

T.C
Abant İzzet Baysal Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Farmakoloji Anabilim
Dalı

**NÖRONAL VE GLİAL HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE ANTİDEPRESAN
İLAÇLARIN OLASI NÖROTOKSİK ETKİLERİNİN VE HÜCRE İÇİ
MEYDANA GETİRDİKLERİ OLAYLARDA NF-κB'NİN ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Muhsine Zeynep YAVUZ

UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Akçahan GEPDİREMEN

BOLU

2013

T.C
Abant İzzet Baysal Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Farmakoloji Anabilim
Dalı

**NÖRONAL VE GLİAL HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE ANTİDEPRESAN
İLAÇLARIN OLASI NÖROTOKSİK ETKİLERİNİN VE HÜCRE İÇİ
MEYDANA GETİRDİKLERİ OLAYLARDA NF- κ B’NİN ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Muhsine Zeynep YAVUZ

UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Akçahan GEPDİREMEN

BOLU

2013

**Bu tez Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından “2012.08.03.502” proje numarası ile desteklenmiştir.**

Uzmanlık eğitimim sürecinde bilgi, deneyim ve yardımlarından yararlandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Akçahan Gepdiremen ile Doç. Dr. Özge Uzun'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim süresince benimle canı gönülden arkadaşlık yapan ve yardımlarını esirgemeyen değerli bölüm arkadaşım Dr. Recep BAYRAM'a, samimi arkadaşlığından ötürü çok minnettar olduğumu belirtir ve teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Muhsine Zeynep YAVUZ

ÖZET

Nöronal ve Glial Hücre Kültürlerinde Antidepresan İlaçların Olası Nörotoksik Etkilerinin ve Hücre İçi Meydana Getirdikleri Olaylarda NF-κB'nin Rolünün Araştırılması

Depresyon günümüzde çok sık karşılaşılan, ancak fizyopatolojisi tam olarak anlaşılabilen bir hastalıktır. Tedavisinde kullanılan ilaçların etkilerini serotonin ve norepinephrin geri alımını inhibe ederek gösterdikleri düşünülse de, yapılan araştırmalarda depresyonun sadece serotonin ve norepinephrin yetersizliği ile oluşan bir hastalık olmadığı ve aynı şekilde tedavisinde kullanılan ilaçların da antidepresan etkilerini yalnızca bu şekilde ortaya çıkarmadıkları anlaşılmıştır. Yapılan çalışmalarda antidepresan ilaçların apoptotik ve proapoptotik etkilerinin olabileceği gözlemlenmiştir.

Bu çalışmada, antidepresan ilaçlardan fluoksetin, imipramin ve maprotilinin nöronlar ve glial hücreler üzerindeki potansiyel koruyucu ve toksik etkileri; hücrelerin morfolojik değişiklikleri değerlendirilerek, canlılık oranlarının karşılaştırılması için MTT testi yapılarak, apoptozis oranlarının belirlenmesi için floresan boyama yapılarak ve apoptotik belirteçlerden olan kaspaz-3 ve kaspaz-8 miktarları karşılaştırılarak araştırılmıştır. Ayrıca bu ilaçların NF-κB üzerindeki etkileri de ELISA yöntemi ile hücre içi NF-κB ve IκB düzeyleri ölçülerek belirlenmeye çalışılmıştır.

Sonuç olarak fluoksetin, hücre içi kaspaz 8 düzeyinde değişiklik yapmadan kaspaz 3 miktarını artırarak hücreyi ölüme götürmüştür. Ancak maprotilin ve imipramin hücre içi kaspaz 8 üzerinde de değişiklik yaparak hücre ölümüne neden olduğu ve bu ölüm şeklinin de apoptoz olduğu gösterilmiştir.

Araştırmamızda baktığımız diğer bir parametre olan hücre içi NF-κB düzeyi fluoksetin uygulanan her iki hücre tipinde de artışla sonuçlanmıştır. Ancak imipramin ve maprotilinin özellikle toksik dozlarda NF-κB düzeylerini azalttığı gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: antidepresan ilaçlar, Nöron, Glia, Hücre Kültürü, Apoptozis, MTT, NF-κB.

ABSTRACT

The Determination of Possible Neurotoxic Effects of Antidepressants and Role of Antidepressants in Intracellular NF- κ B on Neuronal and Glial Cells

Depression is a common disease nowadays, but the underlying pathophysiology is not fully understood. The drug used in the treatment of depression are effective on serotonin and norepinephrine re-uptake. However in research about depression, it isn't only about by lack of serotonin and norepinephrine, and antidepressant aren't only to inhibit re-uptake serotonin and norepinephrine. In studies of antidepressant drugs was observed to be apoptotic and proapoptotic effects.

In this study, we investigated potential protective and toxic effect of antidepressant agents fluoxetine, imipramine, maprotiline on neuronal and glial cells. To investigate these effect of antidepressant agents we used MTT test to compare viability, fluorescent staining to determine apoptosis rates, DNA fragmentation assay to see DNA breaks and ELISA to measure the level of intracellular caspase 3, caspase 8, NF- κ B and I κ B.

As a result, fluoxetine increases the level of caspase 3 without changes in intracellular levels of caspase 8; and causes the cell death. But, imipramine and maprotiline increases both caspase 3 and caspase 8. All of three agents cause the apoptotic cell death.

Another parameter that we investigate in our research, level of intracellular NF- κ B increases both neuronal and glial cells in subtoxic doses. But imipramine and maprotiline haven't got any effect on intracellular NF- κ B levels in subtoxic doses.

Key Words: Antidepressant drugs, neuron, glia, cell culture, apoptosis, MTT, NF- κ B

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ	14
2. GENEL BİLGİLER	15
2.1. Depresyon	15
2.2. Antidepresan İlaçlar	17
2.1.1. Trisiklik antidepresan İlaçlar	19
2.3.2. Selektif Serotonin Geri Alım İnhibitörleri	19
2.3.3. Monoamin Oksidaz İnhibitörleri	20
2.3. Hücre Ölüm Mekanizmaları	25
2.3.1. Nekrozis	26
2.3.2. Apoptozis	27
2.3.3. Apoptozisin Görüldüğü Olaylar	28
2.3.4. Apoptozis Mekanizmaları	29
2.3.5. Apoptoziste Hücre İçi Sinyal İletimi	33
2.3.6. Apoptotik Hücrede Gözlenen Morfolojik Değişiklikler	34
2.4.7. Apoptozis ve Nekroz Arasındaki Farklar	36
2.4. Nükleer Faktör Kappa B	38
2.4.1. Nf-κB'nin Yapısı	39
2.4.2 Nf-κB'nin Yaşamsal Faaliyetler ve Apoptozisteki Rolü	43
2.4.3. Nf-κB ve Sinir Sistemi	45

3. MATERYAL VE METOD	47
3.1. Kimyasallar	47
3.2. Hücre Kültürü	48
3.2.1. Hücre Ekimi	48
3.2.2. Tripsinizasyon	48
3.2.3. Hücre Pasajlaması	49
3.3. Deney Dizaynı	49
3.3.1. Deneyin 1. Aşaması: Gözlemsel Olarak Toksik Dozların Belirlenmesi	50
3.3.2. Deneyin 2. Aşaması: MTT Testi İle Belirlenen Toksik Dozların Doğrulanması	50
3.3.3. Deneyin 3. Aşaması: Fluoksetin, İmipramin ve Maprotilinin Olası Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi	52
3.3.4. Deneyin 3. Aşaması: Fluoksetin, İmipramin ve Maprotilinin NF-κB Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi	57
3.4. İstatistiksel Değerlendirme	60
4. BULGULAR	60
4.1. Fluoksetin, İmipramin Ve Maprotilinin Toksik Dozlarının Gözlemsel Olarak Belirlenmesi	60
4.1.1. SH-SY5Y ve T98G Hücre Serileri İçin Fluoksetinin Toksik Doz Aralığı	61
4.1.2. SH-SY5Y ve T98G Hücre Serileri İçin İmipraminin Toksik Doz Aralığı	64
4.1.3. SH-SY5Y ve T98G Hücre Serileri İçin Maprotilinin Toksik Doz Aralığı	68

4.2. Fluoksetin ; Maprotilin Ve İmipraminin Toksik Dozlarının Mtt Testi İle Belirlenmesi	72
4.2.1. Fluoksetinin Hücre Yaşayabilirliği Üzerine Etkisinin MTT Testi İle Belirlenmesi	72
4.2.2. İmipraminin Hücre Yaşayabilirliği Üzerine Etkisinin MTT Testi İle Belirlenmesi	74
4.2.3. Maprotilinin Hücre Yaşayabilirliği Üzerine Etkisinin MTT Testi İle Belirlenmesi	76
4.3. Fluoksetin, İmipramin Ve Maprotilinin Hücre İçi Kaspaz-3 Seviyelerine Etkileri	78
4.3.1. Fluoksetinin Kaspaz-3 Seviyelerine Etkileri	78
4.3.2. İmipraminin Kaspaz-3 Seviyelerine Etkileri	80
4.3.3. Maprotilinin Kaspaz-3 Seviyelerine Etkileri	82
4.4. Fluoksetin, İmipramin Ve Maprotilinin Hücre İçi Kaspaz-8 Seviyelerine Etkileri	84
4.4.1. Fluoksetinin Kaspaz-8 Seviyelerine Etkileri	84
4.4.2. İmipraminin Kaspaz-8 Seviyelerine Etkileri	86
4.4.3. Maprotilinin Kaspaz-8 Seviyelerine Etkileri	88
4.5. Floresan Boyama İle Apoptozis Oranının Kalitatif Olarak Değerlendirilmesi	90
4.5.1. Glioblastom Hücre Serisinde Fluoksetin Etkisi	91
4.5.2. Glioblastom Hücre Serisinde İmipramin Etkisi	92
4.5.3. Glioblastom Hücre Serisinde Maprotilin Etkisi	93
4.6. Fluoksetin, İmipramin Ve Maprotilinin Hücre İçinde Meydana Getirdikleri Dna Hasarının Gösterilmesi	95
4.7. FLUOKSETİN, İMİPRAMİN VE MAPROTİLİNİN HÜCRE İÇİ NF-κB SEVİYELERİNE ETKİLERİ	96
4.7.1. Fluoksetinin NF-κB Seviyelerine Etkileri	97

4.7.2 İmipraminin NF-κB Seviyelerine Etkileri	98
4.7.3. Maprotilinin NF-κB Seviyelerine Etkileri	100
4.8. FLUOKSETİN, İMİPRAMİN VE MAPROTİLİNİN HÜCRE İÇİ İκB SEVİYELERİNE ETKİLERİ	102
4.8.1. Fluoksetinin İκB Seviyelerine Etkileri	103
4.8.2 İmipraminin İκB Seviyelerine Etkileri	104
4.8.3. Maprotilinin İκB Seviyelerine Etkileri	106
5. TARTIŞMA	109
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	114
7. KAYNAKLAR	116

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 2.1: Kronik strese bağlı hipokampal apoptozis
- Şekil 2.2: Antidepresan ilaçlar
- Şekil 2.3: Bazı antidepresanların etki mekanizmaları
- Şekil 2.4: İmipraminin moleküler yapısı
- Şekil 2.5: İmipraminin metabolizması
- Şekil 2.6: Fluoksetinin moleküler yapısı
- Şekil 2.7: Fluoksetinin sinaptik uçta etki mekanizması
- Şekil 2.8: Maprotilinin moleküler yapısı
- Şekil 2.9: Hücre ölümü tipleri
- Şekil 2.10: Hücrenin nekroza gitmesi
- Şekil 2.11: Apoptozisteki morfolojik değişim
- Şekil 2.12: Apoptozis yolakları
- Şekil 2.13: Apoptozis yolakları
- Şekil 2.14: Apoptotik hücrede gözlenen morfolojik değişiklikler
- Şekil 2.15: NF-κB'nin yapısı
- Şekil 2.16: Nf-kB 'nin yapısı
- Şekil 2.17: Kanonikal Yol
- Şekil 2.18: Kanonikal ve non-kanonikal yol
- Şekil 4.1: Nöron hücreleri üzerinde fluoksetinin etkilerinin gösterilmesi
- Şekil 4.2: Glia hücreleri üzerinde fluoksetinin etkilerinin gösterilmesi
- Şekil 4.3: Nöron hücreleri üzerinde imipraminin etkilerinin gösterilmesi
- Şekil 4.4: Glia hücreleri üzerinde imipraminin etkilerinin gösterilmesi
- Şekil 4.5: Nöron hücreleri üzerinde maprotilinin etkilerinin gösterilmesi

- Şekil 4.6: Glia hücreleri üzerinde maprotilinin etkilerinin gösterilmesi
- Şekil 4.7: Fluoksetinin nöronal hücrelerdeki etkilerinin MTT testi ile gösterilmesi.
- Şekil 4.8: Fluoksetinin glial hücrelerdeki etkilerinin MTT testi ile gösterilmesi
- Şekil 4.9: İmipraminin nöronal hücrelerdeki etkilerinin MTT testi ile gösterilmesi
- Şekil 4.10: İmipraminin glial hücrelerdeki etkilerinin MTT testi ile gösterilmesi.
- Şekil 4.11: Maprotilinin nöronal hücrelerdeki etkilerinin MTT testi ile gösterilmesi.
- Şekil 4.12: Maprotilinin glial hücrelerdeki etkilerinin MTT testi ile gösterilmesi
- Şekil 4.13: Fluoksetinin nöronal hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi kaspaz 3 seviyelerindeki değişim
- Şekil 4.14: Fluoksetinin glial hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi kaspaz-3 seviyelerindeki değişim
- Şekil 4.15: İmipraminin nöronal hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi kaspaz 3 seviyelerindeki değişim
- Şekil 4.16: İmipraminin glial hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi kaspaz-3 seviyelerindeki değişim
- Şekil 4.17: Maprotilinin nöronal hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi kaspaz3 seviyelerindeki değişim
- Şekil 4.18: Maprotilinin glial hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi kaspaz-3 seviyelerindeki değişim
- Şekil 4.19: Fluoksetinin nöronal hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi kaspaz 8 seviyelerindeki değişim
- Şekil 4.20: Fluoksetinin glial hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi kaspaz-8 seviyelerindeki değişim

- Şekil 4.21: İmipraminin nöronal hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi kaspaz 8 seviyelerindeki değişim
- Şekil 4.22: İmipraminin glial hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi kaspaz-8 seviyelerindeki değişim
- Şekil 4.23: Maprotilinin nöronal hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi kaspaz8 seviyelerindeki değişim
- Şekil 4.24: Maprotilinin glial hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi kaspaz-8 seviyelerindeki değişim
- Şekil 4.25: Glial hücrelerde fluoksetinin apoptoz üzerine etkisi
- Şekil 4.26: Glial hücrelerde imipraminin apoptoz üzerine etkisi
- Şekil 4.27: Glial hücrelerde maprotilinin apoptoz üzerine etkisi
- Şekil 4.28: Nöroblastom hücre serisinde fluoksetin, imipramin ve maprotilinin DNA üzerindeki etkisi
- Şekil 4.29: Glioblastom hücre serisinde fluoksetin, imipramin ve maprotilinin DNA üzerindeki etkisi
- Şekil 4.30: Fluoksetinin nöronal hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi NF-κB seviyelerindeki değişim
- Şekil 4.31: Fluoksetinin glial hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi NF-κB seviyelerindeki değişim
- Şekil 4.32: İmipraminin nöronal hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi NF-κB seviyelerindeki değişim
- Şekil 4.33: İmipraminin glial hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi NF-κB seviyelerindeki değişim
- Şekil 4.34: Maprotilinin nöronal hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi NF-κB seviyelerindeki değişim
- Şekil 4.35: Maprotilinin glial hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi NF-κB

- seviyelerindeki değişim
- Şekil 4.36: Fluoksetinin nöronal hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi IκBα seviyelerindeki değişim
- Şekil 4.37: Fluoksetinin glial hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi IκBα seviyelerindeki değişim
- Şekil 4.38: İmipraminin nöronal hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi IκBα seviyelerindeki değişim
- Şekil 4.39: İmipraminin glial hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi IκBα seviyelerindeki değişim
- Şekil 4.40: Maprotilinin nöronal hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi IκBα seviyelerindeki değişim
- Şekil 4.41: Maprotilinin glial hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi IκBα seviyelerindeki değişim

TABLULAR DİZİNİ

- Tablo 2.3: Hücre ölümü tipleri
- Tablo 2.4.1. NF-κB'nin proapoptik etkisi
- Tablo 2.4.2. NF-κB'nin antiapoptik etkisi

KISALTMALAR

5HT2A	Serotonin 2A Reseptörü
AIF	Apoptozis İndükleyici Faktör
ALS	Amyotrofik Lateral Skleroz
APAF-1	Apoptotik Proteaz Aktifleyici Faktör 1
ATP	Adenin Trifosfat
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CAD	Caspase Activated DNase
CREB	cAMP response element-binding protein
DNA	Deoksiribonükleaz
DMSO	Dimetil Sülfoksit
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ER	Endoplazmik Retikulum
ERK	Ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz
H ₂ O	Su
ICAD	Inhibitor Caspase Activated DNase
Ig	İmmünglobulin
I κ B	İnhibitör kappa B
IKK	İnhibitör Kappa Kinaz
JNK	C-Jun N-Terminal Kinases
KAT	Katalaz
MAP	Mitogen-Activated Protein
MOMP	Mitokondri dış zar permeabilizasyonu
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NCDD	Nomenclature Committee on Cell Death
NEMO	NF- κ B Essential Modulator
NGF	Sinir Büyüme Faktörü
NF- κ B	Nükleer Faktör Kappa B
NIK	NF- κ B-indükleyici kinaz
PARP	Poly ADP Ribose Polymerase

RHD	Rel Homolog Domain
SSRI	Selective Serotonin Re-Uptake Inhibitors
SSS	Santral Sinir Sistemi
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor
TUNEL	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Dntp Nick End Labeling

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Depresyon günümüzde çok sık rastlanılan ve gittikçe de tanı almış hasta sayısı artan, stresin de tetiklediği bir hastalıktır. Hastalarda meydana gelen duygudurum bozuklukları kişinin toplumdan soyutlanmasına neden olmaktadır. Her geçen gün hasta sayısında artış yaşanması toplumda da olumsuz etkilere neden olmaktadır.

Tedavisinde birçok ajanın kullanılmasına rağmen bu ajanların etki etmeleri için haftalar geçmesi depresyonun altında yatan majör nedenin aydınlatılması için çalışmalar yapılmasına neden olmuştur. Birçok araştırmacı depresyon sonucu beyinde meydana gelen değişimleri ortaya çıkarmaya çalışmış veya kullanılan ilaçların beyinde noradrenalin ve serotonin artışından başka ne gibi değişimler meydana getirdiklerini araştırmışlardır. Sonuçta depresyonlu hastalarda, hücre içinde birçok yaşamsal faktörde değişimler olduğu ortaya çıkmıştır.

NF- κ B'de hücrede yaşamsal faaliyetlerde rol alan ve hücrenin yaşamını sürdürmesinde büyük öneme sahip faktörlerden biridir. Çalışmamızda, tedavide kullanılan ilaçların depresyon üzerindeki etkilerinde NF- κ B'nin herhangi bir etkisinin olup olmadığının araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla belirlenen dozlarda ilaçların uygulanmasının ardından ELISA yöntemi ile hücre içi NF- κ B ve I κ B seviyeleri ölçülmüş ve değerlendirilmiştir.

Antidepresan ilaçların etki mekanizmaları araştırılırken, belli dozların üzerinde apoptotik etkilerinin olabileceği gözlenmiştir. Bu ilaçların kan-beyin engelini rahat geçebilmeleri, SSS tümörlerinde sitotoksik bir ajan olarak kullanılıp kullanılmayacağı sorusunu akla getirmiştir. Bu amaçla bu ilaçların depresyondaki faydalı etkilerinin yanında hücre öldürücü potansiyelleri de araştırılmaya başlanmış ve birçok ajanın doz ve hücre bağımlı olarak değişik hücre ölüm mekanizmalarını etkin hale getirdikleri gözlenmiştir.

Bu amaçlara yönelik olarak kullanılan ilaçların etkileri, faz-kontrast mikroskobu ile hücreler kaba şekilde histopatolojik olarak incelenerek, MTT testi ile canlılık oranları ölçülerek, ELISA yöntemiyle apoptozis belirteçleri bakılarak ve floresan boyama yöntemleri ile detaylı şekilde histopatolojik olarak incelenerek değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DEPRESYON

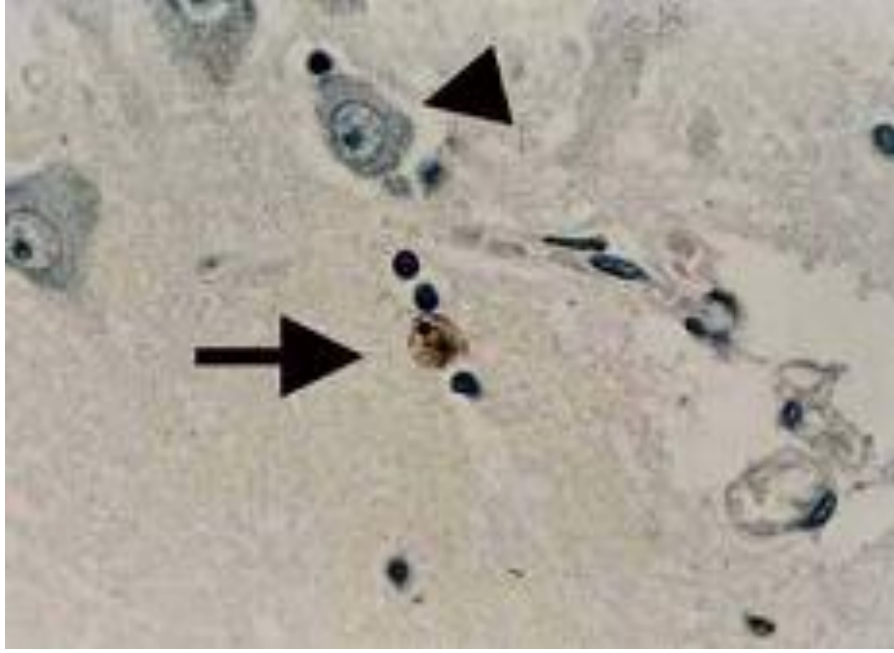
Depresyondaki patoloji bir duygulanım, yani mevcut duygusal içeriğin dışa vurulan ifadesinin patolojisi değil; duygudurum, yani bir kişinin sürekli içsel duygusal durumunun patolojisidir (1). Etkinlik düzeyinde, bilişsel yeteneklerde, konuşma ve vejetatif işlevlerde (uyku, iştah, cinsel etkinlik ve diğer biyolojik ritimler) değişiklikleri içermektedir. Bu değişiklikler, hemen daima kişilerarası, toplumsal ve mesleki işlevsellikte bozulmayla sonuçlanır (2-4). Fazla stres beyinde fizyolojik ve davranışsal bozulmalara neden olan değişimler meydana getirir (5). Uzun süren stres ve stresli yaşam, major depresyonun oluşmasına neden olabilir ve bu da birçok sağlık problemini peşinden getirir (6-14).

Kronik stresin fizyolojik belirtileri

Daha önce de belirttiğimiz gibi kronik stres, depresyona neden olabilir. (6-10) Son yıllarda yapılan çalışmalarda; majör depresyonlu hastalarda hipokampal ve prefrontal korteks hacminde, glial hücre sayısında azalma ve amigdala hacminde artış gözlenmiştir (15-19). Bu değişimler kognitif fonksiyonlar ve emosyonel davranışlar üzerinde değişikliklere neden olmaktadır. Fakat bu değişimlerin nedenleri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (20).

Beyinde *invivo* olarak hücre ölümünü göstermek gerçekten çok zordur. Bu nedenle depresyon ile ilgili yapılmış çalışmaların çoğu postmortem çalışmalardır. Yapılan bir çalışmada entorinal korteks, subikulum ve dentat girusta az miktarda hücre ölümü gözlemlenmiştir (TUNEL boyaması ile) (21). Yapılan çalışmada ölüm

anındaki apoptotik hücre sayısı gösterildiği için gösterilen apoptotik hücre sayısı azdır. Bu çalışma depresyon süresince oluşan apoptoz sayısını değil ölüm anında var olan apoptotik hücre sayısını göstermiştir (22). Yapılan diğer postmortem çalışmalarda hücreleri ölüme götüren ERK enzim aktivitesi ve ekspresyonunda da artış gözlenmiştir (23).



Şekil 2.1: Kronik strese bağlı hipokampal apoptozis (24)

MAP kinaz nöron gelişimi ve hücre yaşama rol alan önemli faktörlerdendir (25-26). Yapılan postmortem çalışmalarda prefrontal kortekste MAP kinaz salınımında ve aktivitesinde azalma gözlemiştir (23). Prefrontal korteks kronik strese ve depresyonda en fazla etkilenen beyin bölgesidir (7). MAP kinaz aktivitesinin azalması direkt olarak apoptoza neden olmaz, etkisini apoptotik mediatörler üzerinden gösterir (27). Yapılan bir çalışmada adaptör molekül APAF-1'in genetik varyasyonunun majör depresyonla ilişkisi bulunmuştur. Bu varyant beyin bölgelerinde kaspaz 9'u artırarak beynin farklı bölgelerinde hücre ölümlerine neden olabilir (28).

Depresyon ile ilgili yapılan bazı çalışmalarda depresyonlu hastalarda NF- κ B düzeyleri yüksek bulunmuştur (29-30). Bu araştırmalarda NF- κ B, TNF gibi birçok stres mediatörünün etkisi ile serotonin geri alımının inhibisyonuna neden olduğu söylenmiştir (31). Ancak yapılan bazı çalışmalarda da beyinde apoptozis oluşturarak

depresyona neden olan serbest oksijen radikalleri gibi maddelerin hücreyi uyarması sonucu NF-κB'nin seviyesinin arttığı, hücre içi antiapoptotik bcl-2 ve antioksidan süperoksit dismutaz enzimini artırarak antiapoptotik etki gösterebileceği gözlenmiştir (32 -33).

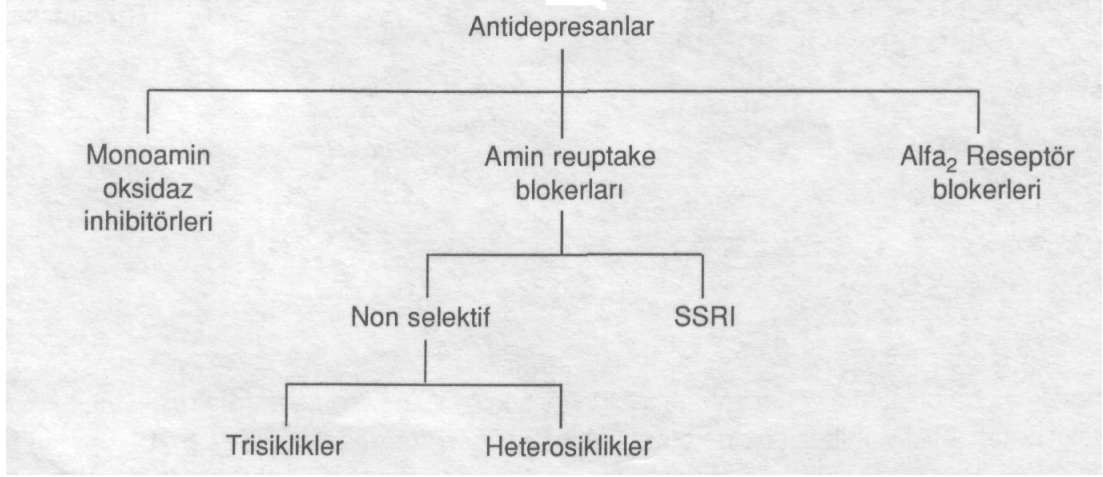
2.2. ANTİDEPRESAN İLAÇLAR

Trisiklik olsun veya olmasın antidepresan ilaçların çoğu beyinde nöradrenerjik ve serotonerjik sinapslarda nörotransmitter geri alımını (re-uptake'ini) inhibe ederler; böylece aşırımı güçlendirirler ve nörotransmitter metabolizmasını ve turnover'ını yavaşlatırlar. Ancak bu akut bir etkidir ve antidepresanların klinik etkileri ile doğrudan bir ilişkisi yoktur. Şöyle ki geri alım inhibisyonu hemen başlamasına rağmen, antidepresan etki 2-3 hafta sonra başlar. Ayrıca mianserin ve iprindol gibi bazı antidepresanlar geri alımı inhibe etmezken, amfetamin ve kokain gibi nöradrenalin ve dopamin geri alımını güçlü inhibe eden ilaçlar belirgin bir antidepresan etki göstermezler (34).

