atalay ve ark, 2007, Strimpakos ve ark, 2009). Rapamisinin yan etkileri diyare, pyelonefrit, stomatit, solunum yolu enfeksiyonları olarak belirlenmiştir. Ciddi advers etkilere ise rastlanmamıştır (Agulnik, 2012).



Şekil 11: mTOR inhibitörlerinin kimyasal yapıları

4.4.1.2. Temsirolimus

Temsirolimus mTOR protein ailesinin diğer üyesidir. Temsirolimusun tümöre karşı faydası belirtilmiştir (Frost ve ark, 2004). Tek başına temsirolimusun verildiği tedavilerde uygun görülen dozun %92'si kullanılabilir (Hudes ve ark, 2007). Kötü prognozlu metastatik böbrek hücreli kanserin birinci basamak tedavisinde kullanılmaktadır (Moltzer, 2008).

Sahip olduğumuz donelerin yetersizliğinden temsirolimus, daha önce immünoterapi almış hastalarda değerlendirilememektedir (Halbert ve ark, 2006). Tekrarlayan malign gliomalarda erlotinib ile kombinasyonunun uygun olabileceği düşünülmektedir. Bu kombinasyonun etkinlik ve güvenlik çalışmaları yapılmaktadır (Robins ve ark, 2007).

Ciddi yan etkileri stomatit ve yorgunluk bunmların dışındabulantı, kusma ve nefes darlığıdır (Agulnik, 2012).

4.4.1.3. Everolimus

Everolimus makrolit yapısına sahip immünosupresandır. Kalsinörin inhibitörününtek başına alınmasından fazla böbrek toksisitesi yapmaktadır. Bu durum bize mTOR inhibitörleri ile kalsinörin inhibitörleri arasındaki ilaç etkileşiminin toksisiteyi artırırken organ reddini azalttığını düşündürmektedir (Eisen ve ark, 2003).

Everolimusun astrositoma, meme kanseri, pankreatik nöroendokrin tümör, renal anjiyomiyolipomda da kullanılabilceği ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır (Yao ve ark, 2008). Ticari müstahzarlar CERTICAN® ve AFINITOR®' dur. Daha önce Femara ve Arimidex kullanmasına rağmen progrese olan 724, ER/PR(+) ve HER2(-) hasta üzerinde yapılan çalışmalarda progresyonsuz sürenin 4,6 ay olduğu görülmüştür. Ayrıca Afinitor pankreas tümörü ve renal hücre kanserinde kullanılmak üzere EMEA tarafından 03.08.2009 tarihinde onay almıştır. Ciddi advers etkileri arasında anemi ve yorgunluk dışında hipokalemi, lenfopeni ve kusma yer almaktadır (Agulnik, 2012).

4.4.1.4. Deforolimus

En yeni mTOR inhibitörüdür. Ayrıca ridaforolimus olarak da bilinmektedir (Şekil 11) (Cantor, 2009). İlerlemiş solid kanserli hastalarda deforolimusun farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri belirlenmiştir. (Yüksel ve ark, 2012, Mita ve ark, 2008).

Ciddi advers etkileri anemi, trombositopeni, hipofosfatemi, hiponatremi, hipokalemidir (Agulnik, 2012).

4.5. Nörotoksisite ve Nöroprotektivite Deneyleri

Sinir sistemi nöronlar ve nöroglial hücrelerden oluşmaktadır. Nöronlar akson ve dentritlere sahip olması ve bunların yardımıyla diğer hücreler ile iletişimi sağlamasıyla farklılık göstermektedir. Dentritler ise nöron yüzeyini artırması sayesinde diğerlerinden input almasını kolaylaştırır. Hücrenin toksik bir etkiye maruz kalması durumunda perikaryonun direkt etkilenmesi veya trofik faktörlerin kaybolmasına bağlı sinapsın bozulması yozlaşmanın başlamasına neden olur. Dejenerasyon süreci mekanizmanın etkisine bağlı hızlı veya yavaş gerçekleşebilir (Harry ve ark, 1998, Brat ve Brimjoin, 1992). Nöropati target esteraz (NTA) ölçülerek geç kalan nörotoksik etki bulunabilir (Ehrich ve ark, 1994). Herhangi bir maddenin nöron üzerinde yarattığı zararlı etkiyi düşüren veya sonlandıran moleküllerde nöroprotektif etkilerden bahsedilir.

Kültür ortamı için bazı koşullar mevcuttur. Nörotoksik bileşikler nörit uzamasını inhibe ederler (McLean ve ark, 1998). Sinir hücrelerinin değişmesiyle oluşan nörit hücrenin geliştiğini belirtir (Flaskos ve ark, 1998). Hücreyi öldürmeden kötü etki oluşturan moleküllerin bulunmasında bu ölçüm sıkça tercih edilmektedir.

4.5.1. Nörotoksisite Tarama Testi (NTT)

Nörotoksik maddelerin hücre içindeki etkisi selektif olup, aynı zamanda spesifik duyarlılık bileşiğinin ekstrasellüler konsantrasyonuna da bağlıdır. Genellikle ana bileşiğe bağlı toksik etki ortaya çıksa da, bazı durumlarda metabolitlerin de toksik etkileri görülebilmektedir (Veronesi ve Ehrich, 1993, Bottenstein ve Sato, 1995, Kimes ve ark, 1974). Hücre içinde sinir hücrelerinin asıl işlevi olan nörit uzaması, bazı önemli vakalara bağlı olup, nörit için özel yapısal moleküllerden dolayı gelişmektedir. Biyolojik, kimyasal ve çevresel zararlı moleküller uzamayı engellemektedir. Böylece nörit uzamasının izlenmesi yeni moleküllerin nörotoksik faaliyetlerini bulmak adına kullanılabilir (Harry ve ark, 1998, Abdulla ve Campbell, 1993, Stone ve ark, 2001, Shea, 2001).

Bu çalışmada rapamisinin fare NB2a hücrelerinde nörotoksisite tarama testiyle beraber etkilerini görmek adına uygulanan konsantrasyonlarda sinir hücrelerindeki etkileri, üreme ve yaşamın sonlanması gibi davranış fonksiyonları, hücre içinde araştırılmıştır.

4.5.2. MTT Boyama

MTT hücre yaşayabilirliğine bakılması için uygulanan kolorimetrik bir metottür. Deneyin esası; formazan oluşumuyla canlılığın hesaplanmasıdır (Sjogren ve ark, 2000). MTT, kültürde mitokondriyal aktivitesi süren yaşayan hücrelerin kantitasyonunu yapar. Fazla kullanıldığı yerler: Sitokinlerin, büyüme faktörlerinin medyum komponentlerinin hücreler üzerine etkilerinin araştırılması ve sitotoksik ajanların etkinliğinin test edilmesidir. Yapılan testler ve bunların sonucunda oluşan moleküllerin farklı renk reaksiyonu spektrofotometrik olarak okunup kantite edilir (Mosman, 1983).

MTT, aktif olarak absorbe olur ve mitokondriyal redüktaz enzimi ile formazan'a indirgenir. Meydana gelen renkli çözeltinin miktarı 570 nm dalga boylarında ölçülerek bulunur. Bu mekanizma sadece canlı hücrelerde meydana geldiği için, hücre canlılığının kıstası olarak güvenle kullanılmaktadır (Sjogren ve ark, 2000).

5. MATERYAL VE METOD

Çalışma MCBU Tıp Fak. Farmakoloji anabilim dalı Hücre Kültürü Laboratuvarında tamamlanmıştır.

4.1. Materyal

Fare NB2a nöroblastom kanser hücreleri, ECACC'den sağlanacaktır. Tüm kimyevi maddeler Sigma'dan (St. Louis, ABD) elde edilecektir. Kültür ortamında kullanılan tüm malzemeler Falcon/Fred Baker'dan (Runcorn, Cheshire, UK), gentamisin, (GentaR 20 mg ampul, I. Ethem, İstanbul, Türkiye) temin edilecektir.