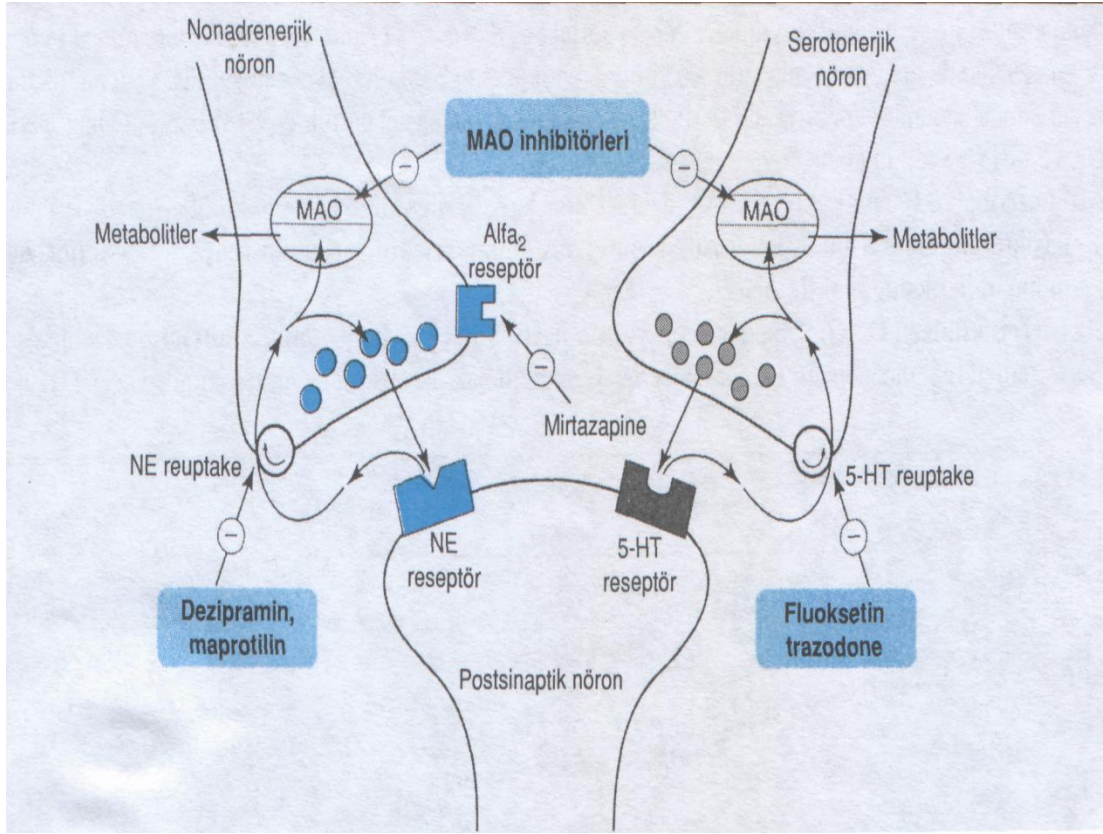
Sınıflandırma:

Affektif hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçlar etki mekanizmaları, farmakolojik etki profilleri ve kimyasal yapıları bakımından dört gruba ayrılırlar:

1. Trisiklik antidepresanlar ve benzerleri
2. Selektif serotonin geri alım inhibitörleri ve benzerleri
3. Monoamin oksidaz inhibitörleri
4. Diğer antidepresan ilaçlar



Şekil 2.2: Antidepresan ilaçlar



Şekil 2.3: Bazı antidepresanların etki mekanizmaları

2.2.1. Trisiklik antidepresanlar

Trisiklik antidepresanlar (opipramol, klomipramin, imipramin, amitriptilin, maprotilin), serotonin ve noradrenalin gerialım pompalarını, çok az olarak da dopamin gerialım pompalarını inhibe ederek etki gösterirler (35). Bu grup ilaçlar moleküllerinde üç halka içerirler. Trisiklik adı bu nedenle verilmiştir. İki uçtaki halka benzen halkası, ortadaki ise kükürt içermeyen azotlu ve yedi üyeli bir heterosiklik halkadır. Ortadaki halkanın yapısına ve azota bağlı radikallere göre çeşitli alt-gruplara ayrılırlar (34).

Bütün trisiklik antidepresanlar ağız yoluyla alındıktan sonra barsaklarda yavaş ama tama yakın emilirler. Ancak presistemik metabolizmaya uğradıkları için biyoyararlanımları % 30 civarındadır. Karaciğerde N-demetilasyon (CYP1A2, CYP2C19 ve CYP3A4), N –oksidasyon (CYP2D6) ve aromatik hidroksilasyon (CYP2D6) yolları üzerinden metabolize olurlar ve hidroksil türevleri glukronik asit konjugatı şeklinde idrarla atılırlar (34).

İmipramin trisiklik antidepresan ilaçlardan ilk bulunanı ve prototipidir. Majör depresyona ve karma bipolar bozukluğun depresif epizotlarına karşı etkilidir. Serotonin ve noradrenalinin geri alımını inhibe eder (34).

2.2.2. Selektif serotonin geri alım inhibitörleri

Bu grupta sertralin, fluoksetin, paroksetin, fluvoksamin, sitalopram gibi ilaçlar yer almaktadır. Fluoksetin, serotonin re-uptake'ni selektif olarak bloke eden ilaçların prototipidir ve yarılanma ömrü birkaç gün olan aktif bir metaboliti vardır. Selektif serotonin geri alım inhibitörleri tedavi dozlarında beyinde diğer nörotransmitter (örneğin noradrenalin ve dopamin) sistemlerine dokunmadan serotonin geri alımını çok güçlü şekilde inhibe eder. Farmakolojik etkileri trisiklik antidepresanlara benzer (34).

2.2.3. Monoamin oksidaz inhibitörleri

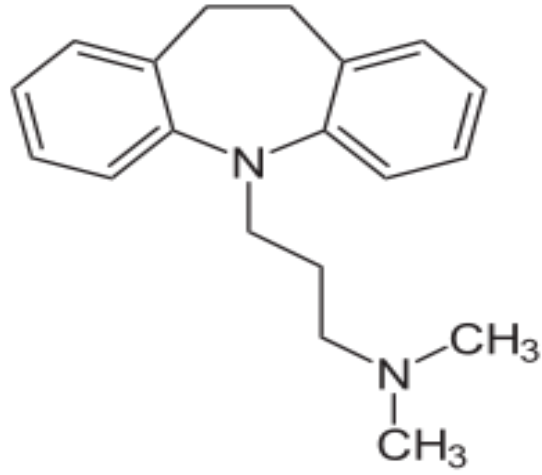
İlk olarak geliştirilen antidepresanlardır, monoamin oksidaz A ve B enzimlerini geri dönüşümsüz olarak inhibe ederler (35). Bu ilaçlar beyinde noadrenalin, dopamin, serotonin ve adrenalin düzeyini yükseltirler ve nöromedyatörlerin etkinliğini artırır (34). En iyi bilinen üyesi moklobemiddir ve sindirim yolundan hızla emilir. Karaciğerde CYP 2C19 ve CYP2D6 tarafından metabolize edilir.

Depresyon tedavisinin moleküler mekanizması tam olarak anlaşılamamakla birlikte hastaların önemli bir bölümünde antidepresanların kısa süreli kullanımlarında herhangi bir klinik etki görülmemiştir (36) . Bu nedenle kronik stres ve depresyonun patofizyolojisini ve antidepresanların hücre içi aktivitelerini anlamak için daha fazla çalışma yapılması gerekir (37-38).

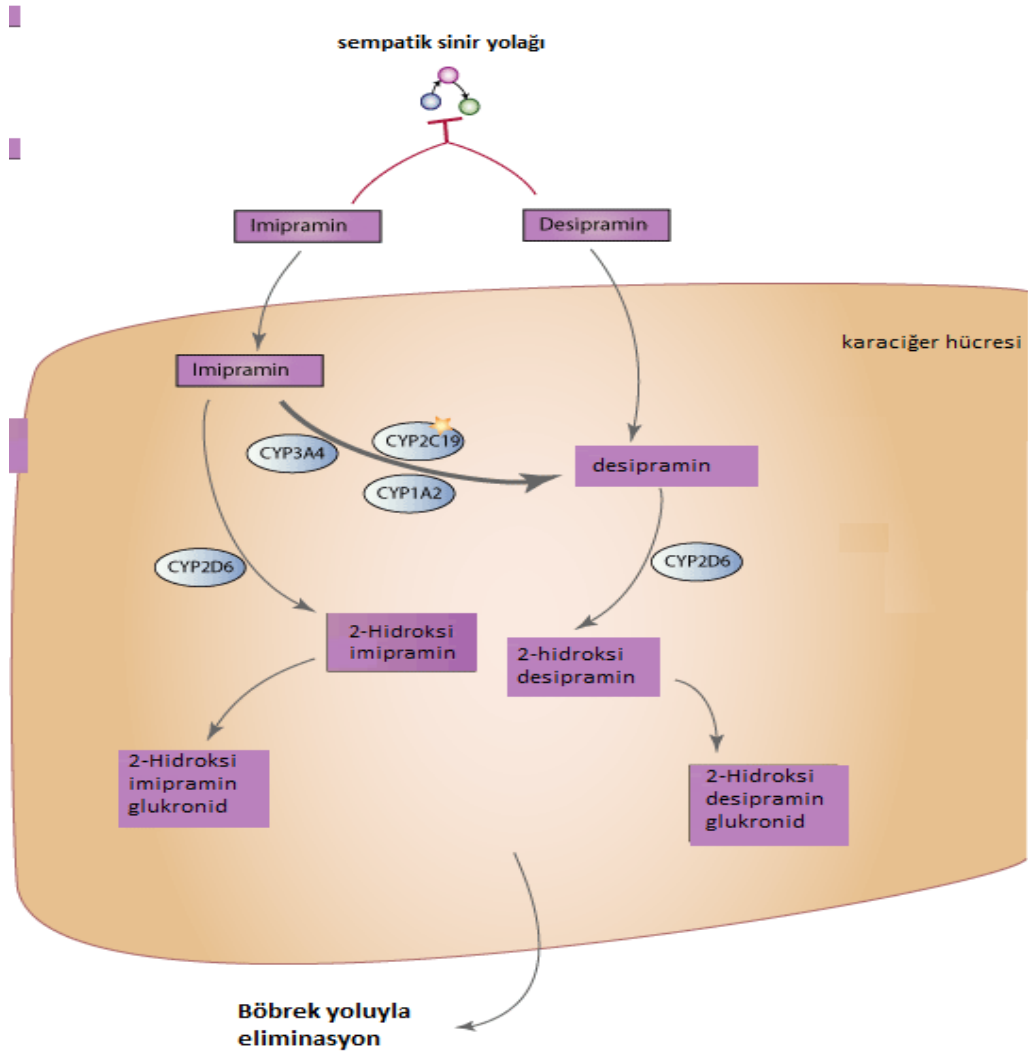
Çalışmamızda imipramin (trisiklik antidepresan), fluoksetin (serotonin geri alım inhibitörü) ve maprotilin (tetrasiklik antidepresan) kullanılmıştır.

İMİPRAMİN

3-(10,11-Dihydro-5H-dibenzo[b,f]azepin-5-yl)- N,N-dimethylpr-opan-1-amine (imipramin) bir trisiklik antidepresan olup, 5-hidroksitriptaminin (serotonin) ve norepinefrinin geri alımını inhibe eder (39). Ayrıca muskarinik reseptörleri, alfa adrenerjik reseptörleri ve histamin H₁ reseptörlerini de bloke eder (34).



Şekil 2.4: İmipraminin moleküler yapısı



Şekil 2.5: İmipraminin metabolizması

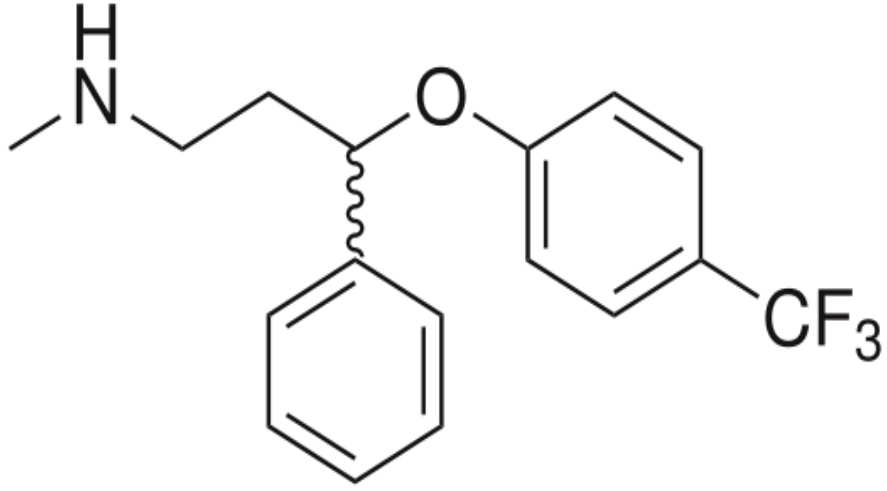
Kronik depresyon tedavisinde kullanıldığında başarılı sonuçlar elde edilen bir ilaçtır (40). Anksiyolitik ve antiobsesyonel etkileri vardır (34). Karaciğerde esas olarak CYP 2D6 tarafından metabolize edilir.

İmipramin, desipramin, amitriptilin, klomipramin ve sitalopram gibi antidepresanların antidepresan etkilerinin yanı sıra malign hücrelerde apoptotik etkileri de gösterilmiştir (41-45). Son yapılan çalışmalarda trisiklik antidepresanların primer astrosit ve nöronlarda otofajik ölümü artırdığı gösterilmiştir (46). U-87 MG glioblastom hücrelerinde yapılan bir çalışmada imipraminin hücre ölümünü artırdığı gösterilmiştir (47).

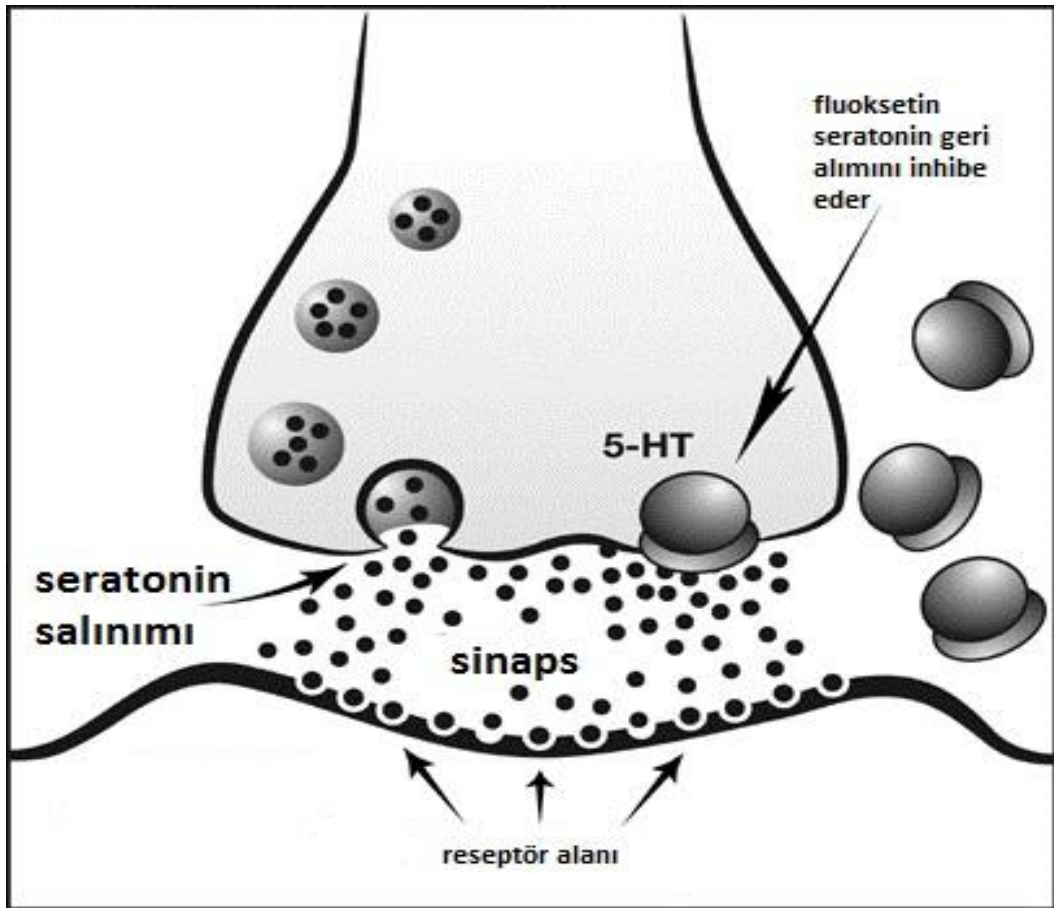
İmipraminin ratlarda kronik uygulanması hipokampüste CREB, BDNF mRNA miktarında artmaya neden olur (22). HL60 hücrelerinde 80µM imipramin uygulanması sonucunda serbest oksijen radikallerinin arttığı ve bunun sonucunda da MOMP miktarının azalması ve hücre ölümünün başlaması gözlemlenmiştir (22).

FLUOKSETİN

Fluoksetin ((*RS*)-*N*-metil-3-fenil-3-[4-(trifluorometil)fenoksi]propan-1-amin) selektif serotonin geri alım inhibitörü olup güçlü antidepresan etki gösterir (48-49). Ancak diğer antidepresanlar gibi etkisi haftalar sonra ortaya çıkar (50). Yapıca amfetaminlere benzer. Ancak, noradrenerjik mekanizmaları fazla etkilemez. Elimnasyon yarı ömrü en uzun olan antidepresan ilaçtır. CYP 2D6 tarafından metabolize edilir. Karaciğerde yarı ömrü daha uzun olan etkin şekli norfluoksetine dönüştürülür. Fluoksetin ve norfluoksetin trisiklik antidepresanlar da dahil birçok ilacın metabolizmasında rol alan CYP 2D6'yı güçlü, CYP 3A4, CYP 2C9 ve CYP 2C19'u zayıf şekilde inhibe eder. Plazma proteinlerine yüksek oranda ve sıkı bağlanır. En sık görülen yan etkileri uyuşukluk, bulantı, sinirlilik, tremor, uykusuzluk, terleme, ağız kuruluğu ve diyaredir (34)



Şekil 2.6.: Fluoksetinin moleküler yapısı



Şekil 2.7.: Fluoksetinin sinaptik uçta etki mekanizması

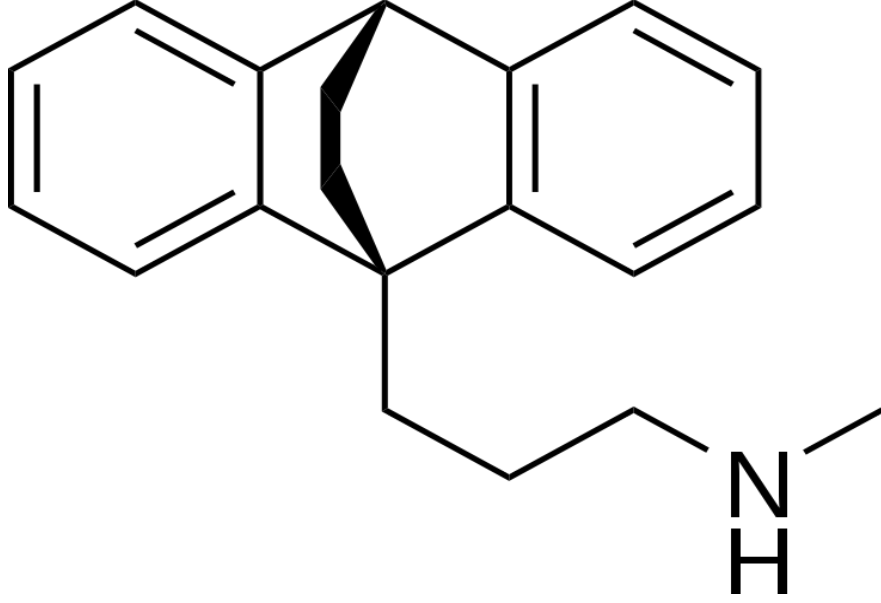
Fluoksetinin kronik uygulanması; CREB, BDNF, MAP kinaz gibi birçok sinyal yolağını düzenler (51-54). Birçok hücre ve birçok çalışmada fluoksetinin antidepresan etkinliğini antiapoptotik etkisinden kaynaklandığı ortaya konmuştur (22).

Ancak bunun tam aksini gösteren çalışmalar da vardır. Yapılan bazı çalışmalarda fluoksetinin kolon, meme, akciğer ve nöroblastom kanser türlerinde hücre siklusunu bozarak hücrenin büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (55-56). SSRI'ların kaspaz aktivasyonu yoluyla hücreyi apoptoza götürdüğü de gösterilmiştir (57-59). Bunun yanında fluoksetinin c6 glioma hücrelerinde apoptoza neden olduğu gösterilmiştir. Bu da fluoksetinin etkisinin doz ve hücre bağımlı olabileceği düşüncesini doğurmuştur.

Fluoksetinin meydana getirdiği hücre ölümünü NF- κ B üzerinden yaptığını gösteren yayınlar olduğu gibi, bunun tam aksini iddia ederek alakasının olmadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (60-61). Yapılan bir çalışmada fluoksetinin NF- κ B'nin transkripsiyonel ve DNA'ya bağlanma aktivitesini azalttığını göstermiştir (62).

MAPROTİLİN

Tetrasiklik antidepresandır ve diğer antidepresanlar gibi mental depresyon tedavisinde kullanılır (63-64) Trisiklik moleküllerin modifiye edilmiş bir türevidir. Serotonin geri alımına dokunmaz ve oldukça spesifik bir şekilde noradrenalin geri alımını inhibe eder (65). Sedatif etkilidir; postsinaptik olarak kuvvetli α_1 , zayıf α_2 , H₁ antihistaminik ve antimuskarinik etkinlik gösterir. Karaciğerde özellikle CYP 2D6 ve kısmen de CYP 1A2 tarafından metabolize edilir. En sık gözlenen yan etkileri antikolinergik nitelikte olanlar ve uyuşukluktur (34).



Şekil 2.8: Maprotilinin moleküler yapısı

Hücre içindeki Ca^{+2} değişimleri hücrede apoptoza neden olur (66). Maprotilin de hızlı bir şekilde hücre içi Ca^{+2} miktarını artırır (67). Bu da apoptotik etkinliğinin olabileceğini düşündürür. Ayrıca yapılan bir çalışmada maprotilinin nöroblastom hücre serisinde JNK bağımlı kaspaz 3 aktivitesini artırarak apoptoza neden olduğu gösterilmiştir (68).

2.3. HÜCRE ÖLÜMÜ MEKANİZMALARI

Hücre ölümü tüm canlılarda yaşamın devamı için oluşan fizyolojik gereksinimler sonucunda (apoptoz) veya patolojik olaylarda (nekroz) meydana gelir. Bunların yanında alternatif programlı hücre ölümü olarak tanımlanan otofajik ölümden ve mitotik katastroftan da söz edilebilir (69). Bu ölüm tipleri tablo 2.3'de gösterilmiştir.

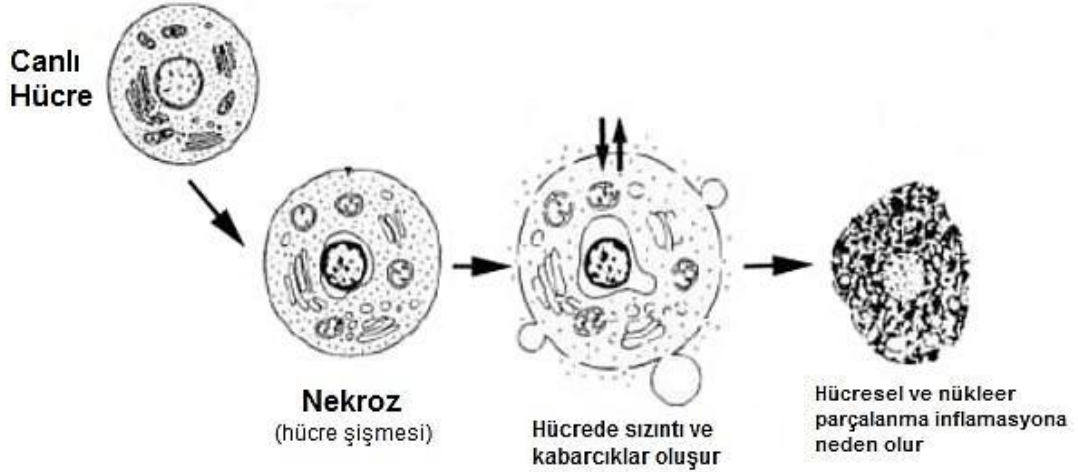
Hücre ölüm Tipi	Morfolojik Değişiklikler			Biyokimyasal özellikler
	Nukleus	Membran	Sitoplazma	
Apoptozis	Kromatin kondensasyonu, DNA ladder	Blebbing (Tomurcuklanma)	Apoptotik cisimler	Kaspaz bağımlı
Otofaji	Kısmi kromatin kondensasyonu, DNA ladder yok	Blebbing (Tomurcuklanma)	Otofajik vakuollerin artışı	Kaspaza bağımlı değil Lizozomal aktivite artışı
Mitotik katastrof (felaket)	Mikronukleus oluşumu; nuklear fragmantasyon	-	-	Kaspaza bağımlı değil (erken safhada); anormale CDK1/siklinb aktivasyonu
Nekroz	Nuklear DNA'nın tesadüfi yığılımı ve yıkımı	Şişme; kırılma	Vakuolleşme artışı; organelyıkımı; mitokondriyal şişme	-
Yaşlanma	Belirgin heterokromatik yapı		Yassılaşıma ve granülasyon	SA-β-gal aktivitesi

Tablo 2.3: Hücre ölümü tipleri

2.3.1. Nekroz

Nekroz; hipoksi, fiziksel hasar, hipertermi, kompleman aktivasyonu, UV ışık gibi zararlı uyarılar sonucu oluşan patolojik hücre ölümüdür. Metabolik değişikliklere yapısal değişiklikler eşlik eder. Nekroz uzun yıllar apoptozun karşıtı olan ve raslantısal olarak ortaya çıkan, programsız hücre ölümü olarak tanımlanmıştır. Ancak son zamanlarda nekrozun da başlatılması ve kontrolünde programlı kontrol mekanizmalarının olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Bu nedenle 2005'de Nomenclature Committee on Cell Death (NCCD)'de hücre membran bütünlüğünün bozulduğu, hücrede şişme ve organellerde parçalanmanın görüldüğü morfolojik bir terim olarak tanımlanması uygun görülmüştür (70)

Hücrenin kendi isteği ile değil, çevresel bir etken sonucu öldüğü genel kanıdır. ATP kaybı, iyon gradientlerinin yok olması, hücre şişmesi ve sonuç olarak hücre parçalanmasıyla karakterizedir. Böylece nekroz; hücre içeriklerinin çevreye salıverilmesine bağlı olarak, çevresinde inflamasyona neden olur (71).



PharmaTutor, Pharmacy Infopedia. Fig-2. Apoptotic versus necrotic morphology
<http://www.pharmatutor.org/articles/impact-of-mycotoxin-in-the-program-cell-death-necrosis?page=0,3>

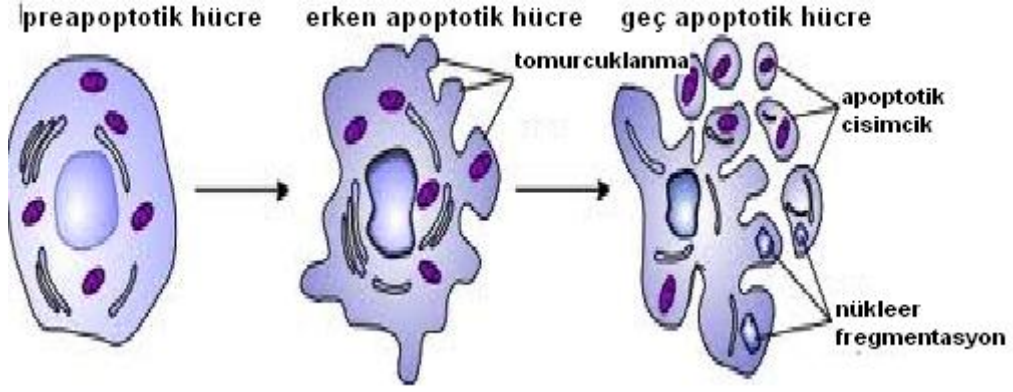
Şekil 2.10: Hücrenin nekroza gitmesi

2.3.2. Apoptozis

Apoptoz; diğer bir adıyla programlı hücre ölümü, en ince ayrıntısına kadar planlanmış, enerji bağımlı ve hücrenin kendi ölümüne yardım ettiği bir ölüm şeklidir (22) . Apoptoz ilk olarak solucan *C. Elegans* da tespit edildi (72). Walther Flemming 1885'te 'chromatolysis' prosesininin tavşan ovaryumunda foliküler atrezi sırasında granüloza hücrelerinin kaybı için sorumlu olduğunu tarif etmiştir. Aynı ölüm prosesini testiküler germ hücre dejenerasyonunda da gözlemlemiştir. Bu çalışmalarda apoptozis terimi kullanılmasa da morfolojik olarak apoptotik hücreler gösterilmiştir (73). Bu tarihten sonra apoptoz ile ilgili çalışmalar hızlı bir şekilde artmıştır (74-75). Sonra sırasıyla apoptozda sorumlu genler *ced-3* ve *ced-4* ve apoptozu önleyen gen *ced-9* keşfedildi (76-77). Özellikle kaspaz ve Bcl-2 ailelerinin keşfi bize apoptoz hakkında çok daha büyük fikirler verdi ve diğer hücre gelişimlerinde büyük bir rolü olduğu ortaya çıktı (78). Apoptozis genetik olarak kontrol edilen fizyolojik mekanizmalarla düzenlenmektedir (79).

Apoptozisin nöronlar ile glial hücreleri de etkilediği bilinmektedir (80-81) ve glutamat, Ca^{+2} iyonları, serbest radikaller, Fas bağımlı protein faktörleri, hücre

tarafından salınan sitokinler ve nitrik oksitler apoptozisin oluşumundan sorumlu tutulmaktadır (82).



Şekil 2.11: Apoptozisteki morfolojik değişim

2.3.3. Apoptozisin Görüldüğü Olaylar

Bazı organların biyolojik gelişimleri esnasında apoptozise rastlamak mümkündür. Örnek olarak, cinsiyet organlarını oluşturan Müller ve Wolf kanallarının involüsyonu, kalp gibi bazı iç organların lümenlerinin oluşması ve parmakların oluşumu sırasındaki mezanşimal hücrelerin apoptozu gösterilebilir (83). Apoptoz bağlantı kuramayan nöron ve glial hücrelerin ölümünde de rol oynar. Nöronal aktivitesi ve trofik desteği olmayan hücreler apoptozla yok edilirler (84). Bunun yanında gereksiz ve fazla apoptoz da Alzheimer, Parkinson, Huntington ve amyotrofik lateral sikleroz gibi hastalıklara neden olabilir (85-87). Ayrıca apoptoz

nekrozla birlikte iskemide, travmatik beyin yaralanmalarında ve epilepside de görülür (88-90).

Hafif şiddette, fiziksel ve toksik uyarılara maruz kalan dokularda da apoptozis görülür. Örnek olarak; hipertermi, düşük doz sitotoksik ilaçlar, iyonize radyasyon, hafif travma, hafif hipoksi gösterilebilir (83).

Bu anlamda apoptozis spesifik bir uyarana maruz kalan hücrenin, bu uyarana aktif olarak verdiği düzenleyici bir cevaptır (91). Apoptozisli hücreler sağlıklı doku içinde dağılmış şekilde veya belli bir alanda yoğunlaşmış şekilde bulunabilirler (79).

2.3.4. Apoptozis Mekanizmaları

Apoptozisin gerçekleşebilmesi için ilk önce hücrenin, ilgili genetik mekanizmayı harekete geçirecek bir sinyalle karşılaşması gerekmektedir. Bu sinyal hücre dışından veya hücre içinden gelebilir. DNA hasarı, hücre içi pH değişiklikleri, hücre içi kalsiyum seviyesinde artış ve hücre siklus bozuklukları hücreyi apoptozise götüren hücre ölüm sinyallerini başlatır. Hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerinin spesifik ligandlarına bağlanması sonucu hücre içi proteazlar, yani kaspazlar aktive olur. Sistein proteazların bir ailesi olan kaspazlar apoptozisi gerçekleştiren proteolitik kaskadı düzenler ve hücre içi hedef proteinleri yıkarak, hücre içi değişikliklere neden olurlar (92).

Apoptoziste üç farklı mekanizma vardır:

1. Mitokondri/Sitokrom-C aracılı apoptozis oluşturulması
2. Hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanan ölüm aktivatörleri ile tetiklenme
3. Endoplazmik Retikulum aracılı apoptozis oluşturulması

1. Mitokondri/Sitokrom-C aracılı apoptozisin oluşumu:

Sitokrom-c, mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirinin bir proteindir ve apoptozis sürecinde merkezi bir konumda bulunmaktadır. Mitokondrial stres durumlarında serbestleşen sitokrom-c ile (AIF) sitoplazmaya salıverilir (93). Sitokrom-c'nin mitokondriden sitoplazmaya salıverilmesi apoptozis yoluna girmiş bir hücrede geri dönüşümsüz (irreversibl) bir döneme girildiğine işaret eder.

Mitokondriden sitokrom-c salıverilmesini sağlayan faktörler bilinmemektedir. Bax ve diğer Bcl-2 proteinleri por oluşturuvcu proteinlerle yapısal benzerlik gösterdikleri için Bax proteininin mitokondri dış membranında bir transmembran por oluşturabileceği, böylece membran potansiyel kaybı ve sitokrom-c ile AIF'in salınımına yol açabileceği ileri sürülmektedir. Bcl-2 ve Bcl-xL'nin bu por oluşumunu önlemek için görev aldıkları düşünülmektedir. Bax veya Bad proteinlerinin Bcl-2 veya Bcl-xL ile heterodimerizasyonunun onların koruyucu etkilerini önlediği düşünülmektedir.

Aynı zamanda Bax ve Bad gibi bu proteinlerin geniş çapta PT (permeability transition) por oluşumunu ve buna bağlı olarak sitokrom-c kaybı ve apoptozisin başlamasını da sağlayabildikleri düşünülmektedir (94-95). Bcl-2 proteinleri, neden olduğu hasarla mitokondride çatlaklar oluşturarak Sitokrom-c salıverilmesine yol açar (96).

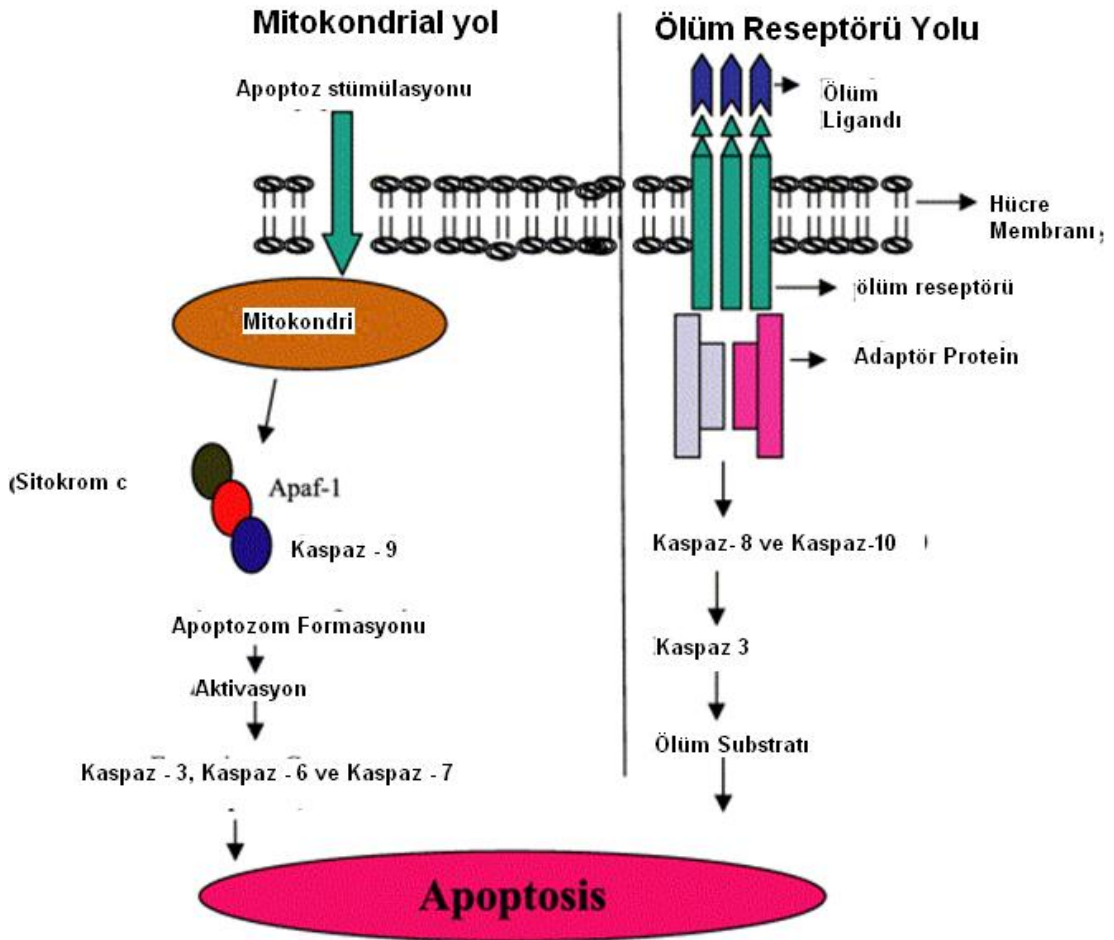
Serbestleşen sitokrom-c apoptotik hücre ölümünde kaspaz-3 aktivasyonu için önemli rol teşkil etmektedir (93). Sitokrom-c sitoplazmik protein olan APAF-1'e bağlanır ve onu aktive eder, ardından ATP'nin de katılımıyla "apoptozom" adı verilen bir kompleks oluşur (97). Bu kompleks inaktif olan prokaspaz-9'un aktif kaspaz-9 haline dönüşmesini sağlar. Aktif kaspaz-9 ise efektör kaspazlardan prokaspaz-3'ü aktive eder.

Kaspaz kaskadında terminal uç kaspaz-3'dür. Bu proteolitik aktivite ile sitoplazmada yapısal proteinlerin sindirimi, kromozomal DNA'nın degradasyonu ve hücrenin fagositozu sağlanır. Aktif kaspaz -3, ICAD'ı CAD haline getirir ve kaspaza bağlı DNA fragmentasyonu başlar (98).

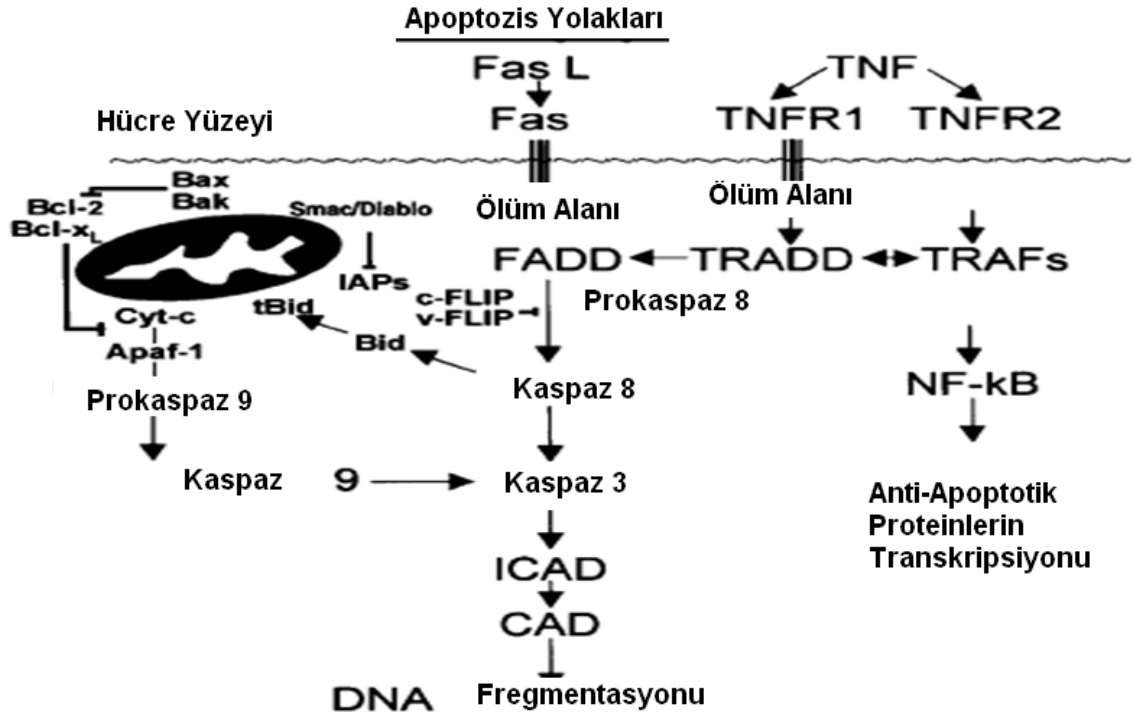
Kaspazlar ayrıca DNA'nın tamirinde görevli olan enzimlerden PARP'ı da engellerler. Böylece DNA küçük parçalara ayrılır.

2. Dış sinyallerle apoptozisin tetiklenmesi:

Birbirini tamamlayan ölüm aktivatörlerinin (Fas-L ve TNF) hücre yüzeyindeki Fas (diğer adları Apo-1/CD95) ve TNF reseptörlerine bağlanmasıyla sitoplazmaya kaspaz kaskadını aktive eden sinyaller yayıldığı bilinmektedir (99). Bu reseptörler TNFR gen ailesinin üyeleridir. Fas, FASR reseptörlerine ve TNF de TNFR-1 reseptörlerine bağlanır. Ligandları ile birleşen reseptörler ölüm uyarıcılarını (FADD ve TRADD) tetikler. Bu sitozolik ölüm reseptörleri prokaspaz-8'e doğrudan bağlanırlar. Bu bağlanma kaspaz-8'in aktivasyonuna neden olur. Kaspaz-8 (kaspaz-9 gibi) diğer kaspazları uyarır ve hücrenin fagositozuna yol açar (99).



Şekil 2.12: Apoptozis yolları



Şekil 2.13: Apoptozis yolakları

3. Endoplazmik retikulum aracılı apoptozisin oluşumu:

Endoplazmik retikulum; protein sentezi, protein katlanması, strese karşı hücrel cevap ve hücre içi Ca^{+2} seviyelerini düzenler. Uzun süreli endoplazmik retikulum stresi hücre ölümüne katkıda bulunur ve birçok farklı dejeneratif hastalığın patofizyolojisi ile bağlantılıdır. Son yapılan çalışmalar β amiloid ve tau protein birikimi ile giden Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, ALS, tip 2 diyabet ve ateroskleroz gibi birçok hastalığın patofizyolojisinde endoplazmik retikulum stresinin rolü olduğu gösterilmiştir (100-104). Endoplazmik retikulum apoptotik sinyallerin yayılmasında, kaspazların ve diğer proteazların aktivasyonunda önemli bir rol oynayabilir. Son zamanlarda amiloid nörotoksitesine katkıda bulunan kaspaz-12'ye bağımlı endoplazmik retikulum aracılı apoptotik yol tarif edilmiştir (105). Bu yol mitokondrial/sitokrom-c ve ölüm reseptör aracılı apoptozisten farklı bir yoldur. Kaspaz-12, endoplazmik retikulum membranında lokalize olan ve endoplazmik retikulum aracılı apoptozis için esas teşkil eden bir kaspazdır. Son çalışmalarda Ca^{+2} seviyelerinin ve kalpainin

endoplazmik retikulumu etkilemesi ile prokaspaz-12'nin aktiflendiği gösterilmiştir. Aktiflenmiş kaspaz-12 sitoplazmaya yönelir. Kaspaz-9 ile etkileşerek sitozolik kaspaz kaskadını aktive eder (106). Böylece ER stresinin oluşturduğu apoptozis kaskadı başlamış olur.

2.3.5. Apoptozisde Hücre İçi Sinyal İletimi ve Metabolik Değişiklikler

Apoptotik sinyal iletimi ile ilgili bu güne kadar elde edilen bilgiler, hücre içi diğer sinyallerin iletiminden sorumlu olan bazı molekül ve enzimlerin, apoptozisteki sinyal iletiminde de rolleri olduğunu göstermektedir.

Ca⁺² iyonu: Hücre içi sinyal iletiminde yaygın olarak kullanılan Ca⁺² apoptoziste de rol oynamaktadır. Hücre içindeki Ca⁺² iyonlarının miktarındaki artış hücreyi apoptozise götürmektedir (79). Sitoplazmadaki Ca⁺² iyonu miktarındaki hafif artış, c-myc, c-fos ısı şok proteinlerini harekete geçirir ve hücrenin apoptozise gitmesine neden olur. Ca⁺² adenilat siklazları aktive ve inhibe etme yeteneğine sahiptir (83). Ayrıca cAMP ve protein kinazlar üzerinden sinyal iletimini etkiler. Hücre içi cAMP konsantrasyonundaki artışın çeşitli hücre tiplerinde apoptozisi uyardığı bildirilmiştir. Sitoplazmada artan Ca⁺², inaktif durumdaki Ca⁺² bağımlı proteazları ve nükleazları aktifleştirerek sitoplazmik proteinlerin parçalanmasına ve apoptozise özgü internükleozomal DNA kırıklarına neden olur (107). Kalsiyum iyonları hücre içinde eşit oranda dağılmamıştır. Endoplazmik retikulum içinde sitoplazmadan daha fazla Ca⁺² iyonu mevcuttur. Endoplazmik retikulumda yüksek Ca⁺² iyonu olmasını sağlayan ve sitoplazmadan Ca⁺² taşıyan Ca⁺²-ATPase pompasının inhibe edilmesi durumunda, sitoplazmada Ca⁺² yoğunluğunun artması ile hücrenin apoptozise gittiği gözlenmiştir (83). Ca⁺² iyonu, inaktif durumdaki endonükleaz, proteaz, transglutamaz, fosfolipaz gibi latent enzimleri aktive ederek apoptozise neden olur (107)

Kalsiyuma bağlı endonükleazlar: Endonükleazlar sitoplazmada artan Ca⁺² tarafından aktif hale getirilir. DNA zincirini, H₁ histon bölgesinden 180-200 baz çifti ve katları uzunluğunda parçalara ayırır (107-110).

Transglutamazlar: Apoptoziste hücreler büzülür ve küçük parçalara ayrılır. Bu parçalar; transglutamazların yaptığı protein çapraz bağlanmaları ile kimyasal maddelere karşı dayanıklı hale getirilir (79-83).

Proteazlar: Proteazlar histonları ve kromatin yapısını stabilize eden proteinleri parçalarlar (110). Kalsiyum bağımlı nötral bir proteaz olan 'kalpin' hücrenin iskelet yapısını bozar (107). Lizozomal bir proteaz olan katepsin-D apoptozisin geç evresinde ortaya çıkan bir endopeptidazdır ve lizozomların proteolitik aktivitesinin oluşumunda önemlidir (83-111).

Lipid Modifiye Edici Enzimler: Normal hücrelerin plazma membranlarında fosfolipid asimetrisi vardır (Membran fosfolipidlerinin hücre dışında ve içinde kalan kısımları farklıdır). Bu asimetri ATP'ye bağımlı fosfolipid translokaz enzimi tarafından sağlanır (83). Apoptotik indüksiyon olduğunda bu enzim etkilenir ve zar asimetrisi bozulur. Makrofajlar hücreyi yabancı bir hücre olarak algırlar ve fagosite ederler (112).

Protein Kinazlar: Protein fosforilasyonunda rol oynayan zar ve sitoplazma enzimlerinin apoptotik sinyallerin iletiminde önemli oldukları kanıtlanmıştır. Bu enzimlerden protein kinaz-A, apoptozisi sağlarken, protein kinaz-C apoptozisi durdurur (79- 108).

2.3.6. Apoptotik Hücrede Gözlenen Morfolojik Değişiklikler

Ölmek üzere komut almış hücreyi, apoptotik ölümün başlangıcında normal hücreden ayırt etmek mümkün değildir. Yaklaşık iki saat sonra, komut almış hücrenin kromatini yoğunlaşmaya başlar ve belirli bölgelerde sıkışıkları izlenir. Sitoplazma yoğunlaşmaya ve hücrenin boyutları küçülmeye başlamıştır. İkinci saatin sonunda apoptozise uğrayan hücrelerde yeni değişiklikler ortaya çıkar. Hücre apoptotik cisimcik denilen daha küçük parçalara bölünür. Bu parçacıkların en büyük özelliği, parçalanmış nükleusların ve parçalanmış hücreye ait tüm yapıların plazma membranı ile kaplanarak immün sistemi enflamasyon yönünde uyarmamasıdır. Apoptotik cisimcikler, yüzeylerinde yeni sinyal yapıları ortaya çıkarır ve bu sinyalin uyarısı ile yandaki hücre tarafından fagosite edilerek ortadan kaldırılır.

Apoptozise giden hücrenin morfolojisinde şu özellikler görülür ;

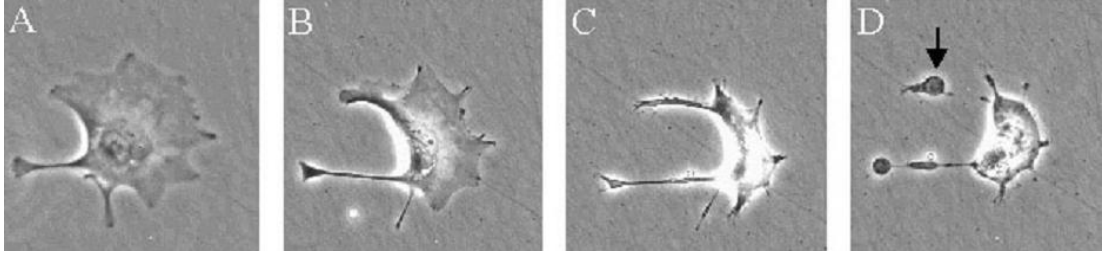
1. Yüzey Organellerinin Kaybı: Apoptozise uğrayan hücrenin komşu hücrelerle bağları kesilir. Hücre yüzeyindeki mikrovillusle ve diğer hücrelerle yaptıkları özel bağlar ortadan kalkar, hücre yüzeyi yuvarlaklaşır (109,113).

2. Hücre Büzülmesi: Apoptotik hücre komşu hücreye göre daha küçük ve sitoplazması daha yoğundur. Endoplazmik retikulum dışında diğer hücre organelleri yapılarını korur (111). Sitoplazma yoğunluğu arttığı için organeller kalabalık görünür. Hücre zarı sağlam olduğundan nekrozda olduğu gibi bir inflamatuvar reaksiyon gözlenmez (79, 109,113).

3. Kromatin Yoğunlaşması: Önemli yapısal değişiklikler çekirdekten başlayarak izlenir. Çekirdek apoptoziste odak noktasıdır. Hücreden hücreye değişmekle birlikte genellikle çekirdek büzülür (109,111). 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. Çekirdekçiğ genişler ve granülleri kaba granüller halinde dağılır (79, 109,113).

4. Sitoplazmik Baloncuklar ve Apoptotik Cisimlerin Oluşması: Hücrede önce yüzeye doğru tomurcuklanmalar olur. Bunlardan bazıları sitoplazma parçacıkları içeren ve sıkı biçimde paketlenmiş organellerden oluşan zarla sarılı apoptotik cisimlere dönüşür (79,113).

Apoptozis için morfolojik değişimler hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, hücre membran tomurcuklanması olurken fosfolipidlerin de açığa çıkar. Sağlıklı hücrelerde plazma membranının içinde bulunan fosfolipidlerin apoptotik hücrelerde plazma membranının dış yüzünde bulunur ve fagositik hücreler için sinyal görevi görür (114).



Şekil 2.14: apoptotik hücrede gözlenen değişiklikler

2.3.7. Apoptozis ve Nekroz Arasındaki Farklar

Apoptozis, hücrede yarattığı bu değişikliklerle nekrozun bir parçasıymış gibi algılanabilir. Ancak nekrozdan farkları şunlardır:

Fiziksel Farklılıklar

1. Nekroz bileşik hücre gruplarını etkiler, oysa apoptoziste tek tek hücreler etkilenir (83-113)

2. Nekroz fizyolojik olmayan uyaranlarla baslar, apoptozis fizyolojik uyaranla da başlayabilir (hormonal dengenin değişmesi) (83-113).

3. Nekroza uğrayan hücre, çevreye yaydığı kemotaktik maddeler aracılığı ile çağrılan makrofajlar tarafından fagosite edilir. Apoptozise uğrayan hücre ise çevreye kemotaktik madde yaymaz; yanında bulunan epitel hücreleri veya makrofajlar aracılığı ile fagositoza uğrar. Nekrozda inflamatuvar cevap vardır, apoptoziste ise yoktur (83, 115-116).