4.2. Yöntemler

4.2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

Nöroblastoma hücreleri, flask içinde, çoğalma medyumumu;%5 horse serum, %5 fetal calf serum, %1 penisilin/streptomisin solüsyonu (10000 U/10mg) ve %0,1 gentamisin (50 mg/ml) içeren 4500 g glukoz içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ile 37^C ve %5 CO₂ koşullarını sağlayan etüv içinde hücreler kültür ortamına alınarak çoğaltıldı (Şekil 12).

Rapamisin, (R8781-200UL SIGMA) stok çözelti (1 µg/ml) için, kullanılmadan hemen önce %100 dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözüldü ve hücre kültürü deneylerinde %0,2'lik bir nihai DMSO konsantrasyonu olacak şekilde medyum ile seyreltildi. Daha sonraki dilüsyonlar için kültür medyumunu kullanıldı.



Şekil 12. Flask içindeki nöroblastoma hücrelerinin etüvde çoğaltılması

4.2.2. Hücre Canlılığı ve Proliferasyonu

CellTiter-Glo® luminesans hücre canlılığı ölçüm yöntemi (Promega, Madison, WI), Rapamisin 'in hücre proliferasyonu değerlendirmek için kullanıldı. İlk gün, kuyulara 100ul hacimde proliferasyon medyumunu içerisine tüm kuyularda 15 000 hücre olacak şekilde konularak 24 saat ortama alışması için kuyulara bırakıldı. (Şekil 13) Daha sonra, kuyucuklara Rapamisin (1-100 uM), ya da çözücü (DMSO, %0,2) eklendi. Rapamisin içermeyen proliferasyon medyumunu + kontrol ve herhangi bir hücre ya da Rapamisin içermeyen medyum ise - kontrol olarak kullanıldı. Welllerin olduğu plakalar bu şekilde yeniden 24 saat inkübasyondan sonra deneylere başlandı. Bu yöntem, mevcut ATP'nin miktarına bağlı olarak canlı hücre sayısını bulma esasına dayanmaktadır. CellTiter-Glo® substrat çözeltisinin eklenmesi, hücre parçalanmasına ve ATP miktarıyla orantılı bir luminesans sinyalin görülmesine sebebiyet verir. Hücre canlılığının değerlendirilmesi, metabolik olarak aktif hücreler tarafından salınan ATP varlığında, lusiferinin oksidasyonunu katalize eden enzim olan Ultra-Glo-lusiferaz aktivitesindedir. Kısaca, 100 µl CellTiter-Glo® reaktif karışımı, kuyucuklardaki medyumunu

uzaklaştırmadan doğrudan hücrelere eklendi. İçerik, lizisi oluşturmak için 2 dakika boyunca karıştırılıp luminesans sinyali stabilize hale getirmek için oda sıcaklığında 10 dakika süreyle beklendi. Daha sonra plaka, GloMax® 96 mikroparka luminometresi (Promega, Madison, WI) tarafından okundu (Şekil 14,15) ve ölçülen luminesans sinyale göre, Rapamisin konsantrasyonunun işlevi olarak doz yanıt eğrisi yapıldı. Tüm uygulamalar üç kez tekrarlanarak ve ortalama değerler alınarak nihai sonuçlar olarak kullanıldı.



Şekil 13. Nöroblastoma hücrelerinin laminar flow kabin içerisinde kuyucuklara eklenmesi

Şekil 14. Nöroblastoma hücrelerine CellTiter-Glo® reaktif karışımının eklenmesi





Şekil 15. Hücre canlılığının ölçülmesinde kullanılan cihazın görünümü

4.2.3. Nörotoksite Tarama Testi

Rapamisin'nin nöron kültürü üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla; 1. gün, tüm kuyucuklara 500 µl hacimde proliferasyon medyumunu içerisinde, her bir well'de 15000 hücre olacak şekilde NB2a hücresi konularak 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra ilk üç kuyucuk hariç (-kontrol), kalan tüm kuyucuklardaki medyum çekilerek farklılaşma medyumunu (serum içermeyen DMEM içinde 1 mM dibütiril cAMP, diferansiyasyon medyumunu) eklendi. Diferansiyasyon medyumunu içeren kuyucukların ilk üçü hariç (+ kontrol), diğerlerine her üçkuyucukta bir konsantrasyon olacak şekilde, farklı konsantrasyonlarda Rapamisin (hücre proliferasyon deneylerinden elde edilecek sonuçlara göre) çözücü (DMSO, %0,2) konuldu. Kuyucukların olduğu plakalar, 37C° ve %5 CO₂ ortam içeren inkübatöre kaldırıldı ve 1 gün bekletildi.

1 gün geçtikten sonra, tüm hücreler %4 formaldehid(PBS içinde) sabitlendikten sonra Üç dakika Coomassie Blue(%0.6) boyanması için beklendi. Boyanmış çukurlar daha sonra On dakika arayla PBS ve distile su ile her seferinde iki kez yıkandı. Ölçüm yapılmak üzere her üç kuyu içerisinde ışık mikroskobu altında rasgele seçilen 10 farklı sahadan 100 hücredeki nörit uzunlukları image analiz programı kullanılarak ölçüldü. Ölçülen nörit uzunluğu değerleri, kontrol değerlerin %'si olarak değerlendirildi.

4.2.4. Klorprifos ile Oluşturulan Nörotoksisite Üzerine Rapamsin'in Etkisinin Değerlendirilmesi

Rapamsin'in nöroprotektif etki değerinin belirlenmesi nedeniyle; ilk gün, tüm kuyulara proliferasyon Medyumu konularak hücreler ortama alışması için konuldu. Her kuyucuğa 15000 hücre konuldu. Bir gün inkübatörde bekletilen kuyucuklar 24 saatin sonunda üç kuyucuk (negatif kontrol), kalan tüm kuyucuklar içerisindeki medyum çekilerek diferansiasyon medyumu konularak ortam hazırlandı.. İlk üçü hariç (pozitif kontrol), diğerlerine klorprifos 25 µM konsantrasyonlarda eklenerek nörotoksisite oluşması beklendi. Klorprifos'un 25 µM konsantrasyonu, nörit inhibisyonu yapan en etkin ve en düşük konsantrasyon olarak tespit edilmiştir. (129). Klorprifos içeren ilk üç kuyucuk hariç, diğer kuyucuklara her üç kuyucukta bir konsantrasyon olacak şekilde, farklı konsantrasyonlarda Rapamsin nörotoksik etki yapmayan dozlarda ve çözücü DMSO olarak 24 lü weller kullanıldı.

24 saat sonrasında, hücreler 10 dakika %4 formaldehid (PBS içinde) fikse edildikten sonra 3 dakika Coomassie Blue boyasında (%0.6) boyanması için beklendi ve boyanmış örnekler daha sonra 10 dakika arayla PBS ve distile su ile 2 kez yıkandı. Ölçüm yapılmak üzere her üç kuyucuk içerisinde ışık mikroskobu altında rastgele seçilen 10 farklı sahadan 100 hücredeki nörit uzunlukları image analiz programı kullanılarak ölçüldü ve ölçülen nörit uzunluğu değerleri, kontrol değerlerin %'si olarak değerlendirildi

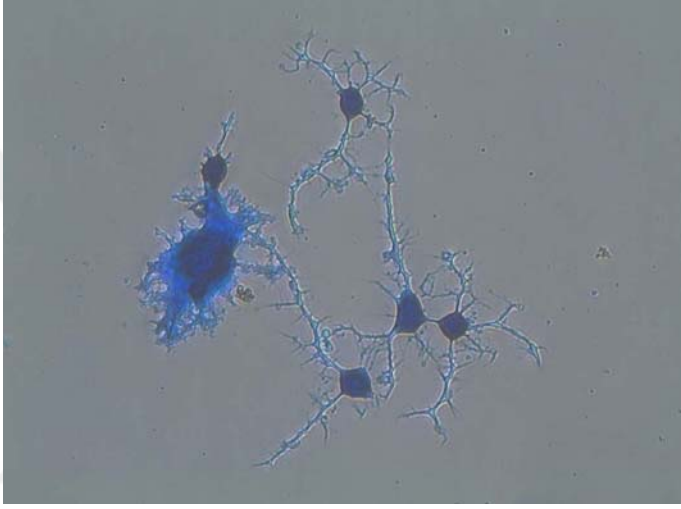
4.3. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey's Btesti ile değerlendirildi. Veriler ortalama±standart hata (SH) olarak verildi ve $p < 0,05$ olan değerler anlamlı kabul edildi.

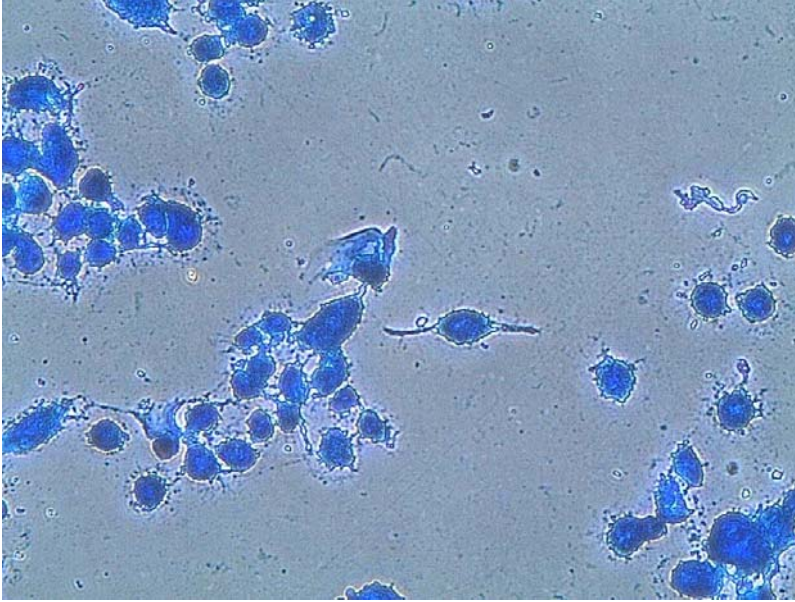
6. BULGULAR

5.1.Nörotoksisite Tarama Testi

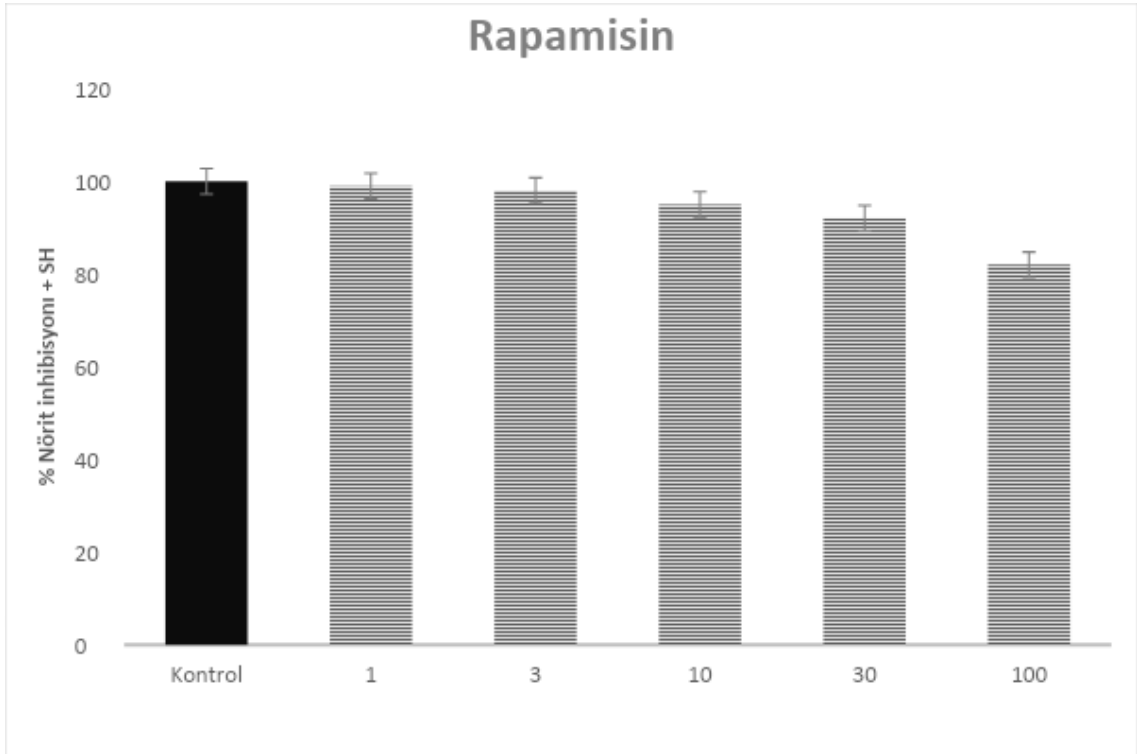
Fare kaynaklı Nöroblastoma hücreleri (NB2a), kültür ortamında rapamisin'in 1,3,10,30 ve 100 μ M dozları ile muamele edildi. Her bir doz için üç tekrarlı yapılan çalışmamızda Şekil 16'de örneği görüldüğü gibi her örnekten rastgele seçilen 20 sahada 100 hücrenin nörit uzunlukları saptandı.



Şekil 16: d-cAMP ile farklılaştırılan Kültür Hücresi görüntüsü x400



Şekil 17: proliferasyondaki hücre görüntüsü x400



Şekil 18 : NB2a hücrelerinde rapamisinin farklı konsantrasyonlarında nörit inhibisyonu üzerine etkisi ($p>0.05$).

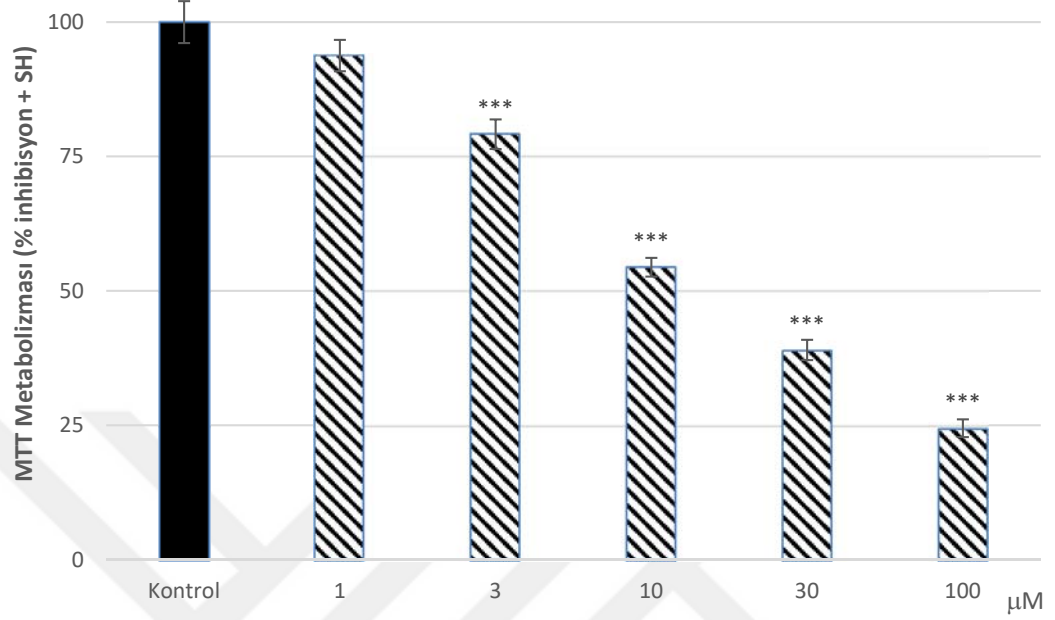
Yapılan NTT ile NB2a hücrelerinin nörit uzunlukları hesaplandı. Bu ölçümler sonrasında tüm konsantrasyonlarda ılımlı nörotoksik etkileri görülmedi ($p>0.05$).