Morfolojik Farklılıklar

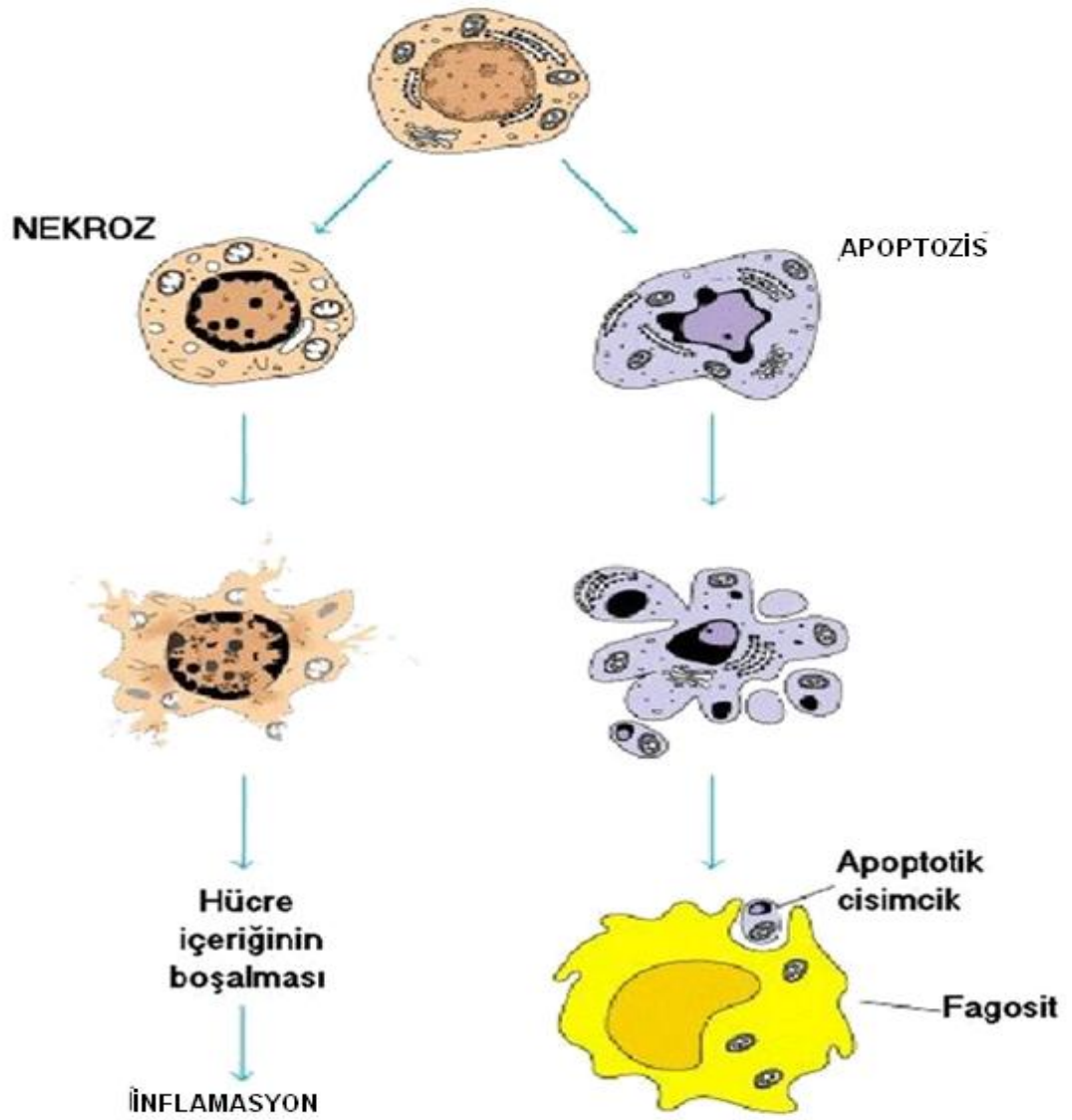
1. Nekrozda zar bütünlüğü bozulur, apoptoziste zarda kabarcıklar görülür fakat asla zar bütünlüğü bozulmaz (111,117).

2. Nekroz sitoplazma ve mitokondride şişme ile baslar, apoptoziste ise sitoplazmada büzülme ve çekirdek yoğunlaşması görülür (111,116)

3. Nekroz total hücre parçalanması ile sonlanır, oysa apoptozis hücrenin daha ufak fragmanlara dönüşmesi ile sonlanır (apoptotik cisimler) (116).

4. Nekrozda hücre zarında vezikül formasyonu yoktur, total parçalanma olur; oysa apoptoziste zara bağlı veziküller oluşur (79).

5. Nekrozda organellerin devamlılığının bozulması mevcut iken, apoptoziste; apoptozisi başlatan bcl-2 gen ailesinin ürettiği por oluşturan proteinlerin etkisi ile organeller bütünlüğünü korur, ancak delikli bir yapıya kavuşur (79, 111).



Şekil 2.15: Apoptoz ve nekroz arasındaki farklar

Biyokimyasal Farklılıklar

1. Nekrozda iyon dengesi kaybolur, apoptoziste ise sıkı bir şekilde kontrol edilen enzimatik olaylar mevcuttur (113).

2. Nekroz enerjiye ihtiyaç duymaz, pasif bir olgudur ve +4°C'de bile gerçekleşebilir. Apoptozis ise enerji gerektiren aktif bir olgudur ve +4°C'de gerçekleşemez (79).

3. Agaroz jel elektroforezi yapıldığında, nekroz sırasında DNA'nın rastgele sindirimi mevcuttur, oysa apoptoziste rastgele olmayan, mono-oligonükleozomal parçalanma mevcuttur. Bu da agaroz jel elektroforezde apoptozis için karakteristik 'ladder pattern' denen merdiven şeklinde kırılmalar meydana getirir (108,113)

4. Nekroz sırasında hücre ölümünün geç bulgusu; postlitik DNA parçalanması vardır, apoptoziste DNA hücre bütünlüğü bozulmadan önce parçalanır. Ayrıca apoptoziste mitokondri tarafından sitoplazmaya birçok faktör salınımı mevcuttur (sitokrom-c gibi.) (108,114).

5. Nekroz sırasında nonspesifik zar parçalanması olurken, apoptoziste zar asimetrisinde değişiklikler olur (fosfolipidlerin zarın sitoplazmik yüzünden ekstrasellüler yüzüne doğru yer değiştirir). Bu değişiklik apoptotik hücrenin inflamatuvar reaksiyon oluşturmadan lokal hücrelerce tanınıp, fagosite edilmesini sağlar (79).

2.4. NÜKLEER FAKTÖR KAPPA B

Yaklaşık 25 yıl önce B lenfosit hücrelerinde NF-κB'nin ilk üyesi David Baltimore tarafından keşfedildi. İlk olarak lipopolisakkarit ile uyarılmış B hücrelerinde immünglobulin kappa hafif zincir dizisine bağlı bir protein olarak tanımlanmıştır (117). Bu tarihten sonra birçok araştırmacı tarafından NF-κB'nin karmaşık yapısının aydınlatılabilmesi için yüzlerce çalışma yapıldı. (118-120). Bu çalışmalarda NF-κB'nin aslında tek bir molekül değil, transkripsiyon faktörü olarak

görev yapan karmaşık bir protein kompleksi olduğu, ve sadece B hücrelerinde değil de bütün hücrelerin stoplazmasında latent halde bulunan transkripsiyon faktör prototipi olduğu anlaşıldı (121). Ökaryotik hücrelerde NF-κB ailesi üyeleri büyüme, gelişme ve immün yanıt gibi birçok yaşamsal faaliyetin gen ekspresyonunu düzenlerler. NF-κB transkripsiyon faktörleri sitokinler, patojenler, yaralanmalar gibi stres yapan faktörler tarafından aktive edilir. Aktivasyonu çok hassas bir şekilde kontrol edilir ve uygunsuz aktivasyonu sonucu otoimmün hastalıklar, kronik inflamasyon ve birçok kanser türü gibi hastalıklara neden olabilir (123-124).

2.4.1. NF-κB'nin yapısı

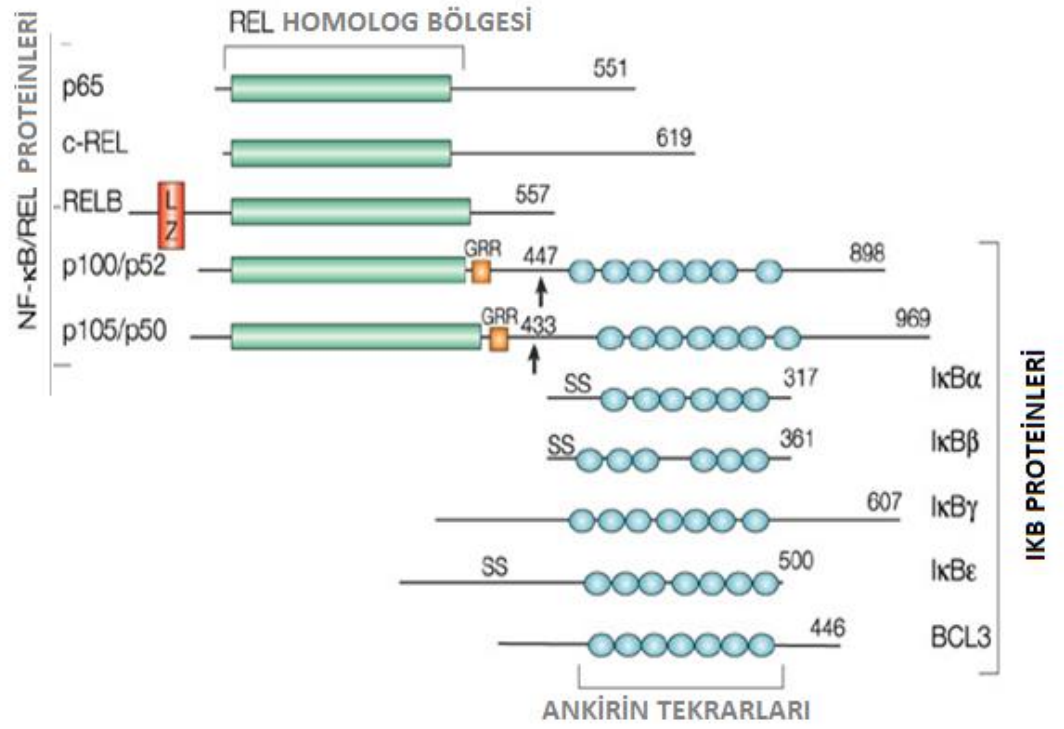
NF-κB sinyalizasyonu birbirine homodimer veya heterodimer olarak bağlanan polipeptitlerden oluşan RHD tarafından oluşturulur (9).RHD' nin dimerizasyondan, DNA 'ya bağlanmaktan ve Iκb 'ye bağlanmaktan sorumlu 5 tane monomeri vardır: RelA, RelB, cRel, p50 ve p52. Bu monomerler birleşerek 15 farklı dimer yapısı oluştururlar (125).

NF-κB monomerleri 2 sınıfa ayrılır:

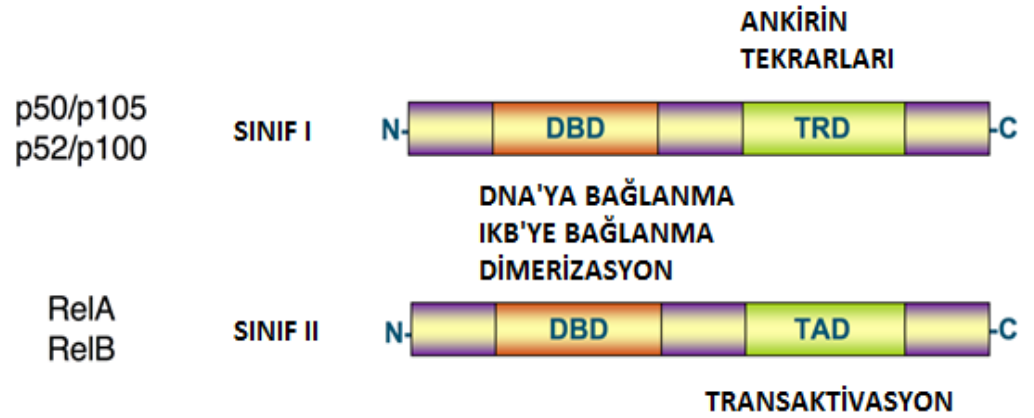
Sınıf 1: p 50 ve prekürsörü p105 ile p52 ve prekürsörü p100 bu sınıftadır. Bu sınıf monomerlerde Iκb benzeri ankrin tekrarları mevcuttur. Bu nedenle proteolizden veya translokasyon arrestinden sorumludur. Bu yapıda transaktivatör bölge olmadığı için transkripsiyondan sorumlu değildir. (126-129).

Sınıf 2 : Rel A, Rel B ve c-Rel bu sınıftadır. Transaktivatör bölge içerir ve transkripsiyondan sorumludur (126-129).

Her iki bölgede de bulunan Rel Homolog domain ise dimerizasyondan, IκB'ye ve DNA' ya bağlanmaktan sorumludur.



Şekil 2.16: NF-κB'nin yapısı (130)



Şekil 2.17: NF-κB'nin yapısı (131).

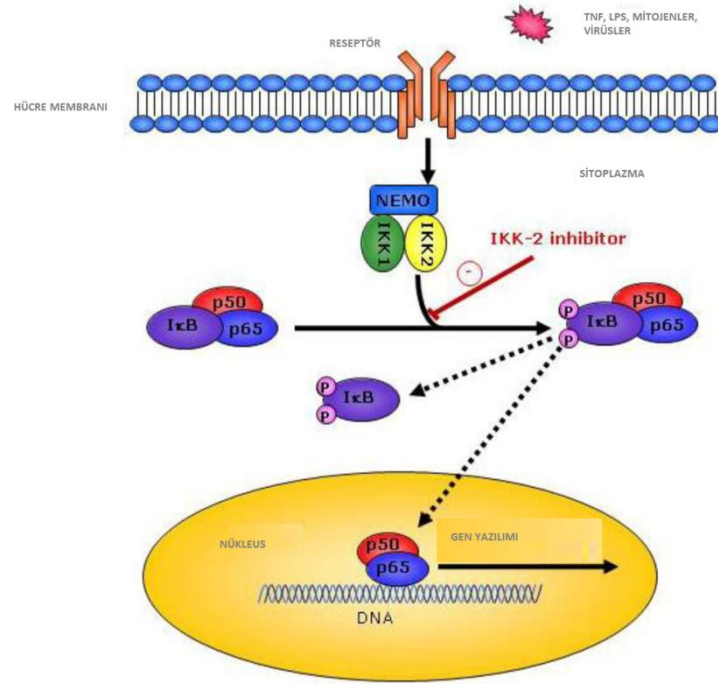
Bütün monomerlerin üretimi transkripsiyonel olarak düzenlenir. Ancak p50 ve p52 nin üretimi öncü p105 ve p 102 molekülleri tarafından da düzenlenir. NF-κB dimer tipi, uyaran ve hücre tipine göre değişmekle birlikte en önemli dimerler RelA:p50, cRel:p50 ve RelB:p52 dir (132).

NF-κB'nin klasik inhibitör proteini IκB üç alt üiteden oluşur. IκBα, IκBβ ve IκBε. Dinlenme halinde IκB, NF-κB'ye bağlı halde stoplazmada bulunur ve NF-κB'nin DNA ya bağlanmasını önler. Uyarı geldiğinde IKK; IκB'yi NF-κB'den ayırır ve NF-κB'nin aktivasyonunu sağlar (133). Bu basamak NF-κB aktivasyonunda hız kısıtlayıcı basamaktır (134). NF-κB'nin aktivasyonu ile birlikte inflamatuvar, gelişimsel ve yaşamsal genler indüklenir.

NF-κB'nin aktivasyonu

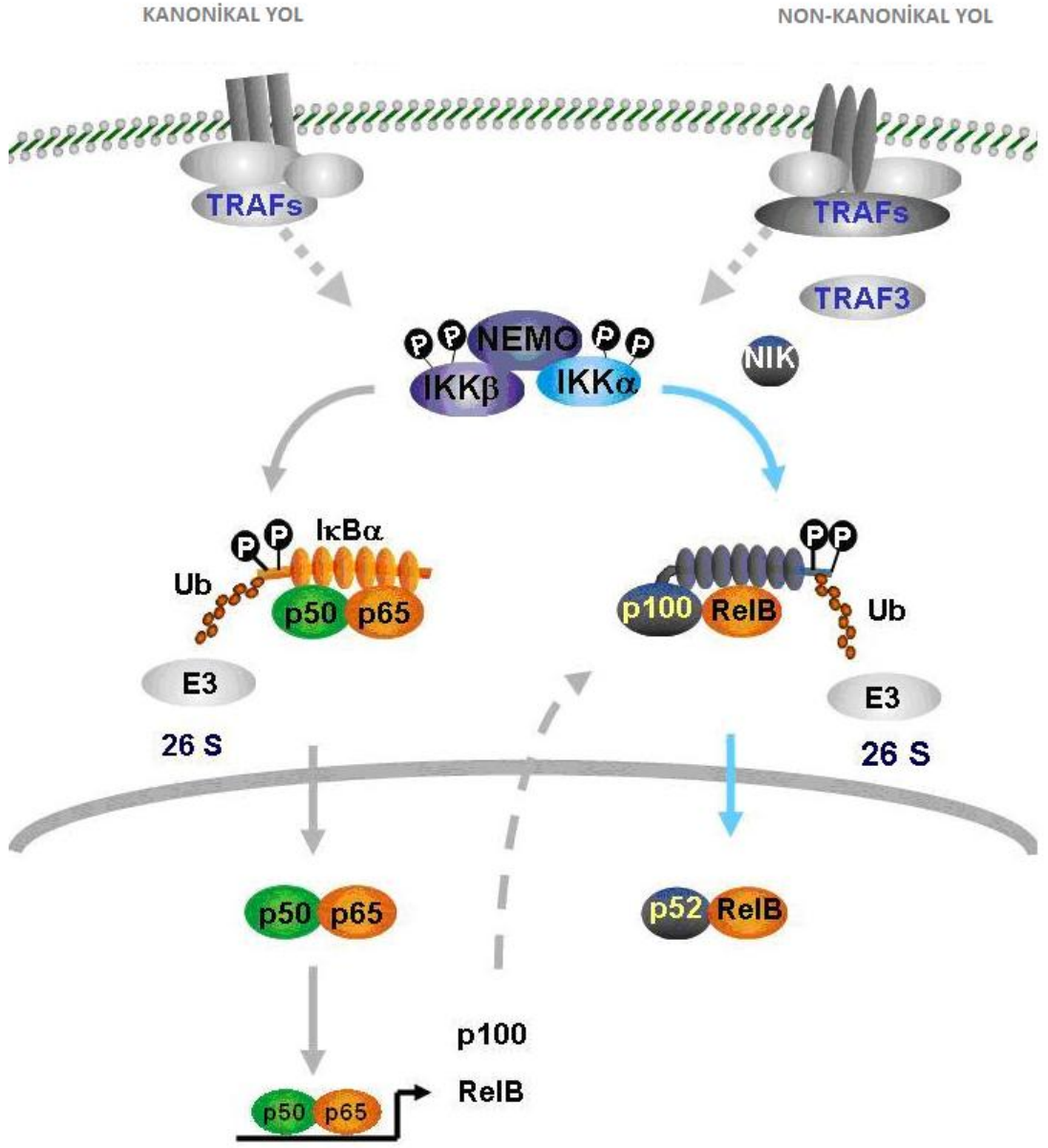
Aktivasyon hızlı-geri dönüşümlü kanonikal yolla veya yavaş-geri dönüşümsüz non kanonikal yolla olabilir.

Kanonikal yol: NEMO (IKKγ)-bağımlı IKK aktivasyonu ile olur (135). Kanonikal yolda latent NF-κB dimerleri IκB den ayrılır, serbestleşir. Bu yolak sitokinler, patojen ilişkili moleküler patern (PAMPs) ve bazı zararlı moleküler paternler (DAMPs) tarafından aktive edilir. NF-κB'nin aktivasyonunda en sık kullanılan ve en hızlı yolaktır (136). Bu yolağın aktivasyonu için 900 kDa ağırlığındaki IκBα, IκBβ ve IκBε'dan oluşan IKK'nin aktive olması gerekir (137). Bu yolakta primer olarak RelA/p65, cRel ve p50 den oluşan dört dimer (RelA:RelA, RelA:p50, cRel:cRel, cRel:p50) aktiflenir (125).



Şekil 1.18: Kanonikal Yol (138)

Nonkanonikal yol: IKK1 ve NIK kompleksini içeren NEMO bağımsız IKK aktivasyonu ile oluşur (135). Nonkanonikal yolda p100 ve Rel B sentezlenerek RelB:p52 kompleksi oluşur. Bu yolağın aktivasyonu lenfoid organ gelişimi ve adaptif immün yanıt için önemlidir (125).



Şekil 2.19: Kanonikal ve Non-Kanonikal Yol (139).

2.4.2. NF-κB'nin yaşamsal faaliyetlerdeki ve apoptozdaki rolü

NF-κB'nin hücre ölümü üzerindeki etkisi uyarıcı ve hücre tipine göre değişiklik gösterebilmektedir (127). p50 /c-Rel dimerizasyonu ve p50/Rel A dimerizasyonu fazla olan WEHI 231 B lenfoma hücre kültüründe hücrelerin Ig M yüzey antijeni ile uyarılması sonucunda, NF-κB'nin DNA'ya bağlanması önce

geçici bir yükseklik olurken ardından DNA'ya bağlanmada azalma ve bununla ilişkili olarak apoptozis görülmüştür. Bu çalışmada apoptozisin NF- κ B'nin DNA'ya bağlanmasındaki azalmaya bağlı olduğu gösterilmiştir (140). Aslında c-Rel düzeyinin hücre içinde artması apoptozisten koruyucu bir etki oluşturur (140). Ancak WEHI 231 B lenfoma hücreleri ile primer B lenfosit hücreleri arasında da aynı uyarana karşı verilen NF- κ B bağımlı apoptotik cevap da birbirinden farklıdır (141).

<i>Hücre tipi</i>	<i>Sinyal idükleyicisi</i>	<i>Aktiflenen Rel üyesi</i>
Sıçan striatumu	Quinolik asit, dopamin	RelA/c-Rel
Sıçan striatal nöronları	NMDA	
Nöronlar	Fokal iskemi	P50/RelA ve p50/p50
Hipokampal nöronlar	Global serebral iskemi	P50/RelA
Rat primer serebellar granüler hücreleri	Glutamat	
PC12 hücreleri	Oksidize lipoproteinler	
Dopaminerjik nöronlar	seramid	

Tablo 2.4.1. NF- κ B'nin proapoptik etkisi

<i>Hücre tipi</i>	<i>Sinyal idükleyicisi</i>	<i>Aktiflenen Rel üyesi</i>
Fetal sıçan optik nöron	β amiloid peptid	
Kültüre hipokampal nöron	β amiloid peptid A β (25-35) ve A β (1-40)	
Serebellar granüler hücre	β amiloid peptid A β (1-40)	
Hipokampal nöron	Hipoksi, nitrik oksit	RelA
PC12 hücreleri	β amiloid peptid	P50/RelA ve c-Rel
Fokal serebral iskemi	Fokal iskemi	RelA
Sempatik nöron	NGF	
W661 fotoreseptör hücreleri	Foto-oksidatif stres	RelA
Trigeminal ganglionun NGF bağımlı sensori nöral hücreleri	Mutant I κ B α	

Tablo 2.4.2. NF- κ B'nin antiapoptotik etkisi

2.4.3. NF- κ B ve sinir sistemi

Antikor boyamalarla NF- κ B'nin SSS'nde glutamerjik nöronlarda, hipokampüste (granül hücreleri, CA1 ve CA3 piramidal hücreler) ve serebral kortekste yüksek oranda bulunduğu göstermiştir (142-144). NF- κ B aktivitesi SSS'de L-tipi Ca kanal blokörleri ve glutamat ile inhibe edilebilir (145-146). Bu da NF- κ B'nin bazal sinaptik geçişle alakalı olabileceği sonucunu doğurur (147) . NF- κ B SSS'de öğrenme, hafıza ağrı oluşumu gibi birçok faaliyette aktif görev alır. (147).

Birçok çalışma NF- κ B'nin nöronal hücre hasarı modelinde apoptozu desteklediğini göstermiştir (148-150). Örneğin rat primer nöron kültürlerinde glutamat nörotoksisitesinde NF- κ B miktarı artar ve apoptoz oluşur (150-151). Aynı şekilde hungtington hastalığı modeli oluşturulmuş ve şimerik β -globulin geni olan sıçanlarda yapılan çalışmalarda da NF- κ B'nin apoptotik rolü olduğu gösterilmiştir (152-153).

Ancak bunların yanında NF- κ B'nin apoptozisten koruyucu etkilerinin olduğunu gösteren çalışmalar da vardır. Örneğin Alzheimer hastalarında I κ B miktarının arttığı gösterilmiştir (154). Tablo 2.4.1 ve 2.4.2 de de gösterildiği gibi NF- κ B farklı hücre tiplerinde farklı uyarımlarla proapoptotik veya antiapoptotik aktivite gösterebilir.

3. MATERYAL VE METOD

Çalışmamızda kullanılan insan nöroblastoma ve glioblastoma hücre serileri (SH-SY5Y ve T98G) İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi Histoloji Bölümü Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. Fluoksetin, imipramin ve maprotilin saf maddeleri Mustafa Nevzat İlaç Sanayii Anonim Şirketi kalite kontrol biriminden temin edilmiştir. Uygulama sırasında fluoksetin ve maprotilin %100 DMSO ile çözdürülmüş ve uygulamadan önce uygulanan son DMSO konsantrasyonu %0.2' nin altında olacak şekilde bidistile saf su ile dilüe edilmiştir. İmipramin ise bidistile saf suda çözülerek, tüm etken maddeler her iki hücre serisinde de denenmek üzere ardışık dozlarda hazırlanmıştır. Fluoksetin, imipramin ve maprotilinin farklı dozlarının eklendiği hücre gruplarında hücre canlılığı, kaspaz ve NF-κB ölçüm testleri yapılmıştır. Çalışmanın tamamı Abant İzzet Baysal Üniversitesi İzzet Baysal Tıp Fakültesi Farmakoloji A.D. hücre kültürü laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. KİMYASALLAR

- 1) DMEM:F12, Gibco
- 2) Fetal Bovine Serum, Gibco
- 3) Tripsin EDTA, %0.05, Gibco
- 4) DMSO, Sigma
- 5) Antibiyotik-Antimikotik, Gibco 100X
- 6) Caspase 3 colorimetric kit, eBioscience
- 7) Caspase 8 colorimetric kit, eBioscience
- 8) NF-κB colorimetric kit, eBioscience
- 9) İκB colorimetric kit, eBioscience
- 10) MTT, Roche
- 11) DNA Extraction kit, THERMO-Fermentas
- 12) PBS, Santa Cruz 10X liquid
- 13) Biüret çözeltisi
- 14) Bovine Serum Albumine, %10, Beit Haemek
- 15) Annexin V, Invitrogen

- 16) Fluoksetin, Mustafa Nevzat İlaç Sanayii
- 17) İmipramin, Mustafa Nevzat İlaç Sanayii
- 18) Maprotilin, Mustafa Nevzat İlaç Sanayii

3.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ

3.2.1. Hücre ekimi

Dondurulmuş halde sıvı azot tankında bulunan kriyotüplerdeki SH-SY5Y ve T98G hücreleri 37°C'lik su banyosunda hızla çözöldürölmüş olup (hücrelerin bulunduğu kriyo tüpünün kapak hizasının suya batırılmamasına dikkat edilmiştir) hücreler çözöldükten sonra kriyo tüp ve kapağı %70'lik alkol ile silinmiştir. 15 ml'lik santrifuj tüpüne aktarılıp üzerine 5 ml medyum (%10 FCS, %1 antibiyotik, DMEM) yavaşça eklenmiştir. Tüp 1300 rpm'de 3 dakika santrifüj edilip, tüpün dibindeki hücre pelleti kalacak şekilde süpernatant dökölmüştür. Ardından hücre pelleti üzerine 10ml yeni medyum eklenerek hücreler iyice süspanse edildikten sonra, hücreler 75 cm²'lik flasklara aktarılmıştır. Ardından mikroskop altında incelenmiştir. Hücrelerin buldukları flasklara penetre olmaları ve yeniden çoğalmaya başlamaları için hücreler CO₂'li inkübatöre konularak bir gün beklemeye alınmıştır. Bir gün sonrasında mikroskop altında hücrelerin canlılığı incelenip, medyumları değıştirilmiştir.

3.2.2. Tripsinizasyon

Hücreler 24 saatlik inkübasyondan sonra inkübatörden alınıp, steril laminar kabinde içerisinde hücre flaskındaki medyum dökölmüştür. Flaskın yüzeyine yapışmış halde bulunan hücreler 2 ml steril PBS ile yıkandıktan sonra PBS dökölmüş ve hücrelerin üzerine flask içine 2 ml %0,05'lik tripsin-EDTA dökölmüştür. Sonrasında hücrelerin zeminden ayrılması için bir müddet inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücrelerin flask yüzeyinden tek tek ayrılıp ayrılmadıkları

mikroskop altında kontrol edilmiştir. Hücreler, yüzeyden ayrıldıktan sonra pastör pipeti yardımıyla steril 15 ml'lik deney tüpüne aktarılmıştır. Tripsinin etkisini sonlandırmak için hücre süspansiyonunun üzerine 4 ml medyum eklenmiş ve süspansiyon 1300 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırılıp, ardından tüpün dibinde kalan hücre pelleti 4 ml medyum içinde süspanse edilmiştir. Hücreler Thoma lamında sayılarak istenen sayıda flaska ekim yapılmıştır.

3.2.3. Hücrelerin Pasajlanması

Hücrelerin pasajlanması, hücrelerin çoğalma kapasitesine göre üç-dört günde bir olacak şekilde yapılmıştır ve bir önceki kültürdeki hücreler tripsin-EDTA ile kaldırılıp, 1300 rpm'de 3 dakika santrifüj edildikten sonra toplam hücre miktarının en fazla 1/3'ü kadar hücre taze besiyerine alınıp 75 cm²'lik flaskalara aktarılması şeklinde yapılmıştır. Çalışmadan bir önceki pasajın semi-konflüens hücreler kullanılarak yapılmasına ve pasajdan sonra hücrelerin zemine tutunabilmeleri için 24 saat beklenmesine dikkat edilmiştir.

3.3. DENEY DİZAYNI

Deney üç aşamalı olacak şekilde oluşturulmuştur. Bu çalışmada SH-SY5Y ve T98G hücre serilerinde antidepresan ilaçların hücre yaşayabilirliği üzerine etkileri, bu etkileri meydana getirdikleri dozları ve uygulama şekilleri literatürde farklı bulunmaktadır. Bu doz ve etki farklılıklarının sebebinin; ilaç çözücülerinin, hücre tipinin, hücre yoğunluğunun, hücreler için kullanılan medyumların ve laboratuvar farklılıkları gibi etkenlerden dolayı olduğu düşünülmektedir. Bundan dolayı deneylere öncelikle bu maddeler için toksik doz belirlemekle başlanılmıştır.

3.3.1. Deneyin 1. Aşaması: Gözlemsel Olarak Toksik Dozların Belirlenmesi

Fluoksetin, imipramin maprotilinin farklı dozları hazırlanmıştır.

- **Fluoksetin için;** 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 5×10^{-5} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} M
- **İmipramin için;** 1×10^{-3} , 5×10^{-4} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} M
- **Maprotilin için;** 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 5×10^{-5} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} M

Bir gün öncesinden 24 kuyulu plakanın her bir kuyusuna sırasıyla 300000 hücre/ml ve 100000 hücre/ml konsantrasyonlarında ekilmiş SH-SY5Y ile T98G hücrelerinin üzerine farklı dozlarda hazırlanmış fluoksetin, imipramin maprotilin, bu iki hücre serisi üzerine eklenmiştir. 24 saat sonunda fluoksetin, imipramin maprotilinin etkileri mikroskop altında incelenerek, görüntüleri kaydedilmiştir. Yapılan deneyler 3 kez tekrarlanmıştır.

3.3.2. Deneyin 2. Aşaması: MTT Testi ile Belirlenen Toksik Dozların Doğrulanması

Her iki hücre serisinde gözlemsel olarak üç madde için de toksik doz sınırı tespit edildikten sonra ikinci deney için fluoksetin, imipramin maprotilinin 7 farklı dozu belirlenmiştir.

SH-SY5Y hücre serisinde:

- **Fluoksetin için;** 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 5×10^{-5} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} M

- **İmipramin için;** 1×10^{-3} , 5×10^{-4} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} M
- **Maprotilin için;** 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 5×10^{-5} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} M

T98G hücre serisinde:

- **Fluoksetin için;** 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 5×10^{-5} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} M
- **İmipramin için;** 1×10^{-3} , 5×10^{-4} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} M
- **Maprotilin için;** 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 5×10^{-5} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} M

Yine sırasıyla 30.000 hücre/ml ve 10.000 hücre/ml konsantrasyonlarında SH-SY5Y ile T98G hücreleri ekilmiş 96 kuyulu plakanın her bir kuyusuna fluoksetin, imipramin ve maprotilinin belirlenen dozları 1/1 oranında eklenmiştir. 24 saat sonunda MTT testi yapılarak doz-cevap sonuçları elde edilmiştir. Yapılan deneyler 3 kez tekrarlanmıştır.

MTT Testi: Kolorimetrik metod olarak ilk kez Mossmann (1983) tarafından tanımlanan bu testte, sarı tetrazolium tuzu canlı hücrelerin mitokondrilerindeki dehidrogenaz enzimleri aracılığı ile tetrazolium halkasının kırılması sonucu formazan kristallerine dönüştürülmektedir. Oluşan formazan kristalleri izopropanol veya DMSO gibi çözücülerde çözülmesi sonucu ortamda oluşan renk, spektrofotometrik yöntemle ölçülür ve ölçülen değer canlı hücrelerin sayısı ile ilişkilidir (155). (102) 102. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. Journal of Immunological Methods. 1986; Vol: 89, Issue 2, Pages 271-277.

MTT solüsyonunu eklemeyen önce hücrelerin üzerindeki medyum tazelenmiş ve MTT solüsyonu son konsantrasyon 1/10 olacak şekilde bütün örnekler eklenmiştir. 4 saat 37°C'deki etüvde inkübe edildikten sonra oluşan formazan son ürününün çözünebilmesi için örneklerin üzerine 1'e 1 hacim olarak DMSO eklenmiş ve çözünmesi için bir süre (yaklaşık 1 gece) 37°C'deki etüvde bekletilmiştir. Örneklerdeki çözülmüş formazan miktarı ELISA okuyucuda 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

3.3.3. Deneyin 3. Aşaması: Fluoksetin, İmipramin ve Maprotilinin Olası Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi

Her iki hücre serisinde gözlemsel ve MTT yöntemi ile doz cevapları belirlendikten sonra ortaya çıkan hücre ölümünün şeklinin anlaşılması ve apoptoz olmuşsa yolağının belirlenmesi için fluoksetin, imipramin maprotilinin farklı dozları hazırlanmıştır.

SH-SY5Y hücre serisinde:

- **Fluoksetin için;** 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 5×10^{-5} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} M
- **İmipramin için;** 1×10^{-3} , 5×10^{-4} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} M
- **Maprotilin için;** 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 5×10^{-5} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} M

T98G hücre serisinde:

- **Fluoksetin için;** 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 5×10^{-5} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} M
- **İmipramin için;** 1×10^{-3} , 5×10^{-4} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} M
- **Maprotilin için;** 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 5×10^{-5} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} M

Kolorimetrik Kaspaz 3 ELISA Metodu:

Kaspaz-3 seviyeleri eBioscience kaspaz-3 kolorimetrik ölçüm kiti kullanılarak ölçülmüştür. Yöntemin prensibi kaspaz-3 antikoruna ile kaplı olan kuyucuklara substrat konularak oluşan kompleksin spektrofotometrik olarak ölçümü esasına dayanmaktadır.

SH-SY5Y ve T98G hücreleri sırasıyla 1.000.000 sayıda 25 cm²'lik kültür kaplarına ekilmiştir. Ekilen hücreler 1 gün inkübasyondan sonra 1 gün de ilaç uygulamasına bırakılmıştır. Fluoksetin, imipramin ve maprotilinin farklı dozları ile hücreler muamele edilmiştir. İlaç uygulamasının sonunda ELISA kitinin içerisinde bulunan protokol uygulanmıştır:

1. Hücreler kültür kaplarından tripsin ile çıkarılıp, medyumları ile birlikte 15 ml'lik deney tüplerine toplandı ve 1500 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.
2. Süpernatantları atılarak hücrelerin üzerlerine 1,5 ml medyum eklenip süspansiyon edildikten sonra ependorf tüplerine aktarıldı.
3. Ependorf tüpündeki hücre süspansiyonu 4000 rpm'de 4 dakika santrifüj edildi.
4. Süpernatantları atıldıktan sonra pellet üzerine 50 µl Cell Lysis Buffer eklendi ve vorteks ile hafifçe süspansiyon edildikten sonra oda sıcaklığında 60 dakika inkübe edildi.
5. Örnekler 15 dakika 3900 rpm'de santrifüj edildikten sonra süpernatantları ayrı ependorflara aktarıldı ve buzun üzerine konuldu.
6. Herbir örnekten 15 µl protein süspansiyonu alınıp 96 kuyucuklu ELISA plakasının kuyucuklarına konuldu. Plakanın başka kuyucuklarına da %10'luk sığır serum albümin solüsyonundan hazırlanan 0-1-2-4-8-16-32 mg/ml konsantrasyonlarındaki kalibratörler eklendi. Örneklerin üzerlerine 90 µl Biüret solüsyonu eklendikten sonra 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
7. Örneklerin protein miktarları, kalibrasyonlar ile ELISA okuyucuda 570 nm dalga boyunda ölçüldü.

8. Ependorf tüplerindeki geride kalan protein solüsyonları içeriğindeki protein miktarları Cell Lysis Buffer solüsyonu ile seyreltilerek eşitlendi.
9. ELISA plakasının kuyucuklarına 140 µl distile su yerleştirildi.
10. Üzerlerine 10 µl protein bileşimi eklendi.
11. Üzerleri kaplanan oda sıcaklığında 3 saat inkübe edildi.
12. 3 saatin sonunda kuyucuklar 6 kez wash buffer ile yıkandı.
13. Üzerlerine 100 µl TMB Substrate Solution'u eklendi.
14. Oda sıcaklığında yaklaşık 10 dakika inkübasyondan sonra 100 µl stop solüsyonu eklendi. ELISA okuyucu ile 450 nm dalga boyunda ölçüldü.
15. Gruplardaki kaspaz-3 seviyelerinin kontrol grubuna göre kaç kat artış veya azalış gösterdikleri hesaplandı.

Kolorimetrik Kaspaz 8 ELISA Metodu:

Kaspaz-8 seviyeleri eBioscience kaspaz-8 kolorimetrik ölçüm kiti kullanılarak ölçülmüştür. Yöntemin prensibi kaspaz-8 antikoruna ile kaplı olan kuyucuklara substrat konularak oluşan kompleksin spektrofotometrik olarak ölçümü esasına dayanmaktadır.

SH-SY5Y ve T98G hücreleri sırasıyla 1.000.000 sayıda 25 cm²'lik kültür kaplarına ekilmiştir. Ekilen hücreler 1 gün inkübasyondan sonra 1 gün de ilaç uygulamasına bırakılmıştır. Fluoksetin, imipramin ve maprotilinin farklı dozları ile hücreler muamele edilmiştir. İlaç uygulamasının sonunda ELISA kitinin içerisinden çıkan protokol uygulanmıştır:

1. Hücreler kültür kaplarından tripsin ile çıkarılıp, medyumları ile birlikte 15 ml'lik deney tüplerine toplandı ve 1500 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.
2. Süpernatantları atılarak hücrelerin üzerlerine 1,5 ml medyum eklenip süspanse edildikten sonra ependorf tüplerine aktarıldı.
3. Ependorf tüpündeki hücre süspansiyonu 4000 rpm'de 4 dakika santrifüj edildi.

4. Süpernatantları atıldıktan sonra pellet üzerine 50 µl Cell Lysis Buffer eklendi ve vorteks ile hafifçe süspansiyon edildiikten sonra oda sıcaklığında 60 dakika inkübe edildi.
5. Örnekler 15 dakika 3900 rpm'de santrifüj edildikten sonra süpernatantları ayrı ependorflara aktarıldı ve buzun üzerine konuldu.
6. Herbir örnekten 15 µl protein süspansiyonu alınıp 96 kuyucuklu ELISA plakasının kuyucuklarına konuldu. Plakanın başka kuyucuklarına da %10'luk sığır serum albümin solüsyonundan hazırlanan 0-1-2-4-8-16-32 mg/ml konsantrasyonlarındaki kalibratörler eklendi. Örneklerin üzerlerine 90 µl Biüret solüsyonu eklendikten sonra 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
7. Örneklerin protein miktarları, kalibrasyonlar ile ELISA okuyucuda 570 nm dalga boyunda ölçüldü.
8. Ependorf tüplerindeki geride kalan protein solüsyonları içeriğindeki protein miktarları Cell Lysis Buffer solüsyonu ile seyreltilerek eşitlendi.
9. ELISA plakasının kuyucuklarına 100 µl örnekler yerleştirildi.
10. Üzerlerine 50 µl detection antikoru eklendi.
11. Üzerleri kaplanarak oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi.
12. 3 saatin sonunda kuyucuklar 3 kez wash buffer ile yıkandı.
13. Üzerlerine 100 µl TMB Substrate Solution'u eklendi.
14. Oda sıcaklığında yaklaşık 10 dakika inkübasyondan sonra 100 µl stop solüsyonu eklendi. ELISA okuyucu ile 450 nm dalga boyunda ölçüldü.
15. Gruplardaki kaspaz-3 seviyelerinin kontrol grubuna göre kaç kat artış veya azalış gösterdikleri hesaplandı.

DNA fregmantasyon metodu

SH-SY5Y ve T98G hücreleri sırasıyla 1.000.000 sayıda 25 cm²'lik kültür kaplarına ekilmiştir. Ekilen hücrelerin penetrasyonu için 24 saat CO₂'li inkübatörde bekletildikten sonra belirlenen dozlarda ilaçlar uygulandı ve tekrar 24 saat inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda DNA fregmantasyon kitinin içerisinden çıkan protokol uygulanmıştır:

1. Hücreler kültür kaplarından tripsin ile çıkarılıp, medyumları ile birlikte 15 ml'lik deney tüpülerine toplandı ve 1500 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.
2. Süpernatantları atılarak hücrelerin üzerlerine 1,5 ml medyum eklenip süspansiyon edildikten sonra ependorf tüplerine aktarıldı.
3. Ependorf tüpündeki hücre süspansiyonu 4000 rpm'de 4 dakika santrifüj edildi.
4. Hücrelere 200 µl PBS, 200 µl lysis solüsyonu ve 20 µl proteinaz k eklenerek 10 dk. 56°C inkübe edildi.
5. 10dk nın sonunda 20 µl RNAase A solüsyonu eklenerek inkübasyona 10 dk daha oda sıcaklığında devam edildi.
6. 400 µl %50 etanol eklenerek karıştırıldı.
7. İçerik GeneJET Genomic DNA Purification Column'a alınmıştır.
8. 9000 rpm de 1 dk santrifüj edildi.
9. Column 2 ml lik yeni tüpe alınarak üzerine 500 µl yıkama solüsyonu 1 eklendi.
10. 13000 rpm de 1 dk santrifüj yapıldı.
11. Ependorfu değiştirilen column üzerine 500 µl yıkama solüsyonu 2 eklenerek 14000 rpm de 3 dk santrifüj yapıldı.
12. Column üzerine 50 µl elution buffer eklenerek 2 dk 10000 rpm de santrifüj yapıldı.
13. Alttaki ependorfa geçen DNA -80 °C muhafaza edildi.

DNA'nın Görüntülenmesi

1. 1,5 gr agar tartılarak üzerine 100 ml %0,5 TBE eklendi.
2. Karıştırılarak kaynatılan karışımın içine 10 µl etidyum bromür eklendi.
3. Yatay elektroforeze dökülen agar üzerine 24 'lük tarak yerleştirildi.
4. DNA örneklerinden 3 µl, yükleme boyasından 3 µl alınarak 12 µl bidistile su ile karıştırıldı.
5. Bu karışımdan 8'er µl alınarak agaroz jelin kuyucuklarına eklendi.
6. Örnekler jelde 70 V'da 60-70 dk yürütüldükten sonra UV ışık altında görüntülenerek fotoğraflandı.

Anneksin V ile Floresan Boyama:

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptozise giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Dış yüze transloke olan PS'ler, floresan bir madde ile işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak görünür hale getirilirler. Böylece apoptotik hücreler saptanmış olur

1. SH-SY5Y ve T98G hücreleri sırasıyla 600.000 ve 200.000 sayıda 6'lık kültür kaplarına ekildi.
2. Ekilen hücreler 1 gün inkübasyondan sonra 1 gün de ilaç uygulamasına bırakılmıştır. İçinde fluoksetin, imipramin ve maprotilin bulunan medyum, toksik madde uygulamalarından 2 saat önce hücrelerin bulunduğu medyuma 1'e 1 oranında eklendi.
3. 10 mM HEPES, 140 mM NaCl, and 2.5 mM CaCl₂ içeren anneksin binding buffer hazırlandı.
4. Hücreler soğuk PBS ile yıkandı.
5. Hücrelere 20 µl anneksin V ve 20 µl 1.5 µM propidium iodide eklendi.
6. 15 dakikalık inkübasyondan sonra hücreler floresan mikroskop ile görüntülendi.

3.3.4. Deneyin 4. Aşaması: Fluoksetin, İmipramin Maprotilinin NF-κB Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi

Kolorimetrik NF-κB ELISA Metodu:

SH-SY5Y ve T98G hücreleri sırasıyla 1.000.000 sayıda 25 cm²'lik kültür kaplarına ekilmiştir. Ekilen hücreler 1 gün inkübasyondan sonra 1 gün de ilaç uygulamasına bırakılmıştır. Fluoksetin, imipramin ve maprotilinin farklı dozları ile hücreler muamele edilmiştir. İlaç uygulamasının sonunda ELISA kitinin içerisinden çıkan protokol uygulanmıştır:

1. Hücreler kültür kaplarından tripsin ile çıkarılıp, medyumları ile birlikte 15 ml'lik deney tüpülerine toplandı ve 1500 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.
2. Süpernatantları atılarak hücrelerin üzerlerine 1,5 ml medyum eklenip süspansiyon edildikten sonra ependorf tüplerine aktarıldı.
3. Ependorf tüpündeki hücre süspansiyonu 4000 rpm'de 4 dakika santrifüj edildi.
4. Süpernatantları atıldıktan sonra pellet üzerine 50 µl Cell Lysis Buffer eklendi ve vorteks ile hafifçe süspansiyon edildikten sonra oda sıcaklığında 60 dakika inkübe edildi.
5. Örnekler 15 dakika 3900 rpm'de santrifüj edildikten sonra süpernatantları ayrı ependorflara aktarıldı ve buzun üzerine konuldu.
6. Herbir örnekten 15 µl protein süspansiyonu alınıp 96 kuyucuklu ELISA plakasının kuyucuklarına konuldu. Plakanın başka kuyucuklarına da %10'luk sığır serum albümin solüsyonundan hazırlanan 0-1-2-4-8-16-32 mg/ml konsantrasyonlarındaki kalibratörler eklendi. Örneklerin üzerlerine 90 µl Biüret solüsyonu eklendikten sonra 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
7. Örneklerin protein miktarları, kalibrasyonlar ile ELISA okuyucuda 570 nm dalga boyunda ölçüldü.
8. Ependorf tüplerindeki geride kalan protein solüsyonları içeriğindeki protein miktarları Cell Lysis Buffer solüsyonu ile seyreltilerek eşitlendi.
9. Kitin içinde bulunan 96'lık kuyucuklara 50'şer µl örneklerden ilave edildi.
10. Kuyucuklara 50'şer µl de kitte bulunan antikor birleşimi ilave edilerek toplam hacim 100 µl'ye tamamlandı.
11. Plate'in üst yüzeyi kaplanarak oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı.
12. 1 saatin sonunda kitte bulunan özel yıkama solüsyonu ile kuyucuklar 3 defa 2'şer dakika yıkandı.
13. Ardından kuyucuklara 100 µl tanımlayıcı solüsyon eklenerek kuyucuklarda renk değişimi gözlenene kadar oda sıcaklığında bekletildi.
14. Renk değişimi gözlendikten sonra 100 µl reaksiyonu durdurucu solüsyon eklenerek 450 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı.

Kolorimetrik İkb ELISA Metodu:

SH-SY5Y ve T98G hücreleri sırasıyla 1.000.000 sayıda 25 cm²'lik kültür kaplarına ekilmiştir. Ekilen hücreler 1 gün inkübasyondan sonra 1 gün de ilaç uygulamasına bırakılmıştır. Fluoksetin, imipramin ve maprotilinin farklı dozları ile hücreler muamele edilmiştir.. İlaç uygulamasının sonunda ELISA kitinin içerisinde bulunan protokol uygulanmıştır:

1. Hücreler kültür kaplarından tripsin ile çıkarılıp, medyumları ile birlikte 15 ml'lik deney tüplerine toplandı ve 1500 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.
2. Süpernatantları atılarak hücrelerin üzerlerine 1,5 ml medyum eklenip süspansiyon edildikten sonra ependorf tüplerine aktarıldı.
3. Ependorf tüpündeki hücre süspansiyonu 4000 rpm'de 4 dakika santrifüj edildi.
4. Süpernatantları atıldıktan sonra pellet üzerine 50 µl Cell Lysis Buffer eklendi ve vorteks ile hafifçe süspansiyon edildikten sonra oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.
5. Örnekler 15 dakika 3900 rpm'de santrifüj edildikten sonra süpernatantları ayrı ependorflara aktarıldı ve buzun üzerine konuldu.
6. Herbir örnekten 15 µl protein süspansiyonu alınıp 96 kuyucuklu ELISA plakasının kuyucuklarına konuldu. Plakanın başka kuyucuklarına da %10'luk sığır serum albümin solüsyonundan hazırlanan 0-1-2-4-8-16-32 mg/ml konsantrasyonlarındaki kalibratörler eklendi. Örneklerin üzerlerine 90 µl Biüret solüsyonu eklendikten sonra 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
7. Örneklerin protein miktarları, kalibrasyonlar ile ELISA okuyucuda 570 nm dalga boyunda ölçüldü.
8. Ependorf tüplerindeki geride kalan protein solüsyonları içeriğindeki protein miktarları Cell Lysis Buffer solüsyonu ile seyreltilerek eşitlendi.
9. Kitin içinde bulunan 96'lık kuyucuklara 50'şer µl örneklerden ilave edildi.
10. Kuyucuklara 50'şer µl de kitte bulunan antikor birleşimi ilave edilerek toplam hacim 100 µl'ye tamamlandı.

11. Plate'in üst yüzeyi kaplanarak oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı.
12. 1 saatin sonunda kitte bulunan özel yıkama solüsyonu ile kuyucuklar 3 defa 2'şer dakika yıkandı.
13. Ardından kuyucuklara 100 µl tanımlayıcı solüsyon eklenerek kuyucuklarda renk değişimi gözlenene kadar oda sıcaklığında bekletildi.
14. Renk değişimi gözlendikten sonra 100 µl reaksiyonu durdurucu solüsyon eklenerek 450 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı.

3.4. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Deney sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi, SPSS v16.0 (Statistic Program for Social and Science) istatistik programını kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki fark önce ANOVA testi ile, sonrasında Post-Hoc testlerinden Tukey testi kullanılarak saptanmıştır .

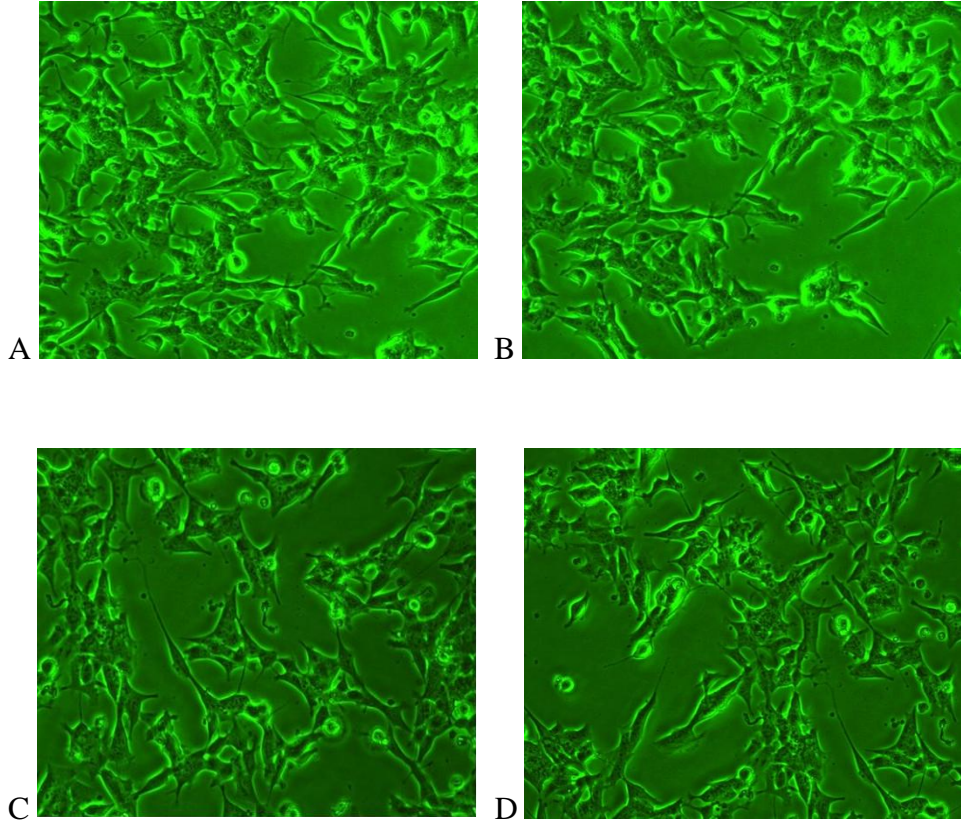
4. BULGULAR

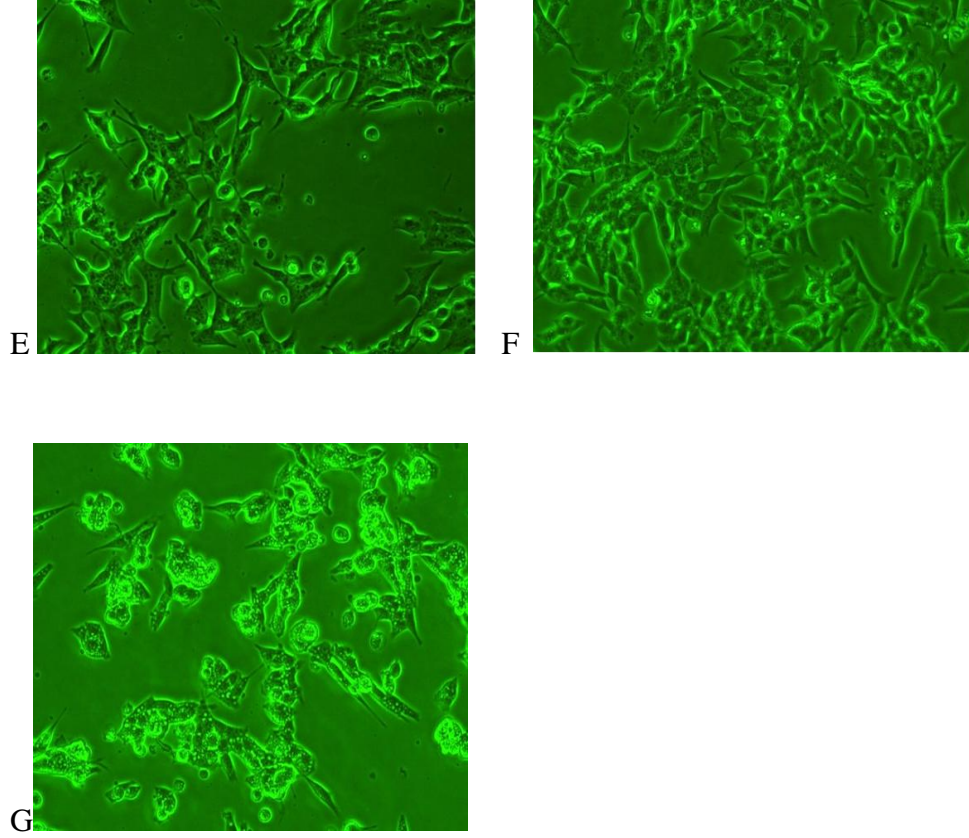
4.1. FLUOKSETİN, İMİPRAMİN VE MAPROTİLİNİN TOKSİK DOZLARININ GÖZLEMSEL OLARAK BELİRLENMESİ

Faz kontrast invert mikroskop altında yapılan gözlem sonrasında diğer aşamalara geçilmiştir. Bu aşama da diğer aşamalar gibi 3 kez tekrarlanmıştır. Her iki hücre tipinde fluoksetin, imipramin ve maprotilinin farklı dozlarının hücre morfolojileri ve sayıları üzerindeki etkileri görsel olarak incelenerek toksik etkiyi başlatan doz aralığı belirlenmiştir.