5.2. MTT Metabolizması Sonuçları

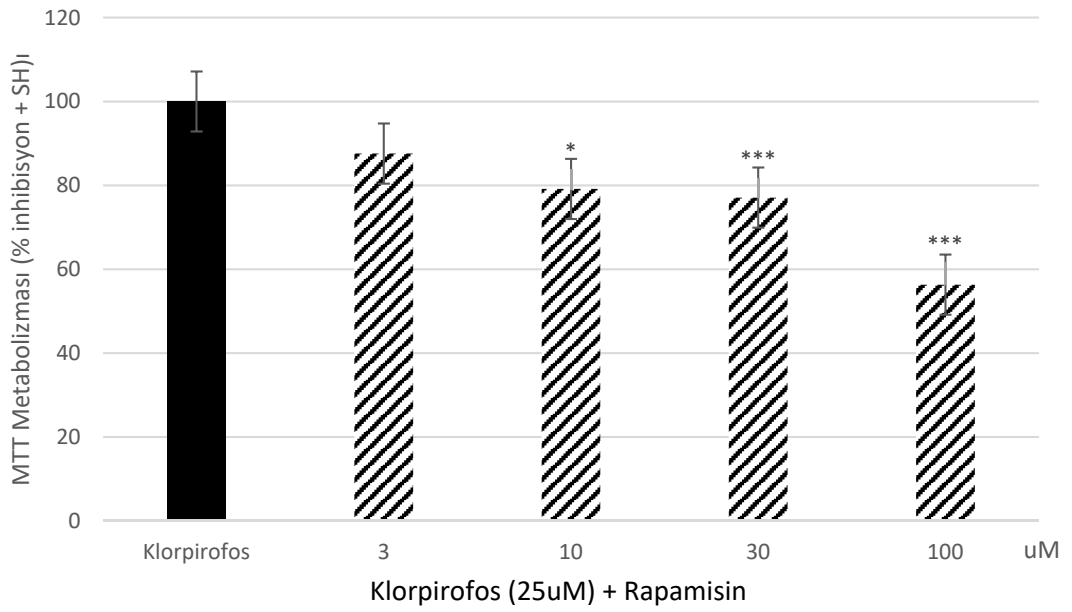
Nöroblastoma hücrelerine, rapamisinin 1, 3, 10, 30 ve 100 μM dozları ile muamele edildikten sonra inkübe edilerek kontrol grubu ile kıyaslanmak üzere MTT yapıldı. Bu metotla uyguladığımız ilacın NB2a hücrelerin hücre çoğalmasıyla ilgili etkileri gözlenmeye çalışıldı. Üç tekrar yapılan ölçümlerde farklı konsantrasyonlarda uyguladığımız rap 3 μM konsantrasyondan itibaren doza bağımlı olarak hücre çoğalması anlamlı azalttığı görüldü ($p<0,001$) (Şekil 19).

Klorpirofos 25 μM konsantrasyonlarda rap uygulaması ile ölçtüğümüz MTT üzerine rap hücre çoğaltmasını doza bağımlı olarak anlamlı derecede azaltmıştır. ($p<0,001$) (Şekil 20).

Rapamisin



Şekil 19: İlacın farklı konsantrasyonlarında MTT metabolizması üzerine etkileri, ***p<0.001.



Şekil 20: İlacın farklı konsantrasyonlarında klorpirofosu 25 µM uygulamasına MTT metabolizması üzerine etkileri, * p<0.05., ***p<0,001

7. TARTIŞMA

Çalışmamızın amacı, mTOR inhibitörü olan rapamisinin fare nöroblastoma hücre kültüründe nörotoksik veya nöroprotektif etkilerini in vitro olarak araştırmaktır. Rapamisin ile yaptığımız çalışmada, ilacın doza bağımlı olarak ılımlı bir nörit inhibisyonu yaptığını ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığını gördük.

Leitmeir ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada rapamisin kullanıldığında, nörit inhibisyonunun 10 mM da başladığını ve dozla arttığını gözlemlemişlerdir (Leitmeyer ve ark, 2015). Hafif düzeyde nörotoksik etkisi olduğu bu yöntemle gösterilmiştir.

Çalışmamızda rapamisinin bu toksik etkisi, mTORC1 'in inhibe edilmesi ve aşağı akış hedeflerinin fosforilasyonunun bloke edilmesi ile gözlenir. Bu hücre döngüsünün ilerlemesi ve sonunda apoptoz ile sonuçlanır (Brown ve ark, 1994). Doğrudan etkilerin dikkate alınarak bazı nöronları da öldürmesi nedeniyle ılımlı bir toksik etki gösterdiğini düşündük. Rapamisin hem mTORC1 hem de mTORC2 yollarını baskılayarak Cd kaynaklı nöronal hücre ölümünü önlediği görülmektedir (Xu ve ark, 2015).

Diğer taraftan farelerin yüksek dozlarda rapamisini tolere edemediğini, aynı zamanda daha yüksek dozlarda rapamisinin ise yaşam süresinin uzamasıyla sonuçlandığı açıklanmıştır (Radad ve ark, 2015).

Hücre proliferasyonunu araştırdığımız MTT testinde rapamisin, hücre proliferasyonunu doza bağımlı bir şekilde azaltmıştır.

Başka bir çalışmada, otofaji agonisti rapamisin, propofol ile tedavi edilen HT22 hücrelerinde NPAS4 'ün nöroprotektif etkisini zayıflatmıştır. Hücre ölümünü artırıp, LDH seviyesini yükseltmiştir. HT22 hücre dizininde doza bağlı olarak hücre proliferasyonunu azalttığını göstermişlerdir (Zhang ve ark, 2021).

Diğer bir çalışmada EA.hy926 ve HUVEC hücreleri, düşük yoğunluklu kültürlerde ve farklı ilaç konsantrasyonlarında hücrelerinin çoğalmasını önemli ölçüde inhibe ettiğini belirlemişlerdir (Marimpietri ve ark, 2005).

Başka bir yayında mesencephalic hücre kültüründe tek başına rapamisinin apoptotik süreçleri çalıştırmadığını iddaa etmektedirler (Radad ve ark, 2015).

Diğer bir çalışmada ise onkogen aktivasyonu gibi çeşitli ajanlar tarafından indüklenen yaşlanmayı baskılama da etkili olduğu gösterilmiştir.

Marimpietri ve arkadaşları (2005) da neuroblastoma hücre kültüründe rapamisinin hücre proliferasyonunu azalttığını göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda hücre ölümünü rapamisinin artırması kullandığımız hücrelerin kanser hücresi olmasına bağlanmaktadır.

Rapamisinin çalışmamızda ılımlı toksik etki gösterdiği ve ayrıca hücre proliferasyonunu azalttığı gözlenmiştir. Bu ilaç özellikle nöronal kaynaklı kanserlerde tedavide kullanılabilir.

Ancak bu konuda daha ileri araştırmalara ihtiyaç vardır.

8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yaptığımız çalışmada, rapamisin NTT testinde nörit uzamasını istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir biçimde doza bağlı olarak azalttı. MTT testinde de ise rapamisin hücre proliferasyonunu istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.001$) olarak azalttığı gözlemlendi. Son olarak da klorprifos uyguladığımız hücrelerde istatistiksel olarak doza bağımlı bir şekilde azalma gözlemlendi (10 uM konsantrasyondan itibaren).

Nörodejeneratif hastalıkların tedavisi genellikle semptomatiktir ve kısa bir süreliğine semptomlar giderilir. Ancak hastalığın progresyonu devam eder. Son yıllarda bu hastalıkların tedavisinde yeni yaklaşımlar aranmaktadır. Bu hastalıklara örnek olarak Alzheimer, Parkinson, ALS gösterilebilir.

mTOR inhibitörü olan rapamisinin fare NB2a hücre kültüründe nörotoksik etkisinin olduğu ve bu etkisini doza bağımlı olarak gösterdiği saptanmıştır. Bu ilacın başlangıçta nöroprotektif ve nörotoksik etkilerini incelediğimiz çalışmada nörotoksik olduğu nöronal harabiyete ve nöronal ölüme neden olabileceği gösterildi. Ancak kullandığımız hücre kültürünün kanser hücre dizinleri olması nedeniyle nöroblastoma türlerinde antikanserojen etki gösterebileceği düşünüldü. Bu durumun ileri çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

9. 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, 1993.

Agulnik M. New developments in mammalian target of rapamycin inhibitors for the treatment of sarcoma. *Cancer* 2012;118: 1486–97.

Almenar-Queralt A., Goldstein L. S.B., 2001. Linkers, packages and pathways: new concepts in axonal transport. *Current Opinion in Neurobiology*, 11:550–557.

Araki, T., Y. Sasaki, and J. Milbrandt. 2004. Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. *Science*. 305:1010–1013. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1098014>

Arvidsson J., Ygge J., Grant G., 1986. Cell loss in lumbar dorsal root ganglia and transganglionic degeneration after sciatic nerve resection in the rat. *Brain Res.*, 373:15–21.

Atalay C, Yılmaz KB, Karaman N, Altınok M. Klasik Kaposi sarkomunda tedavi. *Erciyes Tıp Derg* 2007;29: 128-31.

Atalay Öz F., Üstün H., 2004. Neuronal degeneration, regeneration in peripheric nervous system and new treatment modalities in neurodegenerative diseases. *Fiziksel Tıp*, 7(3): 157-162.

Beal M.F., Lang A.E., ve Ludolph A.C. (2005), *Neurodegenerative Diseases: Neurobiology, Pathogenesis and Therapeutics*, Cambridge University Pres, Cambridge.

Berrak, Özge. mTOR sinyal yolağının rapamycin ile baskılanması durumunda CDK inhibitörlerinin terapötik etkilerinin LNCaP, DU145 ve PC3 prostat kanseri hücrelerinde incelenmesi. Diss. İstanbul Kültür Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü/Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, 2014.

Beuche W., Friede R.L., 1986. Myelin phagocytosis in Wallerian degeneration of peripheral nerves depends on silica-sensitive bg/bg negative and Fc-positive monocytes. *Brain Res.*, 378:97-106.

Bigbee JW, Sharma KV, Gupta JJ, Dupree JL. Morfogenik role for acetylcholinesterase in axonal outgrowth during neural development. *Environ Health Perspect*. 1999; 1:81-8.

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

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

Brimijoin WS., 1982. Abnormalities of axonal transport: are they a cause of peripheral nerve disease? *Mayo Clin. Proc.*, 57(11):707-14.

Brown EJ, Albers MW, Shin TB, Ichikawa K, Keith CT, Lane WS, Schreiber SL. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature*. 1994 Jun 30;369(6483):756-8. doi: 10.1038/369756a0. PMID: 8008069.

Cantor ME. First Quarter 2009 Development Progress and Financial Results. ARIAD raporu, No: 617-621-2208, USA, 2009.

Chevalier-Larsen E., Holzbaur EL., 2006. Axonal transport and neurodegenerative disease. *Biochim. Biophys. Acta*. 1762(11-12):1094-108.

Chiang GG ve Abraham RT. Targeting the mTOR signaling network in cancer. *Trends Mol Med*. 2007 Oct;13(10):433-42. doi: 10.1016/j.molmed.2007.08.001. Epub 2007 Oct 1. PMID: 17905659.

Coleman M., 2005. Axon degeneration mechanisms: Commonality amid diversity. *Nature*, 6:889-898.

Conforti L., Adalbert R., Coleman M. P., 2007. Neuronal death: where does the end begin? *Trends Neurosci.*, 30:159–166.

Conforti, L., A. Tarlton, T.G. Mack, W. Mi, E.A. Buckmaster, D. Wagner, V.H. Perry, and M.P. Coleman. 2000. A Ufd2/D4Cole1e chimeric protein and overexpression of Rbp7 in the slow Wallerian degeneration (Wlds) mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97:11377–11382. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.97.21.11377>

Corradetti MN, Guan KL. Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR? *Oncogene*. 2006 Oct 16;25(48):6347-60. doi: 10.1038/sj.onc.1209885. PMID: 17041621.

Crino, P.B., K.L. Nathanson, and E.P. Henske, *The tuberous sclerosis complex*. *N Engl J Med*, 2006. 355(13): p. 1345-56.

Das KP, Barone S. Neuronal differentiation in PC12 cells is inhibited by chlorpyrifos and its metabolites: is acetylcholinesterase inhibition the site of action? *Toxicol Applied Pharmacol*. 1999;160:217–230

Demirci C, Töz H. Renal transplantasyonda mTOR inhibitörleri ve mikofenolat mofetilin kombine kullanımı. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Derg* 2008;17: 33-8.

Dompierre J.P., Godin J.D., Charrin B.C., Cordelie `res F.P., King S.J., Humbert S., Saudou F., 2007. Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation. *The Journal of Neuroscience*, 27(13):3571–3583.

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

Eisen HJ, Tuzcu EM, Dorent R, Kobashigawa J, Mancini D, Valantine-von Kaeppler HA, Starling RC, Sørensen K, Hummel M, Lind JM, Abeywickrama KH, Bernhardt P; RAD B253 Study Group. Everolimus for the prevention of allograft rejection and vasculopathy in cardiac-transplant recipients, for the RAD B253 Study Group. *N Engl J Med* 2003;349: 847-58.

Flaskos J, McLean WG, Fowler MJ, Hargreaves AJ. 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.

Frost P, Moatamed F, Hoang B, Shi Y, Gera J, Yan H, Frost P, Gibbons J, Lichtenstein A. In vivo antitumor effects of the mTOR inhibitor CCI-779 against human multiple myeloma cells in a xenograft model. *Blood* 2004;104: 4181-7.

Fu Y.S., Gordon T., 1997. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Molecular Neurobiology*. 14(1): 67-116.

Garcia Stephanie J, Seidler Frederic J, Qiao Dan, Slotkin Theodore A. Chlorpyrifos targets developing glia: effects on glial fibrillary acidic protein. *Brain Res Dev Brain Res*. 2002 Feb 28;133(2):151–161.

George, E.B., J.D. Glass, and J.W. Griffin. 1995. Axotomy-induced axonal degeneration is mediated by calcium influx through ion-specific channels. *J. Neurosci*. 15:6445–6452.

George, R., and J.W. Griffin. 1994. Delayed macrophage responses and myelin clearance during Wallerian degeneration in the central nervous system: the dorsal radiculotomy model. *Exp. Neurol.* 129:225–236.
<http://dx.doi.org/10.1006/exnr.1994.1164>

Glass, J.D., T.M. Brushart, E.B. George, and J.W. Griffin. 1993. Prolonged survival of transected nerve fibres in C57BL/Ola mice is an intrinsic characteristic of the axon. *J. Neurocytol.* 22:311–321. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01195555>

Griffin, J.W., E.B. George, S.T. Hsiesh, and J.D. Glass. 1995. Axonal degeneration and disorders of the axonal cytoskeleton. In *The Axon: Structure, Function and Pathophysiology*. S.G. Waxman, J.D. Kocsis, P.K. Sytys, editors. Oxford University Press, NY. 3750–3790.

Groves M.J., An S.F., Giornetto B., Scaravilli F., 1999. Inhibition of sensory neuron apoptosis and prevention of loss by NT-3 administration following axotomy. *Exp. Neurol.*, 155: 284–294.

Guertin, D.A. and D.M. Sabatini, *Defining the role of mTOR in cancer*. *Cancer Cell*, 2007. 12(1): p. 9-22.

Hadano S., Hand C.K., Osuga H., Yanagisawa Y., Otomo A., Devon R.S., Miyamoto N., Showguchi-Miyata J., Okada Y., Singaraja R., Figlewicz D.A., Kwiatkowski T., Hosler B.A., Sagie T., Skaug J., Nasir J., Brown R.H.Jr., Scherer S.W., Rouleau G.A., Hayden M.R., Ikeda J.E., 2001. A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. *Nat. Genet.*, 29(2):166-73.