4.1.1. SH-SY5Y ve T98G Hücre Serileri İçin Fluoksetinin Toksik Doz Aralığı

Nöron kaynaklı SH-SY5Y hücre serisi incelendiğinde fluoksetinin hücresel morfolojiyi bozup, aynı zamanda hücresel tutunmayı da etkileyip hücrelerin tutundukları yerden kalkmasını sağlayan etkinin 10^{-7} M doz seviyesinde başladığı ve yükselen dozlarda bu etkinin giderek arttığı görülmüştür. 10^{-5} M dozu ve daha yüksek dozlarda ise çok az sayıda tutunan hücrenin görülmesine rağmen genel olarak hücre yapılarının tamamen bozulup, morfolojik yapılarını kaybettikleri ve düzensiz hücre membranına sahip yuvarlak bir hal aldıkları görülmüştür (Şekil 4.1).



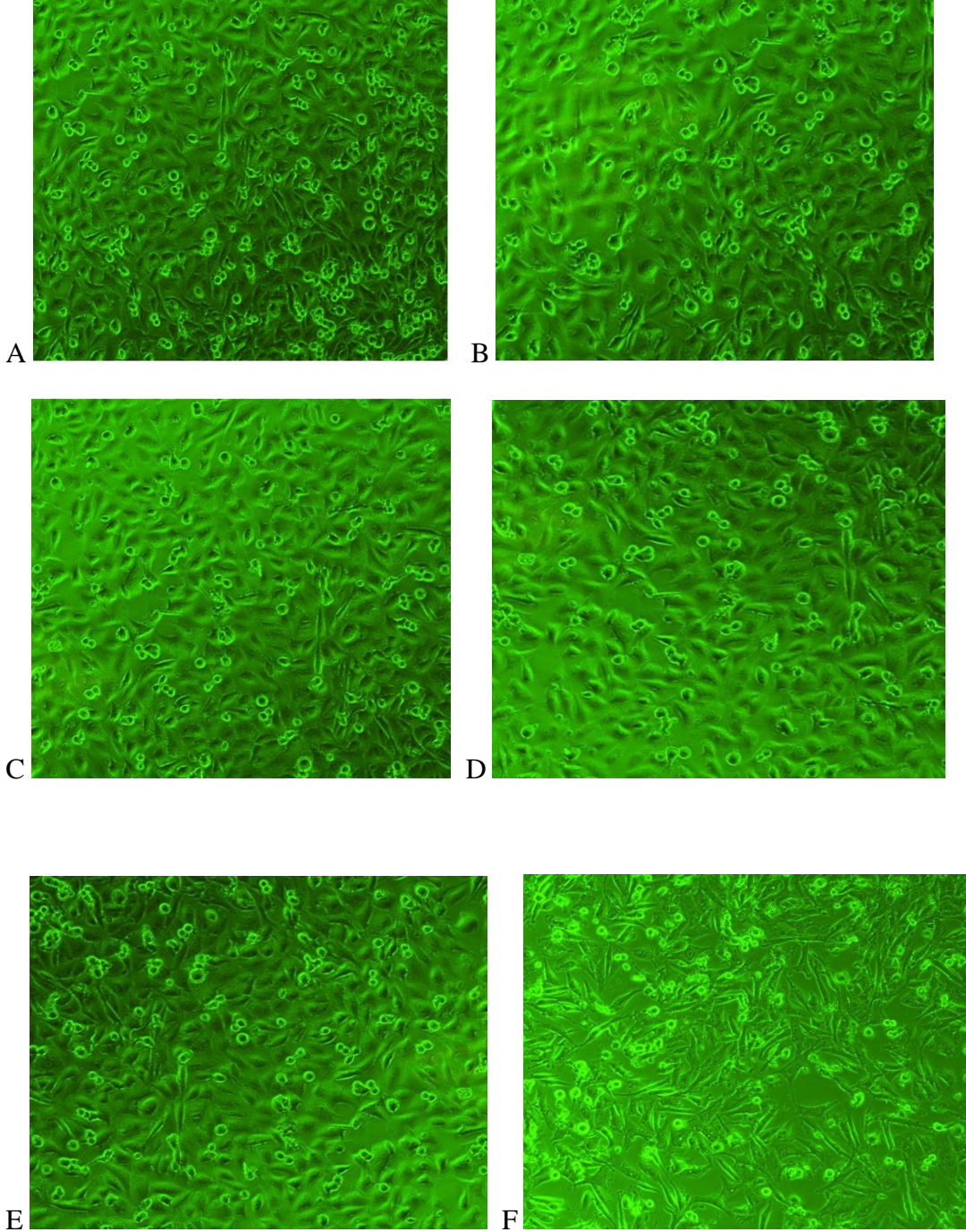


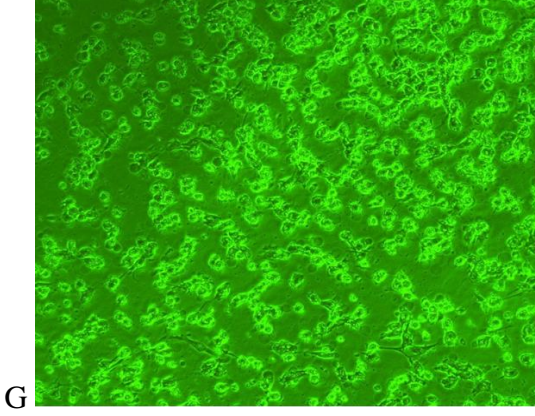
Şekil 4.1. Nöron hücreleri üzerinde fluoksetinin etkilerinin gösterilmesi **A**-Kontrol, **B**- 1×10^{-8} M fluoksetin, **C**- 1×10^{-7} M fluoksetin, **D**- 1×10^{-6} M fluoksetin, **E**- 1×10^{-5} M fluoksetin, **F**- 5×10^{-5} M fluoksetin, **G**- 1×10^{-4} M fluoksetin

Gliyal kaynaklı T98G hücre serisi incelendiğinde ise fluoksetinin hücre morfolojiyi bozup, aynı zamanda hücresel tutunmayı da etkileyip hücrelerin tutundukları yerden kalkmasını sağlayan etkinin 5×10^{-5} M doz seviyesinde başladığı ve artandozlarda bu etkinin giderek şiddetlendiği görülmüştür ve bu dozdan sonraki yüksek dozlarda ise genel olarak hücre yapılarının tamamen bozulup, morfolojik yapılarını kaybettikleri ve düzensiz hücre membranına sahip yuvarlak bir hal aldıkları görülmüştür (Şekil 4.2).

Fluoksetinin nöral ve glial hücre tiplerinde farklı dozlarda toksik etkilerinin ortaya çıktığı ve nöral kaynaklı hücrelerin fluoksetin toksisitesine daha hassas olduğu gözlemlenmiştir.

Bu çalışmanın sonucunu doğrulamak için yapılacak olan MTT testi için fluoksetinin 1×10^{-4} , 5×10^{-5} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} M'lık dozlarının her iki hücre tipinde de uygulanmasına karar verilmiştir.

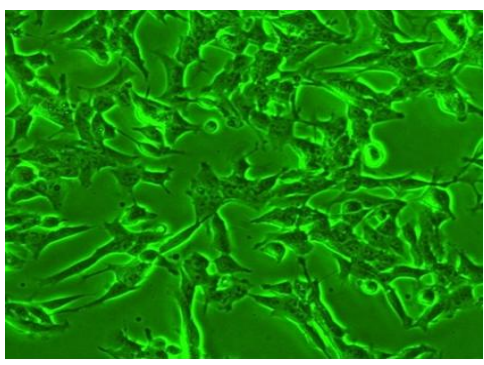
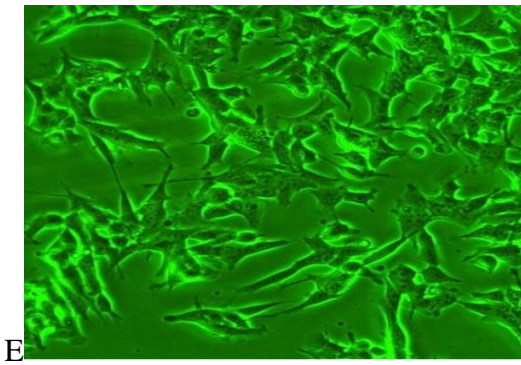
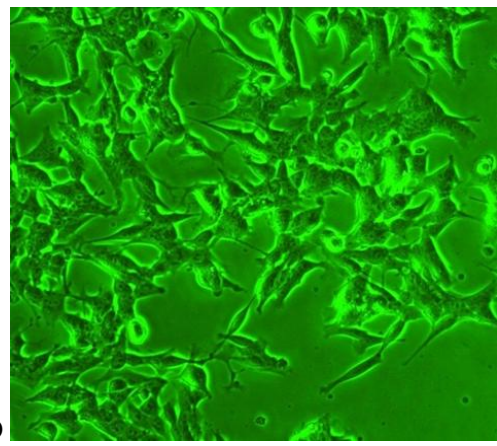
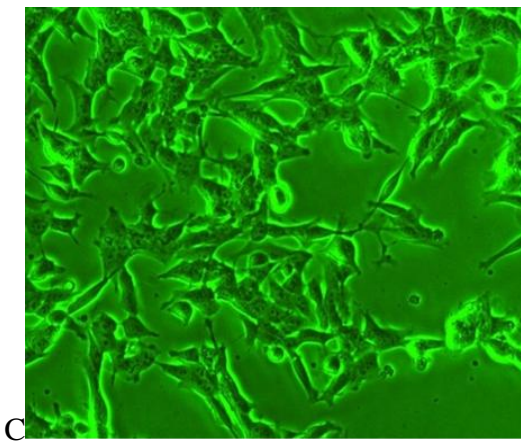
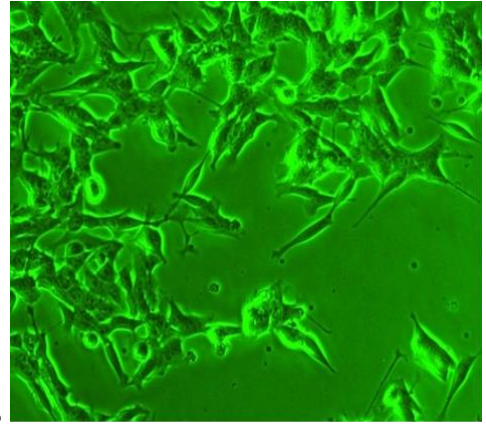
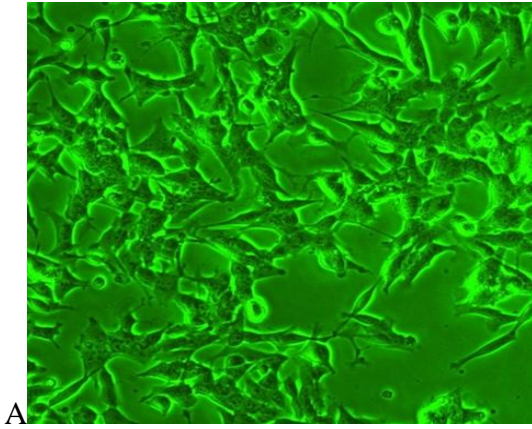


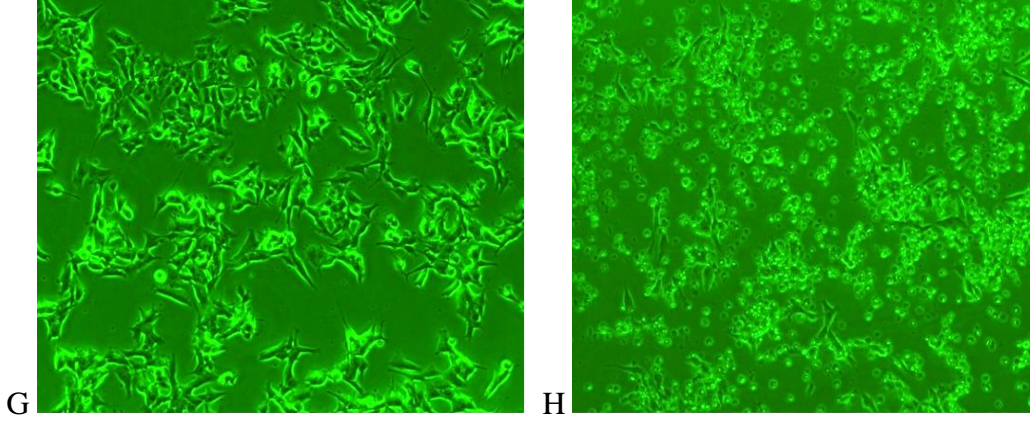


Şekil 4.2. Glia hücreleri üzerinde fluoksetinin etkilerinin gösterilmesi **A-** kontrol, **B-** 1×10^{-8} M fluoksetin, **C-** 1×10^{-7} M fluoksetin, **D-** 1×10^{-6} M fluoksetin, **E-** 1×10^{-5} M fluoksetin, **F-** 5×10^{-5} M fluoksetin, **G-** 1×10^{-4} M fluoksetin.

4.1.2. SH-SY5Y ve T98G Hücre Serileri İçin İmipraminin Toksik Doz Aralığı

Nöron kaynaklı SH-SY5Y hücre serisi incelendiğinde imipraminin hücre morfolojiyi bozup, aynı zamanda hücresel tutunmayı da etkileyerek hücrelerin tutundukları yerden kalkmasını sağlayan etkinin 1×10^{-8} M doz seviyesinde başladığı ve artan dozlarda bu etkinin giderek şiddetlendiği görülmüştür. 1×10^{-4} M dozu ve bu dozdan sonraki yüksek dozlarda ise çok az sayıda tutunan hücrenin görülmesine rağmen genel olarak hücre yapılarının tamamen bozulup, morfolojik yapılarını kaybettikleri ve düzensiz hücre membranına sahip yuvarlak bir hal aldıkları görülmüştür. (Şekil 4.3).



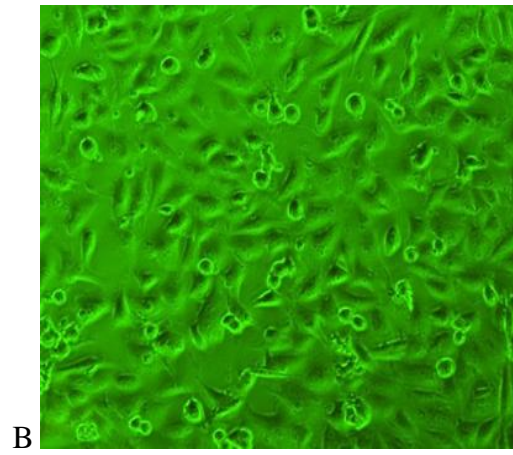
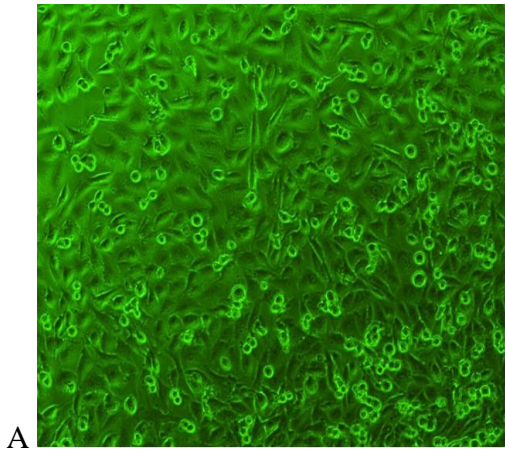


Şekil 4.3. Nöron hücreleri üzerinde imipraminin etkilerinin gösterilmesi **A-** kontrol, **B-** 1×10^{-8} M imipramin, **C-** 1×10^{-7} M imipramin, **D-** 1×10^{-6} M imipramin, **E-** 1×10^{-5} M imipramin, **F-** 1×10^{-4} M imipramin, **G-** 5×10^{-4} M imipramin, **H-** 1×10^{-3} M imipramin

Glial kaynaklı T98G hücre serisi incelendiğinde ise imipraminin hücre morfolojiyi bozup, aynı zamanda hücre tutunmayı da etkileyip hücrelerin tutundukları yerden kalkmasını sağlayan etkinin 10^{-4} M doz seviyesinde başladığı ve yükselen dozlarda bu etkinin giderek arttığı görülmüştür ve bu dozdan sonraki yüksek dozlarda genel olarak hücre yapılarının tamamen bozulup, morfolojik yapılarını kaybettikleri ve düzensiz hücre membranına sahip yuvarlak bir hal aldıkları görülmüştür (Şekil 4.4).

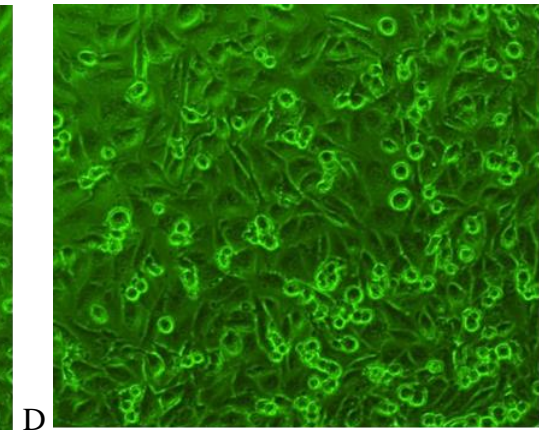
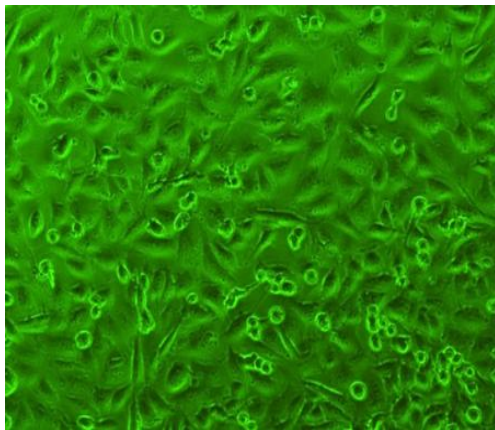
İmipraminin de fluoksetin gibi nöral ve glial hücre tiplerinde farklı dozlarda toksik etkilerinin ortaya çıktığı ve nöral kaynaklı hücrelerin imipramin toksisitesine daha hassas olduğu gözlemlenmiştir.

Bu çalışmanın sonucunu doğrulamak için yapılacak olan MTT testi için fluoksetinin 1×10^{-3} , 5×10^{-4} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} M'lık dozlarının her iki hücre tipinde de uygulanmasına karar verilmiştir.



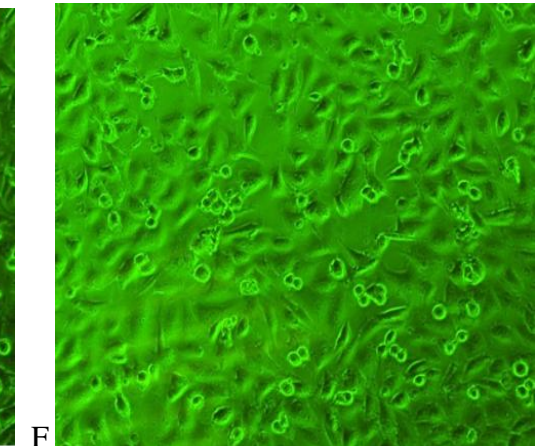
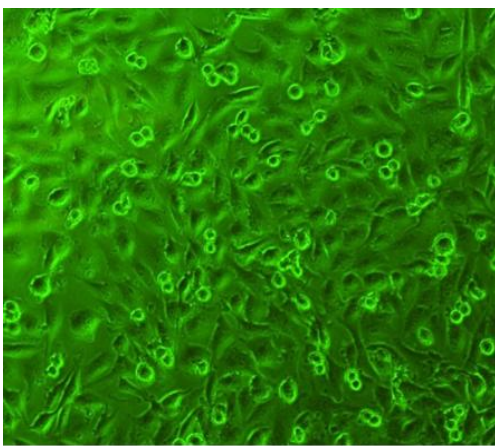
A

B



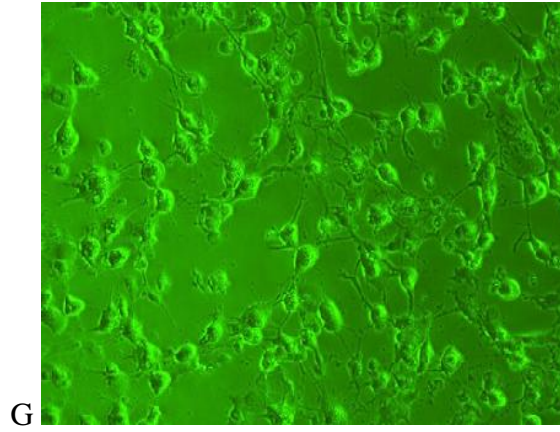
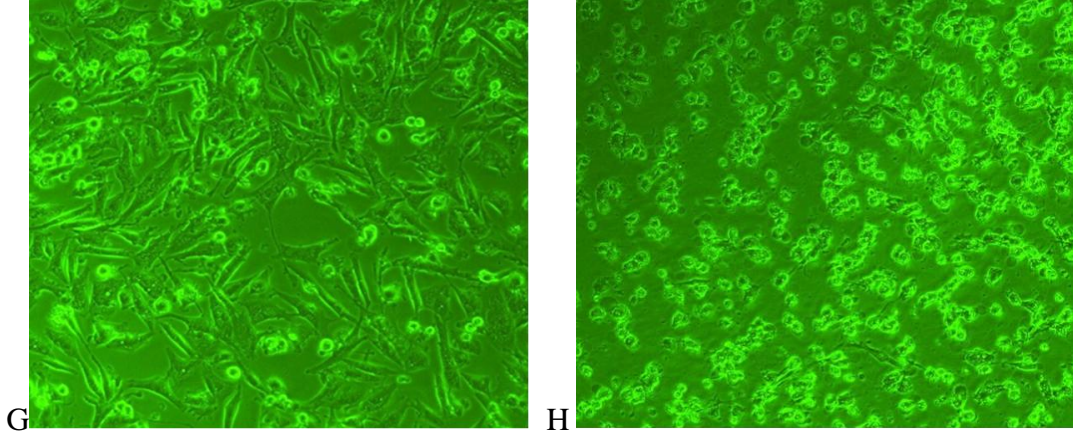
C

D



E

F



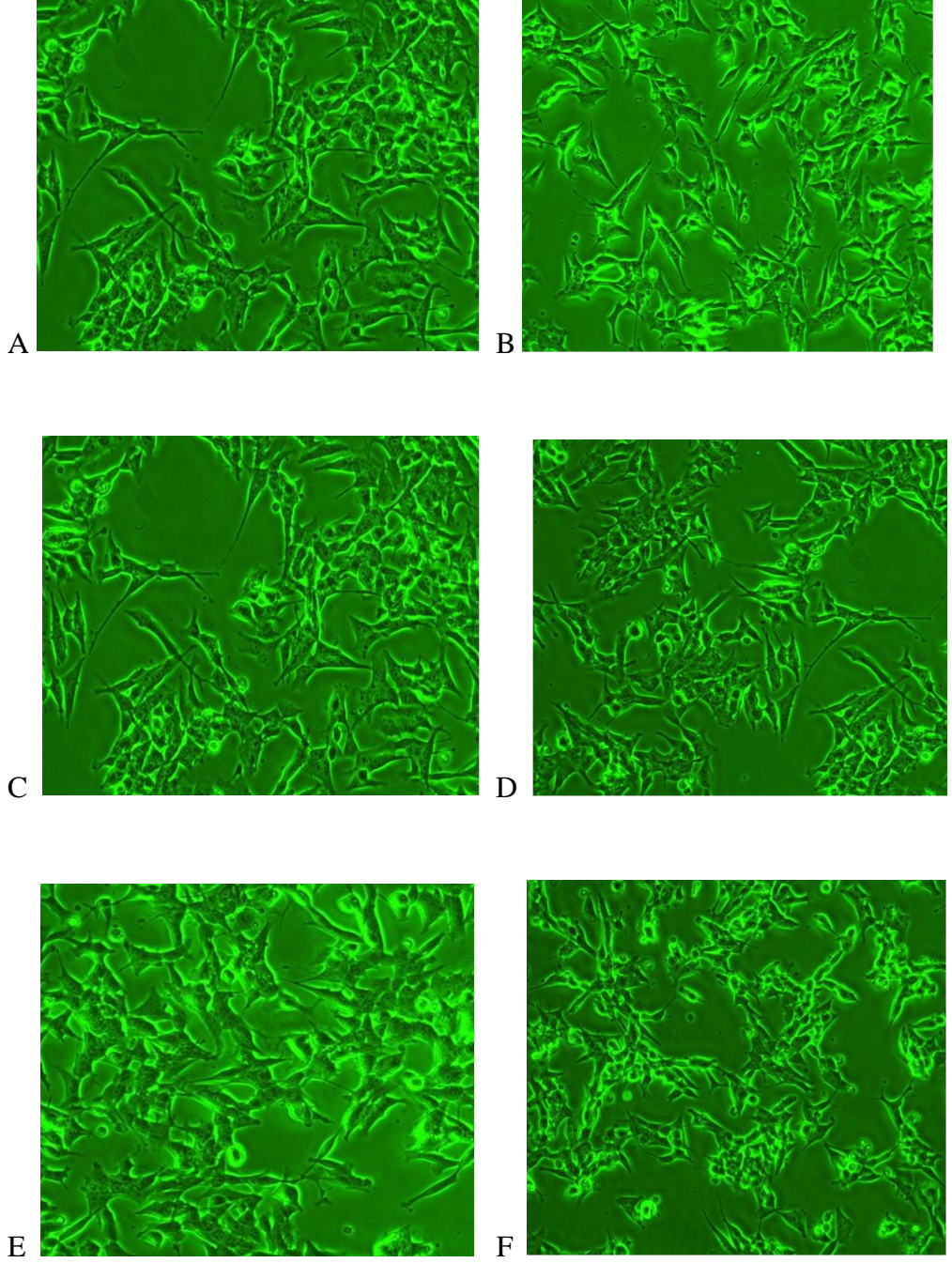
Şekil 4.4. Glia hücreleri üzerinde imipramin etkilerinin gösterilmesi.

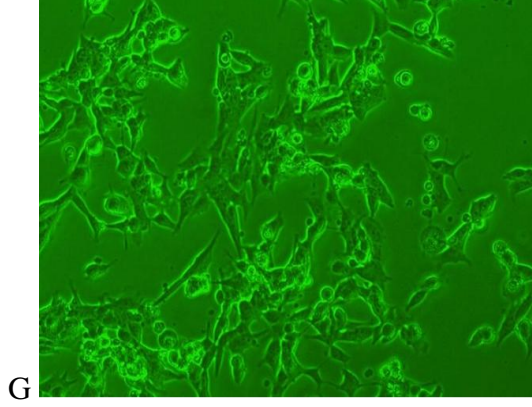
A- kontrol, **B-** 1×10^{-8} M imipramin, **C-** 1×10^{-7} M imipramin, **D-** 1×10^{-6} M imipramin, **E-** 1×10^{-5} M imipramin, **F-** 1×10^{-4} M imipramin, **G-** 5×10^{-4} M imipramin, **H-** 1×10^{-3} M imipramin

4.1.3. SH-SY5Y ve T98G Hücre Serileri İçin Maprotilinin Toksik Doz Aralığı

Nöron kaynaklı SH-SY5Y hücre serisi incelendiğinde maprotilinin hücresel morfolojiyi bozup, aynı zamanda hücresel tutunmayı da etkileyip hücrelerin

tutundukları yerden kalkmasını sağlayan etkisinin 10^{-8} M doz seviyesinde başladığı ve yükselen dozlarda bu etkinin giderek arttığı görülmüştür. 5×10^{-5} M dozu ve bu dozdan sonraki yüksek dozlarda ise genel olarak hücre yapılarının tamamen bozulup, morfolojik yapılarını kaybettikleri ve düzensiz hücre membranına sahip yuvarlak bir hal aldıkları görülmüştür (Şekil 4.5).