Halbert RJ, Figlin RA, Atkins MB, Bernal M, Hutson TE, Uzzo RG, Bukowski RM, Khan KD, Wood CG, Dubois RW. Treatment of patients with metastatic renal cell cancer. *Cancer* 2006;107: 2375-83.

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

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

Hilliard A.M., 2009. Axonal degeneration and regeneration: a mechanistic tug of war. *Journal of Neurochemistry*, 108:23-32.

Hirokawa N., 1998. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science*, 279:519-526.

Hoffman P.N., Griffin J.W., Price D.L., 1984. Control of axonal caliber by neurofilament transport. *J. Cell Biol.*, 99(2):705-14.

Hudes G, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, Staroslawska E, Sosman J, McDermott D, Bodrogi I, Kovacevic Z, Lesovoy V, Schmidt-Wolf IG, Barbarash O, Gokmen E, O'Toole T, Lustgarten S, Moore L, Motzer RJ; Global ARCC Trial. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007;356: 2271-81.

Hunter DL. , Lassiter TL., Padilla S. Gestational exposure to chlorpyrifos : comparative distribution of trichloropyridinol in the fetus and dam. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1999;158(1) : 16-23.

James J. Gibbons, R.T.A., and Ker Yu, Mammalian target of rapamycin: discovery of rapamycin reveals a signaling pathway important for normal and cancer cell growth. *Semin Oncol* 2009. 36 (Suppl 3):S3-S17.

Jaquet J.B., Luijsterburg A.J., Kalmijn S., Kuypers P.D., Hofman A., Hovius S.E., 2001. Median, ulnar and combined median–ulnar nerve injuries: functional outcome and return to productivity. *J. Trauma*, 51: 687–692.

Jett, D. A.; Navoa, R. V.; Beckles, R. A.; McLemore, G. L. Cognitive Function and Cholinergic Neurochemistry in Weanling Rats Exposed to Chlorpyrifos. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2001, 174 (2), 89-98.

Kaas J.H., 1991. Plasticity of sensory and motor maps in adult mammals. *Annu. Rev. Neurosci.* 14: 137–167.

Kaas J.H., Collins C.E., 2003. Anatomic and functional reorganization of somatosensory cortex in mature primates after peripheral nerve and spinal cord injury. *Adv. Neurol.*, 93: 87–95.

Kahan BD, Julian BA, Pescovitz MD, Vanrenterghem Y, Neylan J. Sirolimus reduces the incidence of acute rejection episodes despite lower cyclosporine doses in caucasian recipients of mismatched primary renal allografts: A phase 2 trial rapamune study group. *Transplantation* 1999;68: 1526-32.

Kandel E., Schwartz J. H., Jessell T. M., 2000. *Principles of Neural Science*. 4 edition. McGraw-Hill, Health Professions Division. 1414.

Kazanç M.B. Antioksidan vitaminler. *Sendrom*. Temmuz, 1997;14-23

Keierszenbaum, A. L., 2006. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi*, Palme Yayıncılık. Ankara.18.

Kerschensteiner, M., M.E. Schwab, J.W. Lichtman, and T. Misgeld. 2005. In vivo imaging of axonal degeneration and regeneration in the injured spinal cord. *Nat. Med.* 11:572–577. <http://dx.doi.org/10.1038/nm1229>.

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

Kirichok, Y., G. Krapivinsky, and D.E. Clapham. 2004. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature*. 427:360–364.<http://dx.doi.org/10.1038/nature02246>

Konishi Y., Setou M., 2009. Tubulin tyrosination navigates the kinesin-1 motor domain to axons. *Nat. Neurosci.*, 12(5):559-67.

Laplante, M. ve D.M. Sabatini, *mTOR signaling at a glance*. *J Cell Sci*,2009. 122(Pt 20): p. 3589-94.

Leitmeyer K, Glutz A, Radojevic V, Setz C, Huerzeler N, Bumann H, Bodmer D, Brand Y. Inhibition of mTOR by Rapamycin Results in Auditory Hair Cell Damage and Decreased Spiral Ganglion Neuron Outgrowth and Neurite Formation In Vitro. *Biomed Res Int*. 2015;2015:925890. doi: 10.1155/2015/925890. Epub 2015 Mar 31. PMID: 25918725; PMCID: PMC4395993.)

Li WF,Furlong CE,Costa LG. Paraoxonase protects against clorprifos toxicity in mice.*Toxicol Lett* 1995;76(3): 219-26.

Ligon L.A, LaMonte B.H., Wallace K.E., Weber N., Kalb R.G., Holzbaur E.L., 2005. Mutant superoxide dismutase disrupts cytoplasmic dynein in motor neurons. *Neuroreport.*, 16(6):533-6.

Lubińska, L. 1977. Early course of Wallerian degeneration in myelinated fibres of the rat phrenic nerve. *Brain Res*. 130:47–63. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(77\)90841-1](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(77)90841-1)

Lubińska, L. 1982. Patterns of Wallerian degeneration of myelinated fibres in short and long peripheral stumps and in isolated segments of rat phrenic nerve. Interpretation of the role of axoplasmic flow of the trophic factor. *Brain Res*. 233:227–240. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(82\)91199-4](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(82)91199-4)

Lunn E.R., Perry V.H., Brown M.C., Rosen H., Gordon S., 1989. Absence of Wallerian degeneration does not hinder regeneration in peripheral nerve. *Eur. J. Neurosci.*, 1:27–33.

Ma, X.M. and J. Blenis, *Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009. 10(5): p. 307-18.

Marimpietri D, Nico B, Vacca A, Mangieri D, Catarsi P, Ponzoni M, Ribatti D. Synergistic inhibition of human neuroblastoma-related angiogenesis by vinblastine

and rapamycin. *Oncogene*. 2005 Oct 13;24(45):6785-95. doi: 10.1038/sj.onc.1208829. PMID: 16007159.

McCray B.A., Skordalakes E., Taylor J.P., 2010. Disease mutations in Rab7 result in unregulated nucleotide exchange and inappropriate activation. *Human Molecular Genetics*, 19(6):1033–1047.

McLean WG, Holme AD, Jannah O, Southgate A, Howard CV, 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.

Miller, R.G., Gelinas, D. ve O'Connor, P. (2004), *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, Demos Medical Publishing, New York.

Mita MM, Mita AC, Chu QS, Rowinsky EK, Fetterly GJ, Goldston M, Patnaik A, Mathews L, Ricart AD, Mays T, Knowles H, Rivera VM, Kreisberg J, Bedrosian CL, Tolcher AW. Phase I trial of the novel mammalian target of rapamycin inhibitor deforolimus (AP23573; MK-8669) administered intravenously daily for 5 days every 2 weeks to patients with advanced malignancies. *J Clin Oncol* 2008;26: 361–7.

Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983; 65:55-63

Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S, Grünwald V, Thompson JA, Figlin RA, Hollaender N, Urbanowitz G, Berg WJ, Kay A, Lebwohl D, Ravaud A. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet* 2008; 372: 449-56.

Muscarella DE, Keown JF, Bloom SE. Evaluation of the genotoxic and embryotoxic potential of chlorpyrifos and its metabolites in vivo and in vitro. *Environ Mutagen*. 1984; 6(1) : 13-23.

Navarro X., Vivo M., Valero-Cabre A., 2007. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Progress Neurobiology*. (4): 163-201.

Navarro X., Vivo M., Valero-Cabre A., 2007. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Progress Neurobiology*. (4): 163-201.

Nikolaeva, M.A., B. Mukherjee, and P.K. Stys. 2005. Na⁺-dependent sources of intra-axonal Ca²⁺ release in rat optic nerve during in vitro chemical ischemia. *J. Neurosci*. 25:9960–9967. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2003-05.2005>

Ouardouz, M., M.A. Nikolaeva, E. Coderre, G.W. Zamponi, J.E. McRory, B.D. Trapp, X. Yin, W. Wang, J. Woulfe, and P.K. Stys. 2003. Depolarization-induced Ca²⁺ release in ischemic spinal cord white matter involves L-type Ca²⁺ channel

activation of ryanodine receptors. *Neuron*. 40:53–63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2003.08.016>

Öztürk G., 1999. Axonal regeneration and expression of neuropeptides and neurofilaments in primary sensory neurons in vitro.(doktora tezi). University of London, Physiology Department Biomedical Sciences Division King's College London, London.