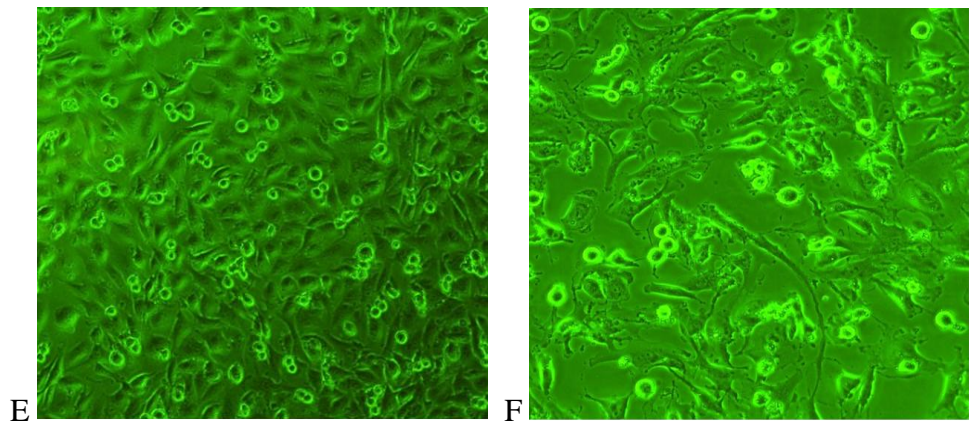
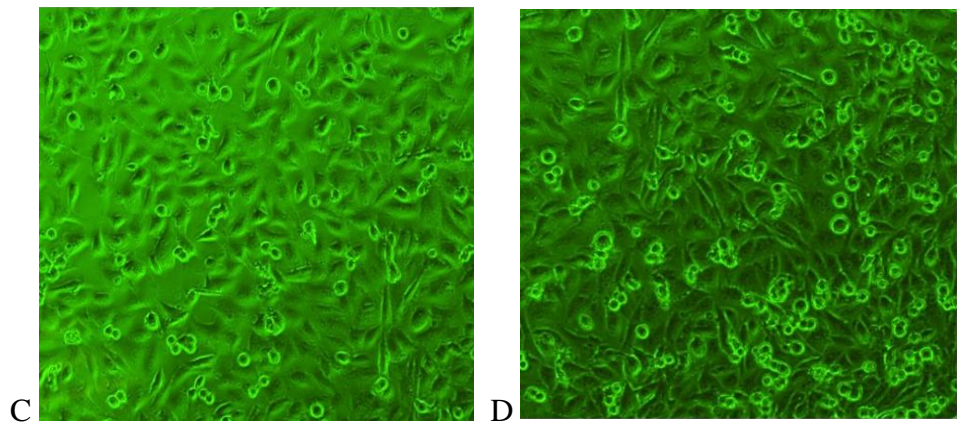
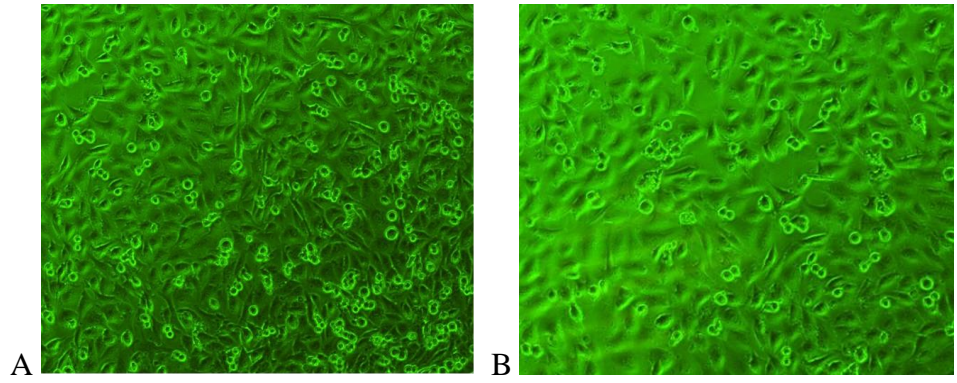
Şekil 4.5. Nöron hücreleri üzerinde maprotilin etkilerinin gösterilmesi.

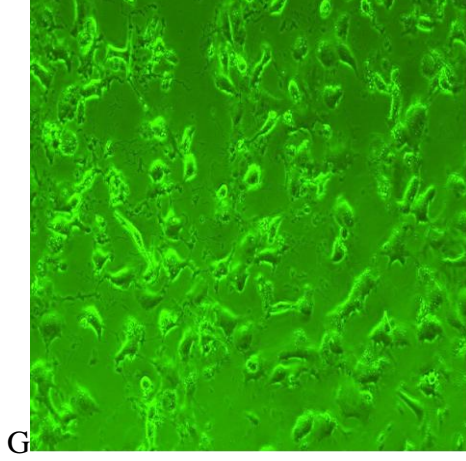
A- kontrol, **B-** 1×10^{-8} M maprotilin, **C-** 1×10^{-7} M maprotilin, **D-** 1×10^{-6} M maprotilin, **E-** 1×10^{-5} M maprotilin, **F-** 5×10^{-5} M maprotilin, **G-** 1×10^{-4} M maprotilin.

Glial kaynaklı T98G hücre serisi incelendiğinde ise maprotilin hücre morfolojiyi bozup, aynı zamanda hücre tutunmayı da etkileyip hücrelerin tutundukları yerden kalkmasını sağlayan etkinin 5×10^{-5} M doz seviyesinde başladığı ve yükselen dozlarda bu etkinin giderek arttığı görülmüştür ve bu dozdan sonraki yüksek dozlarda genel olarak hücre yapılarının tamamen bozulup, morfolojik yapılarını kaybettikleri ve düzensiz hücre membranına sahip yuvarlak bir hal aldıkları görülmüştür (Şekil 4.6).

Maprotilin de diğer maddeler gibi nöral hücrelerde glial hücrelere kıyasla daha düşük dozlarda toksik etki ortaya çıkarmıştır.

Bu çalışmanın sonucunu doğrulamak için yapılacak olan MTT testi için fluoksetinin 1×10^{-4} , 5×10^{-5} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} M'lık dozlarının her iki hücre tipinde de uygulanmasına karar verilmiştir.





Şekil 4.6. Glia hücreleri üzerinde maprotilinin etkilerinin gösterilmesi.

A- kontrol, **B-** 1×10^{-8} M maprotilin, **C-** 1×10^{-7} M maprotilin, **D-** 1×10^{-6} M maprotilin, **E-** 1×10^{-5} M maprotilin, **F-** 5×10^{-5} M maprotilin, **G-** 1×10^{-4} M maprotilin.

4.2. FLUOKSETİN; MAPROTİLİN VE İMİPRAMİNİN TOKSİK DOZLARININ MTT TESTİ İLE BELİRLENMESİ

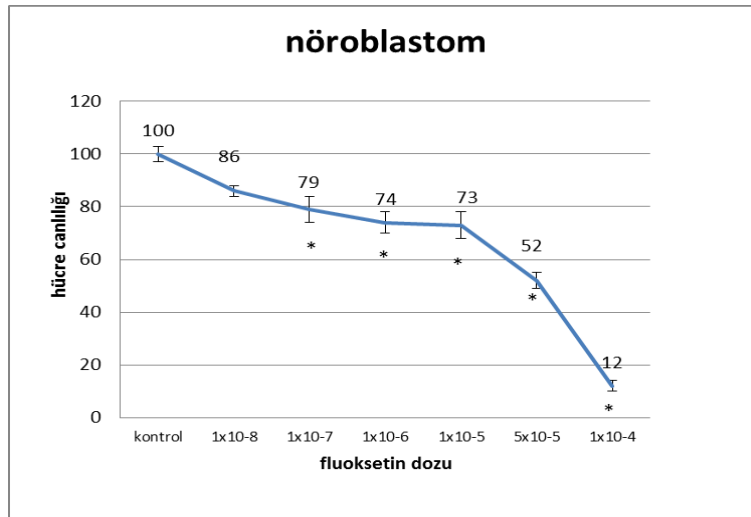
Fluoksetin, imipraminin ve maprotilin farklı dozlarının hücre yaşayabilirliği üzerindeki etkilerinin kantitatif olarak belirlenmesi amacıyla MTT testi yapıldı. Çıkan sonuçlar kontrol grubuna göre kıyaslanarak yüzde değerleri hesaplandı.

4.2.1. Fluoksetinin Hücre Yaşayabilirliği Üzerine Etkisinin MTT Testi İle Belirlenmesi

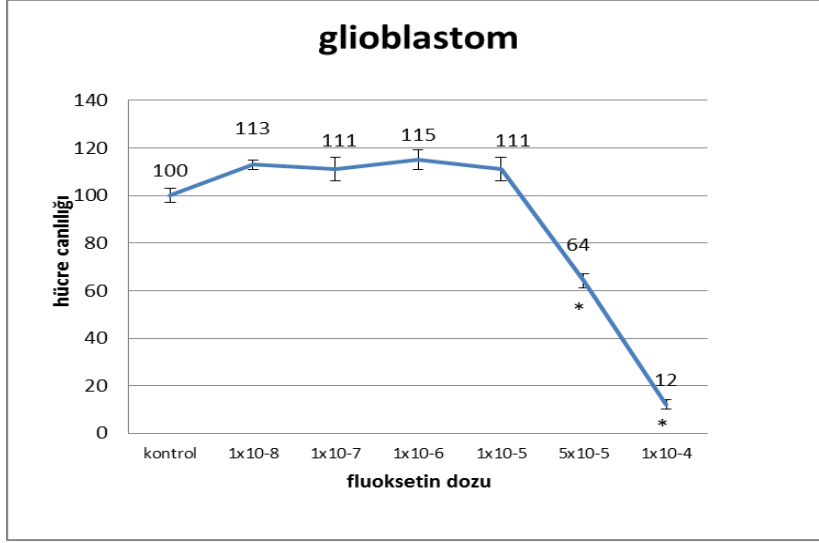
Fluoksetinin nöron hücrelerinde hücre yaşayabilirliği açısından olumsuz etkileri 1×10^{-8} M da dahi gözlenmeye başlanmıştır. Ancak hücre canlılığındaki istatistiksel olarak anlamlı azalma 1×10^{-7} M 'da gözlenmiştir. 1×10^{-8} M dozunda hücre canlılığı % 86 'ya düşerken, anlamlı azalma olan 1×10^{-7} M 'da canlılık % 79'dur.

Fluoksetinin glioblastom hücrelerin yaşayabilirliği üzerindeki etkileri ise nöroblastom hücrelerinden farklıdır. Glial hücrelerin nöronlara göre fluoksetinin etkilerine karşı daha dayanıklı oldukları gözlenmiştir. Hatta istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da 1×10^{-8} , 1×10^{-7} , 1×10^{-6} ve 1×10^{-5} M dozlarında hücre canlılığında artış olduğu söylenebilir. 5×10^{-5} M dozunda ise hücre canlılığında anlamlı bir azalma görülerek, canlılık % 64'e kadar düşmüştür. (Şekil 4.7.).

MTT testi sonuçları da bir önceki aşamada yapılan gözlemsel inceleme sonuçları ile uyum göstermiştir. Sonuç olarak fluoksetin her iki hücre serisinde de toksik etki göstermesine rağmen, glioblastom hücrelerinin fluoksetin toksisitesine daha dirençli olduğu gözlenmiştir. (Şekil 4.8.)



Şekil 4.7. Fluoksetinin nöronal hücrelerdeki etkilerinin MTT testi ile gösterilmesi. Gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldı. *; $p < 0,005$.



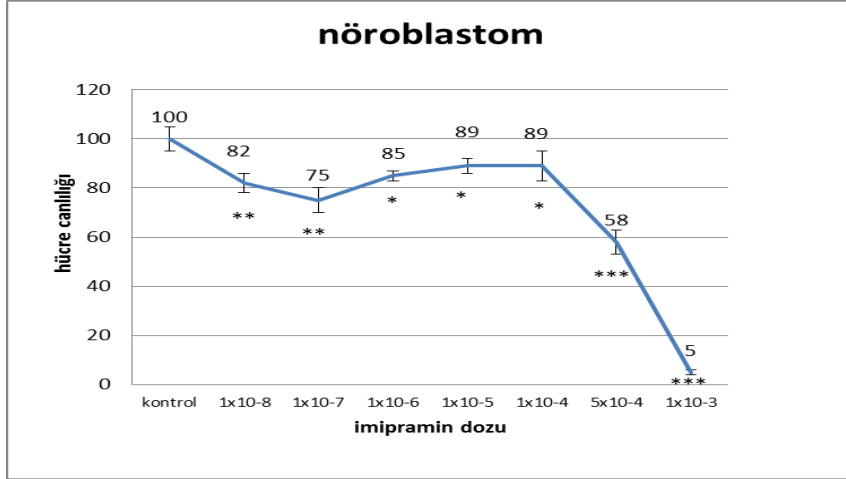
Şekil 4.8. Fluoksetinin glial hücrelerdeki etkilerinin MTT testi ile gösterilmesi. Gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldı. *; $p < 0,005$.

4.2.2. İmipraminin Hücre Yaşayabilirliği Üzerine Etkisinin MTT Testi İle Belirlenmesi

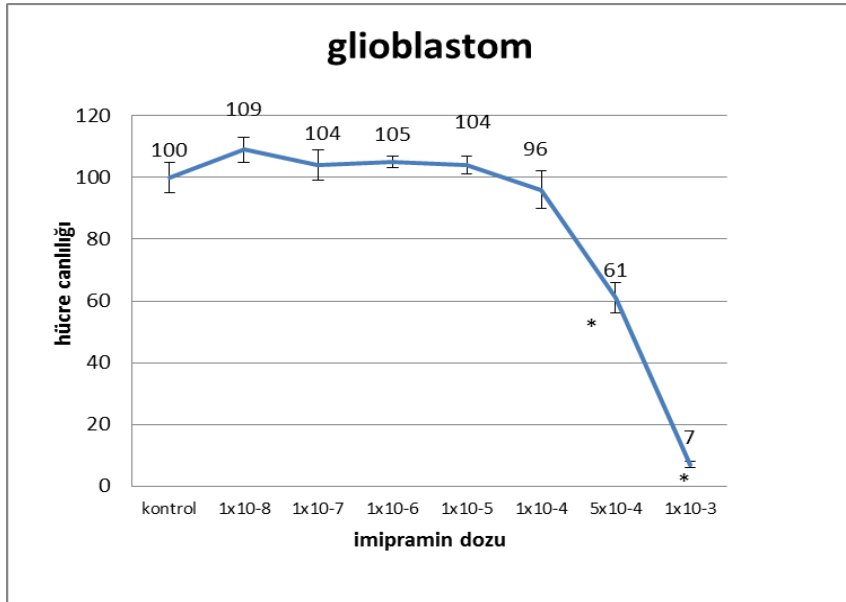
İmipraminin nöronal hücre serisi üzerindeki toksik etkileri yine fluoksetinde olduğu gibi 1×10^{-8} M seviyesinde başlamıştır. Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, bu dozun hücre canlılığında % 18 oranında bir azalma yaptığı kaydedilmiştir ve; bu ve bundan sonraki dozlardaki hücre canlılığındaki azalmalar istatistiksel olarak da anlamlıdır. (Şekil 4.9).

İmipraminin glial kaynaklı hücre serisi üzerindeki toksik etkileri yine fluoksetinin toksik etkilerine benzerdir. 1×10^{-8} , 1×10^{-7} , 1×10^{-6} ve 1×10^{-5} M dozlarında yine istatistiksel olarak anlam ifade etmese de hücre canlılığında artış gözlenmiştir. 5×10^{-4} M seviyesinde ortaya çıkan toksisite ise hücre canlılığında %39'luk bir azalmaya neden olmuştur (Şekil 4.10.).

Nöronal hücrelerin imipramin ile oluşturulan toksisite modelinde glial hücrelere kıyasla daha duyarlı olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar görsel olarak tespit edilen bulgular ile uyumluluk göstermiştir.



Şekil 4.9. İmipraminin nöronal hücrelerdeki etkilerinin MTT testi ile gösterilmesi. Gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldı. *; $p < 0,05$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,005$.



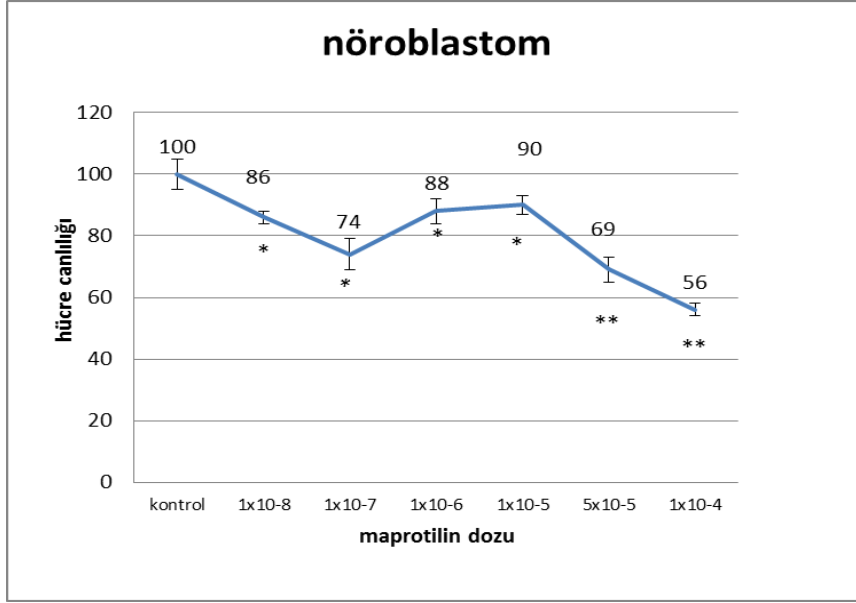
Şekil 4.10. İmipraminin glial hücrelerdeki etkilerinin MTT testi ile gösterilmesi. Gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldı. *; $p < 0,005$.

4.2.3. Maprotilinin Hücre Yaşayabilirliği Üzerine Etkisinin MTT Testi İle Belirlenmesi

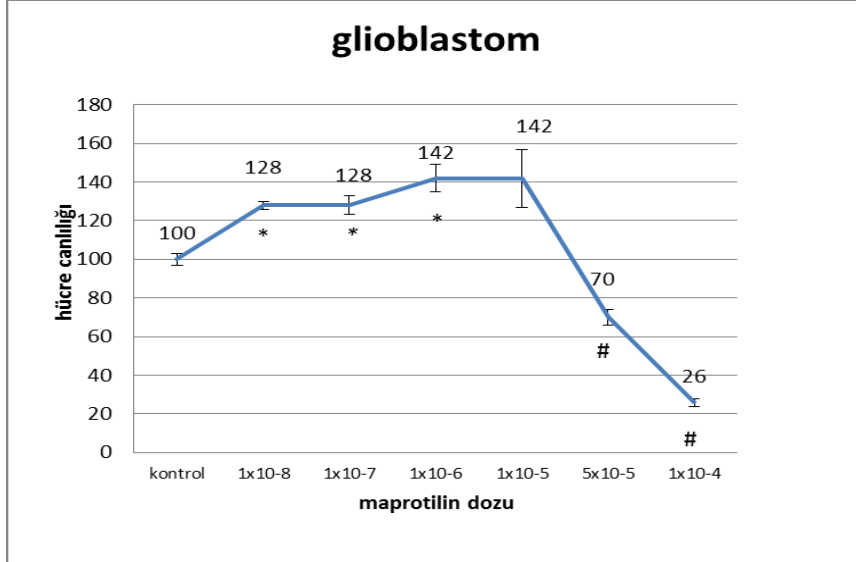
Maprotilinin nöronal kaynaklı hücre serisi üzerindeki toksik etkileri 1×10^{-8} M seviyesinde başlamıştır. Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, bu dozun hücre canlılığında %14 oranında bir azalma yaptığı kaydedilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı görülen bu azalma daha sonraki dozlarda da devam etmiştir (Şekil 4.5).

Maprotilin, glial kaynaklı hücre serisi üzerinde, diğer ajanlarda olduğu gibi proliferatif etki göstermekle birlikte, bu ajan, 1×10^{-8} , 1×10^{-7} ve 1×10^{-6} M dozlarında istatistiksel olarak anlamlı artışa neden olmuştur. Artış 1×10^{-8} M ve 1×10^{-7} M 'da % 28, 1×10^{-6} M' da ise % 42'dir. Hücre canlılığındaki istatistiksel olarak anlamlı azalma ise %30 oranıyla 5×10^{-5} M dozunda gözlenmeye başlanmıştır (Şekil 4.11.).

Maprotilinin toksik etkilerinin başladığı doz seviyesi her iki hücre tipinde birbirinden farklı olduğu görülmüştür. Nöronal hücrelerin glial hücrelere kıyasla yüksek oranda daha duyarlı oldukları tespit edilmiştir. Ancak 5×10^{-5} M düzeyinde her iki hücre tipinde de kontrole göre yaklaşık %30 oranında bir azalma tespit edilmiştir. Bu sonuçlar görsel olarak tespit edilen bulgular ile uyumluluk göstermiştir. (Şekil 4.12.)



Şekil 4.11. Maprotilinin nöronal hücrelerdeki etkilerinin MTT testi ile gösterilmesi. Gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldı. *; $p < 0,01$, **; $p < 0,005$.



Şekil 4.12. Maprotilinin glial hücrelerdeki etkilerinin MTT testi ile gösterilmesi. Gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldı. *; $p < 0,01$; #; $p < 0,005$

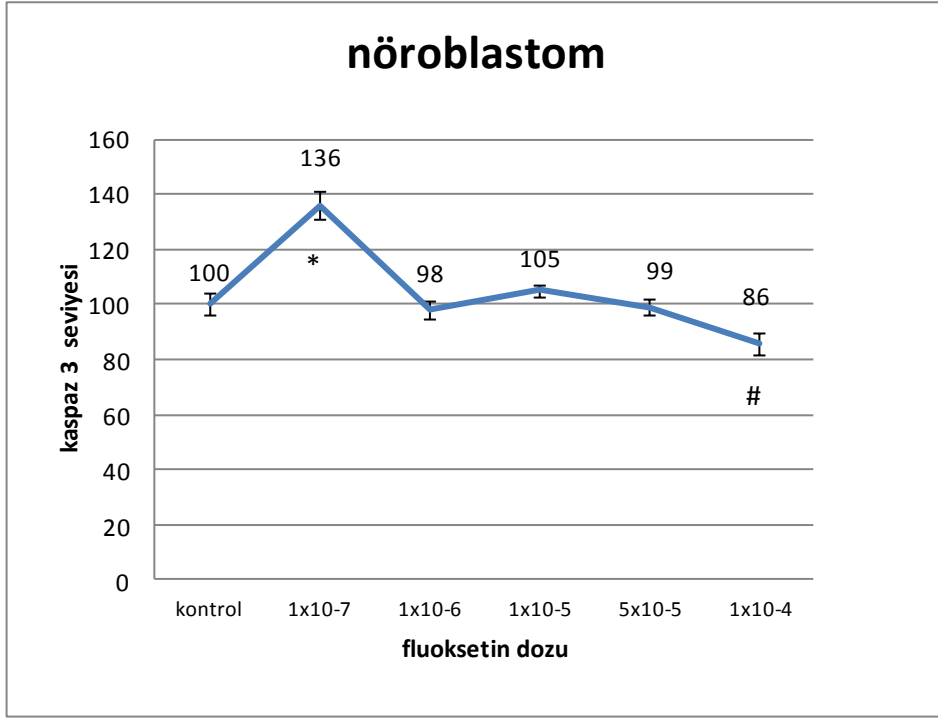
4.3. FLUOKSETİN, İMİPRAMİN VE MAPROTİLİNİN HÜCRE İÇİ KASPAZ-3 SEVİYELERİNE ETKİLERİ

Nöral ve glial hücre serilerinde, fluoksetin, imipramin ve maprotilinin apoptozda anahtar rol oynayan kaspaz 3 seviyesi üzerindeki etkilerini gözlemlemek için ELISA metodu ile hücre içi kaspaz 3 seviyeleri ölçülmüştür.

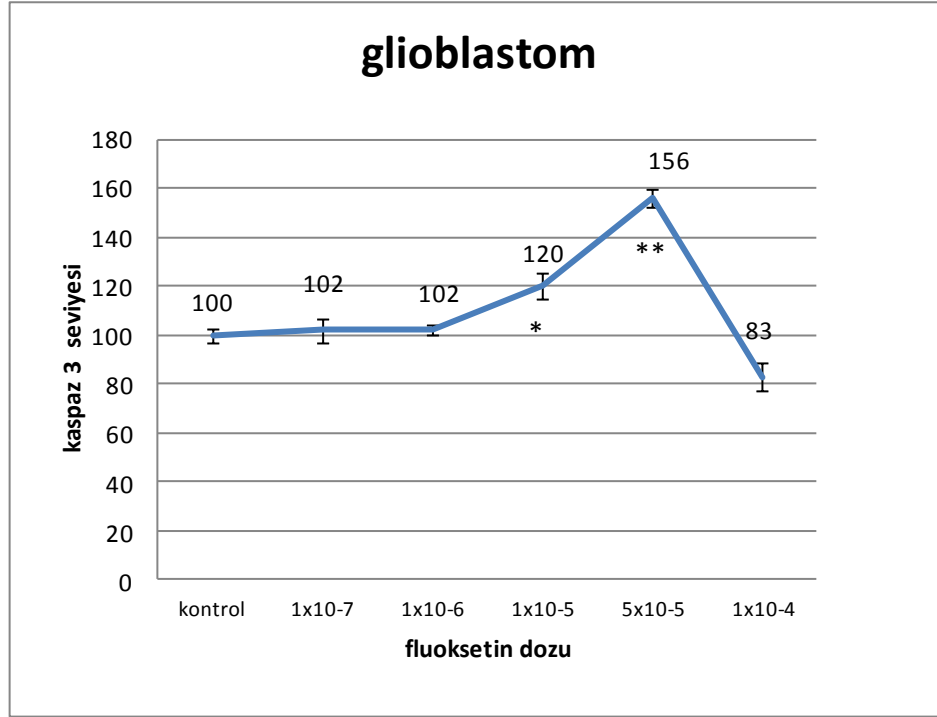
4.3.1. Fluoksetinin Kaspaz-3 Seviyelerine Etkileri

Hücre içi kaspaz-3 seviyeleri incelendiğinde nöronal hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı azalmanın başladığı 1×10^{-7} M fluoksetin dozunda hücre içi kaspaz-3 miktarının % 36 arttığı gözlenmiştir. Fluoksetinin hücre canlılığında en fazla düşüşe neden olduğu 1×10^{-4} M dozunda ise kaspaz 3 seviyesinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir. (Şekil 4.13.)