Perlson E., Maday S., Fu M., Moughamian A.J., Holzbaur E.L.F., 2010. Retrograde axonal transport: pathways to cell death? *Trends in Neurosciences* 33: 335–344.

Perocchi, F., V.M. Gohil, H.S. Girgis, X.R. Bao, J.E. McCombs, A.E. Palmer, and V.K. Mootha. 2010. MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca(2+) uptake. *Nature*. 467:291–296. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09358>

Perry V. H., Brown M.C., 1992. Macrophages and nerve regeneration. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 2: 679–682.

Peterson, T.R., et al., DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell*,2009. 137(5): p. 873-86.

Pilling A.D., Horiuchi D., Lively C.M., Saxton W.M., 2006. Kinesin-1 and dynein are the primary motors for fast transport of mitochondria in drosophila motor axon. *Molecular Biology of the Cell*, 17: 2057–2068.

Radad K, Moldzio R, Rausch WD. Rapamycin protects dopaminergic neurons against rotenone-induced cell death in primary mesencephalic cell culture. *Folia Neuropathol.* 2015;53(3):250-61. doi: 10.5114/fn.2015.54426. PMID: 26443316.

Ravikumar B., Acevedo-Arozena A., Imarisio S., Berger Z., Vacher C., O'Kane C.J., Brown S.D., Rubinsztein D.C., 2005. Dynein mutations impair autophagic clearance of aggregate-prone proteins. *Nat. Genet.*, 37(7):771-6.

Ravikumar B., Vacher C., Berger Z., Davies J.E., Luo S., Oroz L.G., Scaravilli F., Easton D.F., Duden R., O'Kane C.J., Rubinsztein D.C., 2004. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat. Genet.*, 36(6):585-95.

Reyes O., Sosa I., Kuffler D.P., 2005. Promoting neurological recovery following a traumatic peripheral nerve injury. *P. R. Health Sci. J.*, 24: 215–223.

Richter, J.D. and N. Sonenberg, Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature*, 2005. 433(7025): p. 477-80

Rigaud, M., G. Gemes, P.D. Weyker, J.M. Cruikshank, T. Kawano, H.E. Wu, and Q.H. Hogan. 2009. Axotomy depletes intracellular calcium stores in primary sensory neurons. *Anesthesiology*. 111:381–392.

<http://dx.doi.org/10.1097/ALN.0b013e3181ae6212>

Robins HI, Wen PY, Chang SM, Kuhn J, Lamborn K, Cloughesy T, Glibert MR, Yung WK, Dancey J, Prados MD. Phase I study of erlotinib and CCI-779 (temsirolimus) for patients with recurrent malignant gliomas. *J Clin Oncol* 2007; ASCO Meeting Abstracts (No 18S; June 20 Supplement) 25:2057.

Rosberg H.E., Carlsson K.S., Dahlin L.B., 2005. Prospective study of patients with injuries to the hand and forearm: costs, function, and general health. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg.* 39: 360–369.

Sachana M, Flaskos J, Nikolaidis E, Hargreaves A, Alexaki-Tzivanidou E. Inhibition of rat platelet 5-hydroxytryptamine uptake by chlorpyrifos and carbaryl. *Pharmacol Toxicol.* 2001 Oct;89(4):195–200.

Schlaepfer WW., 1987. Neurofilaments: structure, metabolism and implications in disease. *J. Neuropathol Exp Neurol.*, 46(2): 117-29.

Schuh Rosemary A, Lein Pamela J, Beckles Rondell A, Jett David A. Noncholinesterase mechanisms of chlorpyrifos neurotoxicity: altered phosphorylation of Ca²⁺/cAMP response element binding protein in cultured neurons. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002 Jul 15;182(2):176–185.

Schwab M., Thoenen H., 1977. Retrograde axonal and transsynaptic transport of macromolecules: physiological and pathophysiological importance. *Agents Actions.*, 7(3):361-8.

Schwab M., Thoenen H., 1977. Retrograde axonal and transsynaptic transport of macromolecules: physiological and pathophysiological importance. *Agents Actions.*, 7(3):361-8.

Setou M., Hayasaka T., Yao I., 2003. Axonal transport versus dendritic transport. *J. Neurobiol.*, 58(2):201-6.

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

Sjogren G, Sletten G, Dahl JE. Cytotoxicity of dental alloys, metals and ceramics assessed by Millipore filter, agar overlay and MTT tests. *J Prosthet Dent* 2000; 84: 229-236.

Skrzypek, J. and W. Krause, Azoospermia in a renal transplant recipient during sirolimus (rapamycin) treatment. *Andrologia*, 2007. 39(5): p. 198-9.

Slotkin TA, Seidler FJ. Developmental neurotoxicity of organophosphates targets cell cycle and apoptosis, revealed by transcriptional profiles in vivo and in vitro. *Neurotoxicol Teratol*. 2012;34:232–41.

Stegall MD, Larson TS, Prieto M, Gloor J, Textor S, Nyberg S, Sterioff S, Ishitani M, Griffin M, Kremers W, Lund W, Schwab T, Cosio F, Velosa J. Kidney transplantation without calcineurin inhibitors using sirolimus. *Transplant Proc* 2003; 35: S 125-7.

Stephen B, Kyle L, Yong X, Cynthia A, Donald E, Earl F, James E. Role of oxidative stress in the mechanism of dieldrin's hepatotoxicity. *Annals of Clinical and Laboratory Science*. 1997; 27(3) : 196-208.

Stephens R.E., Edds K.T., 1976. Microtubules: structure, chemistry, and function. *Physiol. Rev.*, 56(4):709-77.

Stirling, D.P., and P.K. Stys. 2010. Mechanisms of axonal injury: internodal nanocomplexes and calcium deregulation. *Trends Mol. Med.* 16:160–170. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2010.02.002>

Stoll G., Muller H.W., 1999. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration. *Basic Insights Brain Pathol.*, 9: 313-325.

Stone JD, Peterson AP, Eyer J, Oblak TG, Sickles DW. Neurofilaments are nonessential to the pathogenesis of toxicant-induced axonal degeneration. *J Neurosci*, 21(7):2278-2287, 2001.

Strimpakos AS, Karapanagiotou EM, Saif MW, Syrigos KN. The role of mTOR in the management of solid tumors: An overview. *Cancer Treat Revi* 2009;35: 148–59.

Şahin, G. ve Akbostancı, M.C. (2008), *Parkinson Hastalığı*, Veri Medikal Yayıncılık, İstanbul.

Şahin, Pınar. Rapamisin uygulamasının fare spermatogenik hücrelere etkisi. MS thesis. Akdeniz Üniversitesi, 2012.

Tandrup T., Woolf C.J., Coggeshall R.E., 2000. Delayed loss of small dorsal rootganglion cells after transection of the rat sciatic nerve. *J. Comp. Neurol.*, 422:172–180.

Topçuoğlu, E.S. ve Selekler, K. (1998), “Alzheimer Hastalığı”, *Geriatrici* 1 (2): 63-67.

Trushina E., Dyer R.B, Badger II J.D., Ure D., Eide L., Tran D.D., Vrieze B.T., Legendre-Guillemain V., McPherson P.S., Mandavilli B.S., Van Houten B., Zeitlin S., McNiven M., Aebersold R., Hayden M., Parisi J.E., Seeberg E., Dragatsis I., Doyle K., Bender A., Chacko C., McMurray C.T., 2004. Mutant Huntingtin impairs axonal trafficking in mammalian neurons .in vivo and in vitro. *Molecular And Cellular Biology*, 24: 8195–8209.

Tsao, J.W., E.B. George, and J.W. Griffin. 1999. Temperature modulation reveals three distinct stages of Wallerian degeneration. *J. Neurosci.*19:4718–4726.

Tsao, J.W., M.C. Brown, M.J. Carden, W.G. McLean, and V.H. Perry. 1994. Loss of the compound action potential: an electrophysiological, biochemical and morphological study of early events in axonal degeneration in the C57BL/Ola mouse. *Eur. J. Neurosci.* 6:516–524. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.1994.tb00295>.

Üstünes, Levent. "RxMediaPharma interaktif ilaç bilgi kaynağı." İzmir, Turkey: GEMAŞ (2011).

Verkhatsky, A. 2005. Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons. *Physiol. Rev.* 85:201–279. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00004.2004>

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

Vestergaard S., Tandrup T., Jakobsen J., 1997. Effect of permanent axotomy on number and volume of dorsal root ganglion cell bodies. *J. Comp. Neurol.*, 388: 307–312.

Vural, K. ve Seyrek, O.The Neuroprotective Effect of Pioglitazone on NB2a Mouse Neuroblastoma Cell Culture. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2019, 25 (1), 1-8.

Wall J.T., Xu J., Wang X., 2002. Human brain plasticity: an emerging view of the multiple substrates and mechanisms that cause cortical changes and related sensory dysfunctions after injuries of sensory inputs from the body. *Brain Res. Rev.*, 39:181–215.

Wang, J., Q. Zhai, Y. Chen, E. Lin, W. Gu, M.W. McBurney, and Z. He. 2005. A local mechanism mediates NAD-dependent protection of axon degeneration. *J. Cell Biol.* 170:349–355. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200504028>

Weiner, W.J., Shulman, L.M. ve Lang, A.E. (2006), Parkinson's Disease: A Complete Guide for Patients and Families, The Johns Hopkins University Pres, Baltimore.

Weitz B., 1998. Atlas der Anatomie. Organsysteme und Strukturen . Augsburg, Almanya.

Xu C, Liu C, Liu L, et al. Rapamycin prevents cadmium-induced neuronal cell death via targeting both mTORC1 and mTORC2 pathways. Neuropharmacology. 2015;97:35-45. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.05.008

Yao JC, Phan AT, Chang DZ, Wolff RA, Hess K, Gupta S, Jacobs C, Mares JE, Landgraf AN, Rashid A, Meric-Bernstam F. Efficacy of RAD001 (everolimus) and octreotide LAR in advanced low to intermediate-grade neuroendocrine tumors: results of a phase II study. J Clin Oncol 2008;26: 4311-8.

Ygge J., 1989. Neuronal loss in lumbar dorsal root ganglia after proximal compared to distal sciatic nerve resection: a quantitative study in the rat. Brain Res., 478:193–195.

Yüksel H, Demircan Sezer S, Küçük M, Çulhacı N, Erkuş M. İleri evre uterin karsinosarkomda uzun süreli hastalıksız sağkalım. Türk Jinekolojik Onkoloji 2012;66-8.

Zhang T, Ji D, Sun J, Song J, Nie L, Sun N. NPAS4 suppresses propofol-induced neurotoxicity by inhibiting autophagy in hippocampal neuronal cells. Arch Biochem Biophys. 2021 Oct 30;711:109018. doi: 10.1016/j.abb.2021.109018. Epub 2021 Aug 18. PMID: 34418347.

EK-1

Evrak Tarih ve Sayısı: 24.09.2021-156533



T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

Sayı : E-74547675-302.14.01-156533
Konu : Ece Nur KAYA'nın Tez Konusu Hk.

24.09.2021

SBE FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

Enstitümüz 24.09.2021 tarih ve 29/2 sayılı yönetim kurulu toplantısında, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans Programı öğrencisi Ece Nur KAYA'nın tez konusunun etik kurul onayı ile birlikte (etik kurul gerekli ise) "**Rapamisin'in Fare Nöroblastoma (NB2a) Hücre Kültürü Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması**" olarak belirlenmesine **OY BİRLİĞİ** ile karar verildi. Gereğini ve bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Ömer TETİK
Enstitü Müdürü

EK-2

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

KARAR TARİH / NO	26/ 05 / 2021 / 20.478.486 / 813						
ARAŞTIRMANIN ADI	Rapamisin 'in fare nöroblastoma (NB2a) hücre kültürü üzerindeki etkilerinin araştırılması						
SORUMLU ARAŞTIRMACI	Prof.Dr. Kamil VURAL- Farmakoloji AD.						
ARAŞTIRMA EKİBİ	Yüksek Lisans Öğrencisi Ece Nur KAYA						
ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	UZMANLIK TEZİ <input type="checkbox"/>		YÜKSEK LİSANS--DOKTORA TEZİ <input checked="" type="checkbox"/>		AKADEMİK AMAÇLI <input type="checkbox"/>		
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	25 /01 / 2021 / Tarih ve 12304 Sayılı; araştırma dosyası						
KARAR BİLGİLERİ	Araştırma dosyası incelenmiş, bilimsel ve etik açıdan UYGUN olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.						
Unvanı/Adı/Soyadı		Araştırma ile ilişkisi Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye	Unvanı /Adı /Soyadı		Araştırma ile ilişkisi Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye
Prof. Dr. Murat DEMET Psikiyatri AD		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Prof. Dr. Selhan ÖZBEY Spor Bilimleri Fakültesi		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof. Dr. Özge YILMAZ Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Doç.Dr. Cemal GÜVERCİN Tıp Tarihi ve Etik AD		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof. Dr. Beyhan Cengiz ÖZYURT Halk Sağlığı AD		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Doç. Dr. Nurgül Güngör TAVŞANLI Sağlık Bilimleri Fakültesi Ebelik Bölümü		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof. Dr. Pinar ÇELİK Göğüs Hastalıkları A.D.		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Mukadder YILMAZER Avukat		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof. Dr. Tuğba ÇAVUŞOĞLU Farmakoloji AD		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Sivil Üye Hüseyin TUNÇAY		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Prof. Dr. Serkan ERKAN Ortopedi AD.		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<p>Etik Kurulumuzun kararı yukarıda belirtilmiştir. Araştırmanız Herhangi Bir Aşamada Etik Kurulumuzun "İzleme - Denetleme" Görevi Gereği Lüzumu Halinde Haberli / Habersiz Olarak Denetlenebilir. Araştırma Başvuru Formunun Taahhütname - Bölüm E kısmında belirtilmiş olan hususların dikkate alınarak istenilen bilgilerin Etik Kurulumuza zamanında iletilmesi konusunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.</p>							

Prof. Dr. Murat DEMET
BAŞKAN

EK-3

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ece Nur KAYA

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Erzincan Anadolu Lisesi, 2010

Lisans : Gazi Üniversitesi, Eczacılık Bölümü, 2016

Yüksek Lisans : Celal Bayar Üniversitesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, 2022

Mesleki Deneyim

Kültür Eczanesi, Erzincan (Stajyer) 2012-2012

Bilim İlaç, Gebze (Stajyer) 2014-2014

Hacettepe Üniversitesi Hastanesi, Ankara (Stajyer) 2015-2015

Gazi Üniversitesi Hastanesi, Ankara (Stajyer) 2015-2015

Eceser Eczanesi, Ankara (Stajyer) 2016-2016

Ece Eczanesi, Soma-Manisa 2016-.....(halen)

EK-4

T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orijinallik Raporu

Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı Başkanlığı'na

Tez Adı: Rapamisin'in Fare Nöroblastoma (NB2A) Hücre Kültürü Üzerindeki
Etkilerinin Araştırılması

Tezime ilişkin 10/06/2022 tarihinde yapılan Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezin benzerlik oranı % 28 'dir.

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.

14.06.2022
Ece Nur KAYA

Adı Soyadı : Ece Nur KAYA
Öğrenci No : 171339001
Anabilim Dalı : Tıbbi Farmakoloji AD.
Programı : Yüksek Lisans

DANIŞMAN ONAYI
UYGUNDUR.
(Prof. Dr. Kamil 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>