Glial hücrelerdeki kaspaz-3 miktarları ölçüldüğünde ise 10^{-5} M dozunda hücre içi kaspaz düzeyi istatistiksel olarak artmaya başlamış ve kaspaz miktarı 5×10^{-5} dozunda pik yapmıştır. Kaspaz 3 seviyesi 1×10^{-4} dozunda ise tekrar azalma göstermiştir. 10^{-5} dozunda kaspaz seviyesi %20, 5×10^{-5} dozunda %56 oranında artarken, 1×10^{-4} dozunda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da % 14 azalma göstermiştir (Şekil 4.14.).



Şekil 4.13. Fluoksetinin nöronal hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi kaspaz-3 seviyelerindeki değişim * $p < 0,005$; #; $p < 0,05$.



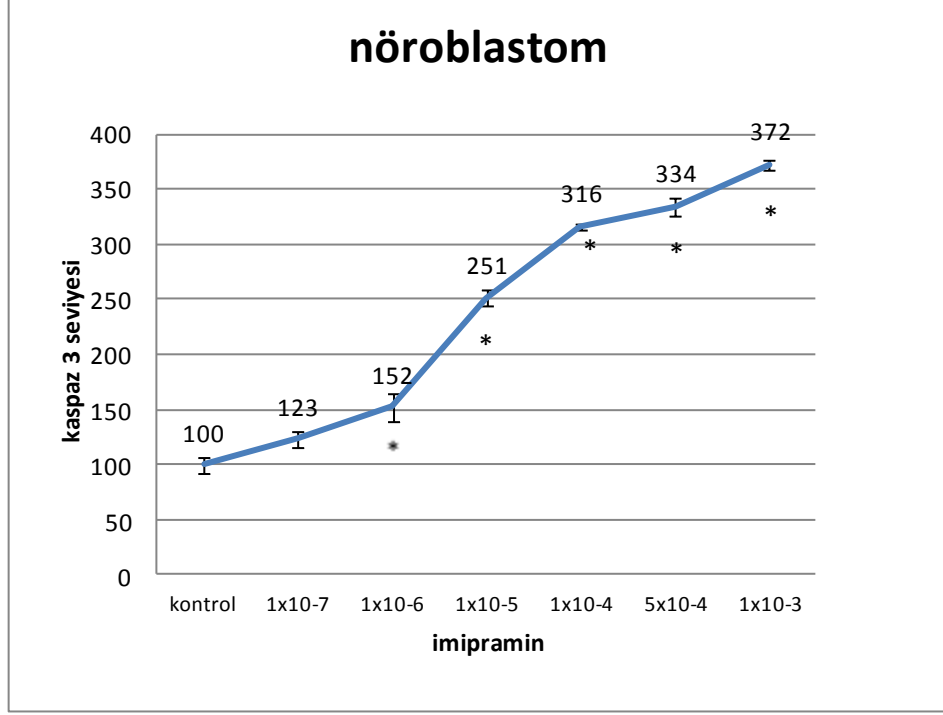
Şekil 4.14. Fluoksetinin gliyal hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi kaspaz-3 seviyelerindeki değişim. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,005$.

4.3.2. İmipraminin Kaspaz-3 Seviyelerine Etkileri

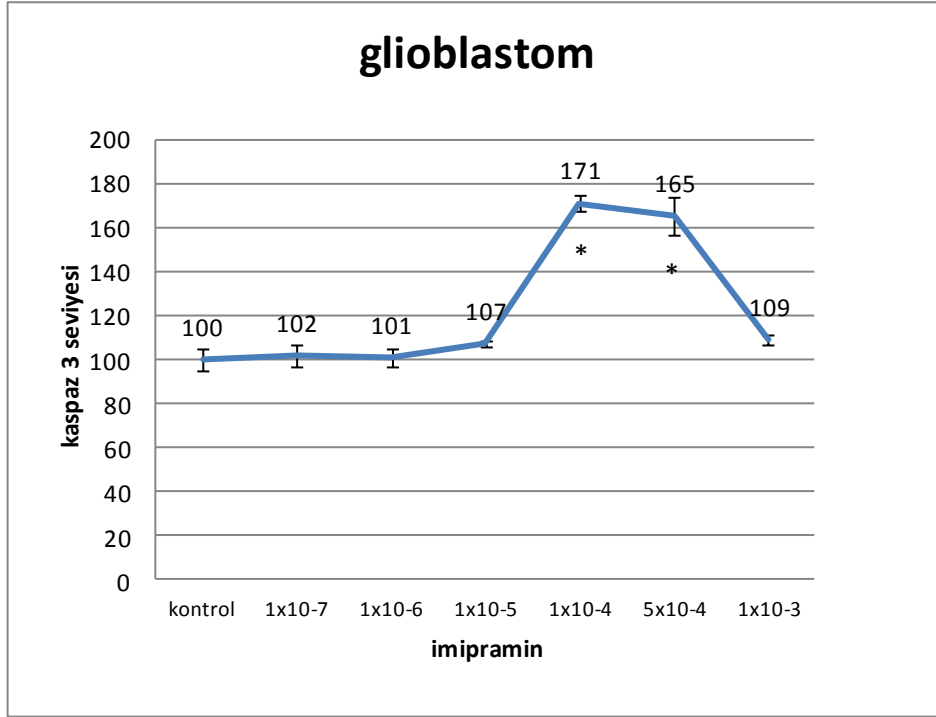
İmipramin toksisitesinde hücre içi kaspaz-3 seviyeleri incelendiğinde nöronal hücrelerde hücre canlılığında anlamlı azalmanın olduğu 1×10^{-7} dozunda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da hücre içi kaspaz 3 seviyeleri %20 oranında artmıştır. Sonraki tekrarlanan dozlarda bu artış devam ederek kaspaz seviyeleri 1×10^{-6} dozunda % 152'ye, 1×10^{-5} dozunda %251'e, 1×10^{-4} dozunda %316 'ya, 5×10^{-3} dozunda %334'e ve 1×10^{-3} dozunda da ortalama 3,5 kat artarak % 372'ye yükselmiştir (Şekil 4.15.)

Gliyal hücrelerdeki imipramin toksisitesinde, kaspaz-3 seviyeleri ölçüldüğünde hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlılığın olmadığı 1×10^{-4} dozunda kaspaz 3 seviyeleri anlamlı olarak artarak %172 düzeyine çıkmıştır. Yine aynı şekilde istatistiksel olarak hücre canlılığının azaldığı 5×10^{-3} düzeyinde kaspaz 3 seviyesinde

% 65 'lik anlamlı bir artış gözlenmiştir. 1×10^{-3} dozunda ise kaspaz 3 seviyeleri tekrar düşüşe geçmiştir (Şekil 4.16.).



Şekil 4.15. İmipraminin nöronal hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi kaspaz-3 seviyelerindeki değişim * $p < 0,005$.

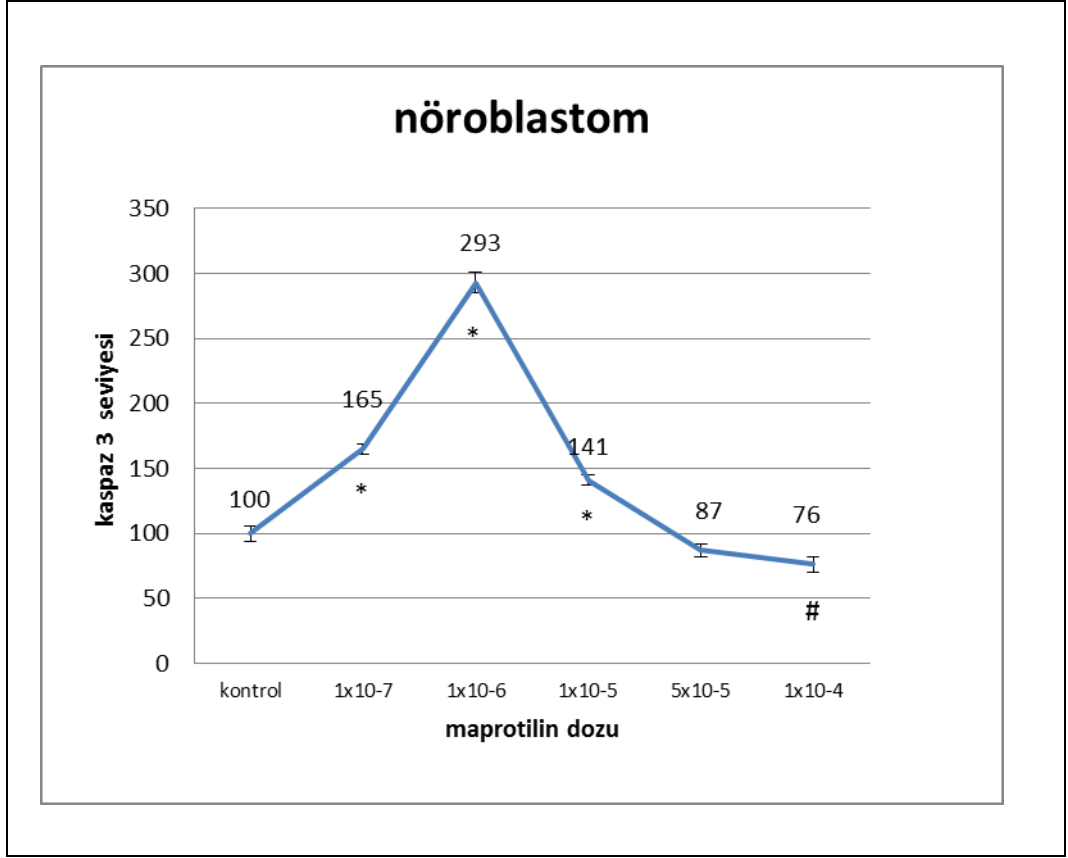


Şekil 4.16. İmipraminin gliyal hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi kaspaz-3 seviyelerindeki değişim * p<0,005.

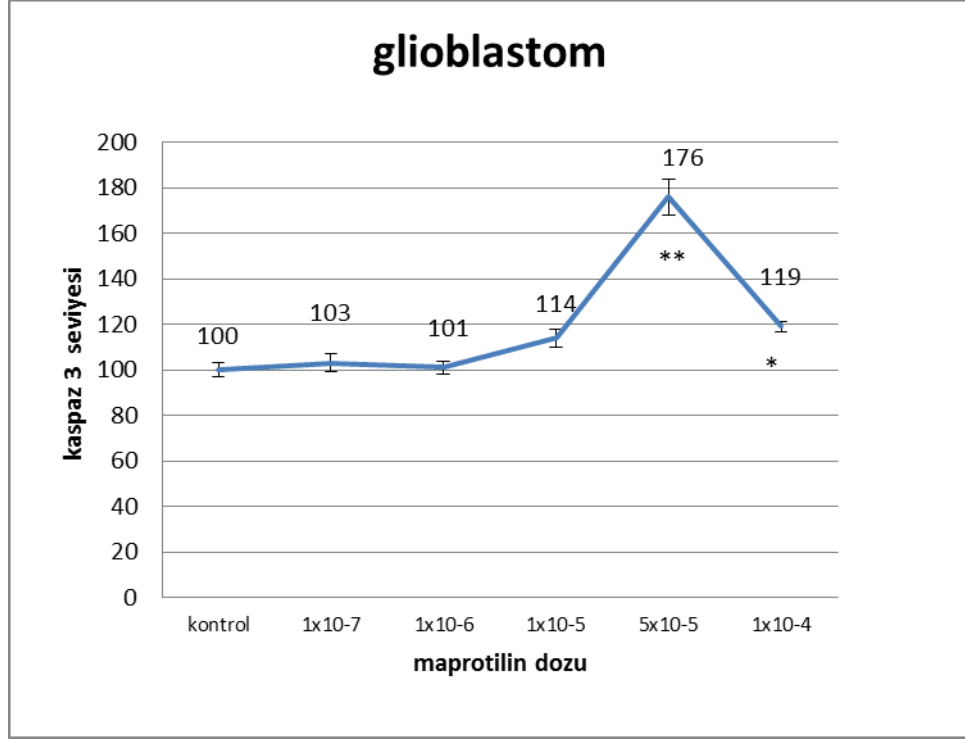
4.3.3. Maprotilinin Kaspaz-3 Seviyelerine Etkileri

Nöronal hücrelere uygulanan maprotilinin hücre içindeki kaspaz 3 seviyeleri incelendiğinde hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı azalmanın gözlemlendiği 1×10^{-7} dozunda kaspaz 3 seviyesinde % 65'lik bir artış gözlemlenmiştir. Bu artış 1×10^{-6} dozunda pik yaparak kaspaz 3 seviyesi kontrole göre yaklaşık 3 kat artmıştır. 1×10^{-5} seviyesinde kaspaz 3 düzeyinde azalma gözlemlense de, kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı artış vardır. Ancak kaspaz 3 seviyeleri 5×10^{-5} ve 1×10^{-5} dozunda azalma göstermiştir (Şekil 4.17.).

Gliyal hücrelerde maprotilinin 1×10^{-5} dozunda kaspaz 3 düzeyinde %14 seviyesinde bir artış gözlemlenmekle birlikte bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. İstatistiksel olarak anlamlı kaspaz 3 artışı 5×10^{-5} dozunda görülmüştür. Kaspaz 3 seviyesi 5×10^{-5} dozunda % 176 'ya 1×10^{-4} dozunda ise %119'a çıkmıştır (Şekil 4.18.).



Şekil 4.17. Maprotilinin nöronal hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi kaspaz-3 seviyelerindeki değişim * $p < 0,005$, #; $p < 0,05$.



Şekil 4.18. Maprotilinin glial hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi kaspaz-3 seviyelerindeki değişim *; p<0,05, *** p<0,005

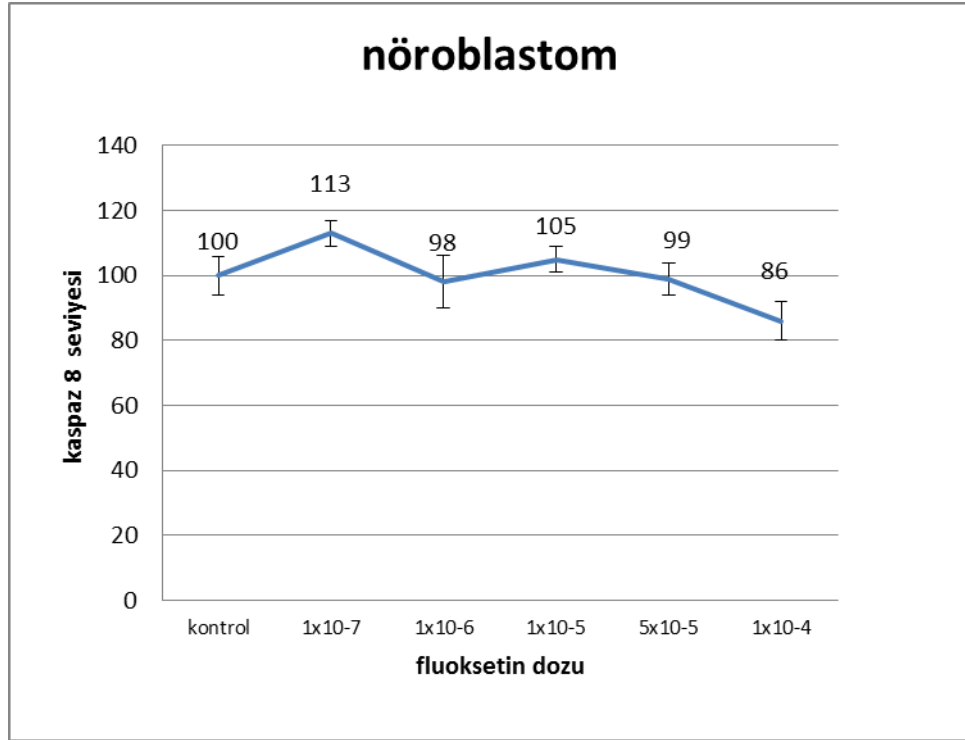
4.3. FLUOKSETİN, İMİPRAMİN VE MAPROTİLİNİN HÜCRE İÇİ KASPAZ-8 SEVİYELERİNE ETKİLERİ

Nöral ve glial hücre serilerinde, fluoksetin, imipramin ve maprotilinin apoptozda etkin rol oynayan kaspaz 8 seviyesi üzerindeki etkilerini gözlemlemek için ELISA metodu ile hücre içi kaspaz 8 seviyeleri ölçülmüştür.

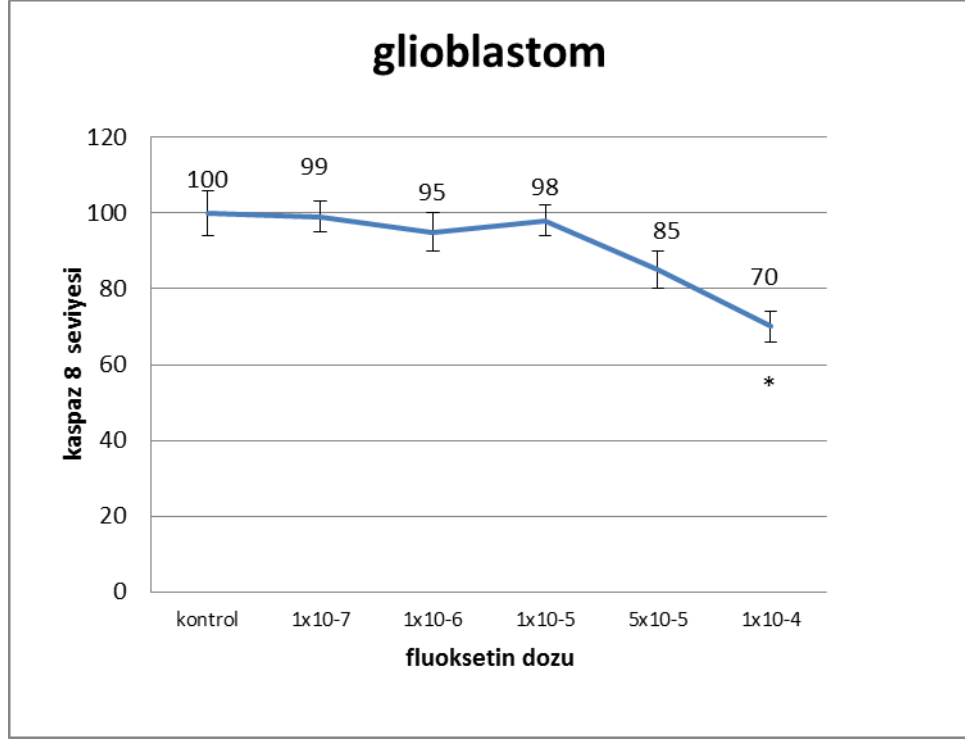
4.3.1. Fluoksetinin Kaspaz-8 Seviyelerine Etkileri

Hücre içi kaspaz-8 seviyeleri incelendiğinde fluoksetin uygulanan nöronal hücre serisinde istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir artış veya azalış gözlenmemiştir (Şekil 4.19.).

Fluoksetin uygulanan glial hücre serisinde kaspaz 8 seviyesinde hiçbir artış gözlenmeyip, 1×10^{-4} 'lük fluoksetin dozunda kaspaz 8 seviyesi istatistiksel olarak anlamlı %30'luk bir azalma göstermiştir (Şekil 4.20.).



Şekil 4.19. Fluoksetinin nöronal hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi kaspaz-8 seviyelerindeki değişim.



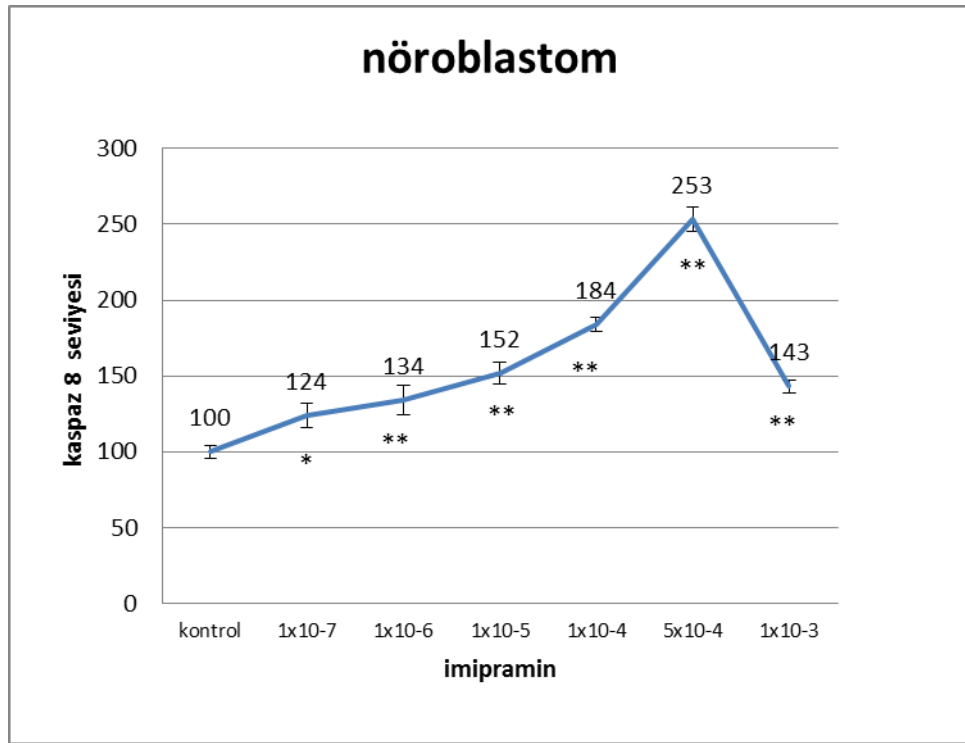
Şekil 4.20. Fluoksetinin glial hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi kaspaz-8 seviyelerindeki değişim *; $p < 0,005$

4.3.2. İmipraminin Kaspaz-8 Seviyelerine Etkileri

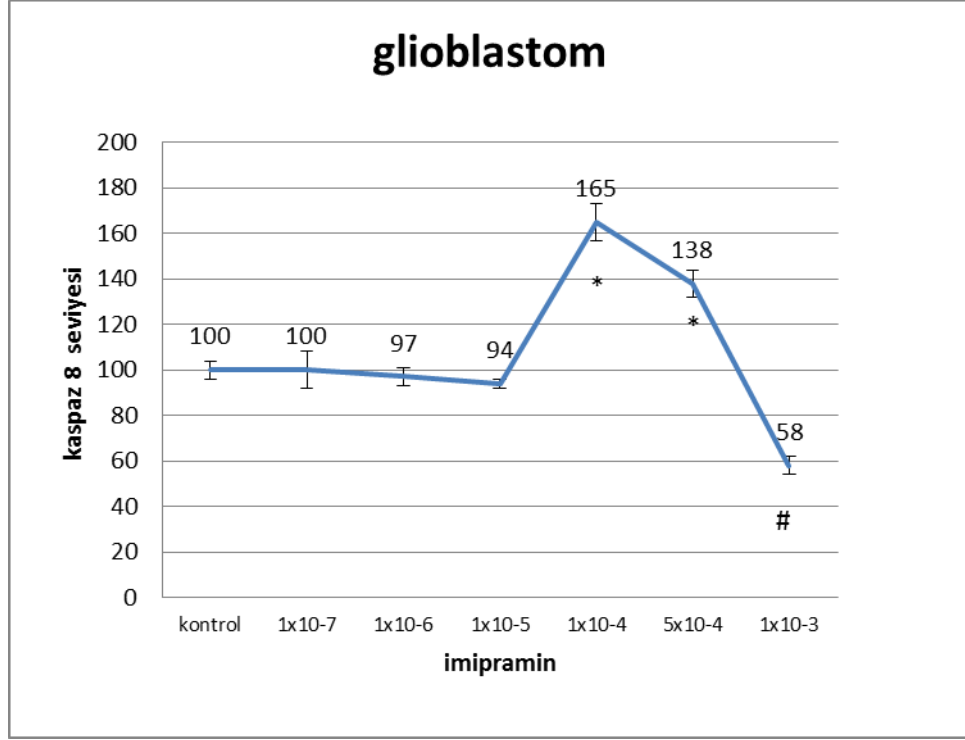
İmipramin toksistesinde hücre içi kaspaz-8 seviyeleri incelendiğinde nöronal hücrelerde hücre canlılığında anlamlı azalmanın olduğu 1×10^{-7} dozunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde hücre içi kaspaz 8 seviyeleri artmıştır. Bu artış 1×10^{-7} M dozunda %24, 1×10^{-6} M dozunda %34, 1×10^{-5} M dozunda % 52, 1×10^{-4} M dozunda %84, 5×10^{-4} M dozunda % 153 ve 1×10^{-3} M dozunda %43 oranında olmuştur. Kaspaz 8 düzeylerindeki artış tüm dozlarda istatistiksel olarak anlamlıdır. (Şekil 4.21.).

Glial hücrelerdeki imipramin toksisitesinde, kaspaz-3 seviyeleri ölçüldüğünde istatistiksel olarak anlamlı değişimin olmadığı 1×10^{-4} dozunda kaspaz 8 seviyeleri

anlamli olarak artarak %165 düzeyine cikmistir. Yine ayni sekilde istatistiksel olarak hücre canlilikinin azaldigi 5×10^{-3} düzeyinde kaspaz 8 seviyesinde % 38 'lik anlamlı bir artış gözlenmiştir. 1×10^{-3} dozunda ise kaspaz 8 seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir (Şekil 4.22.).



Şekil 4.21. İmipraminin nöronal hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi kaspaz-8 seviyelerindeki değişim *; $p < 0,05$, ** ; $p < 0,005$



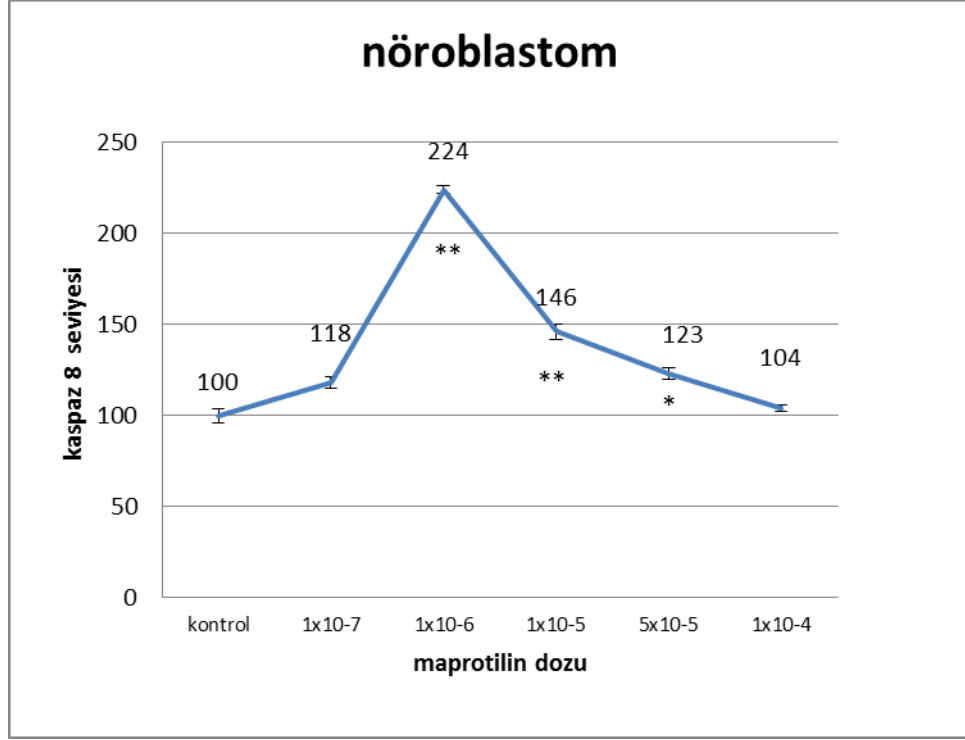
Şekil 4.22. İmipraminin glial hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi kaspaz-8 seviyelerindeki değişim * p;<0,005, #; p<0,005

4.3.3. Maprotilinin Kaspaz-8 Seviyelerine Etkileri

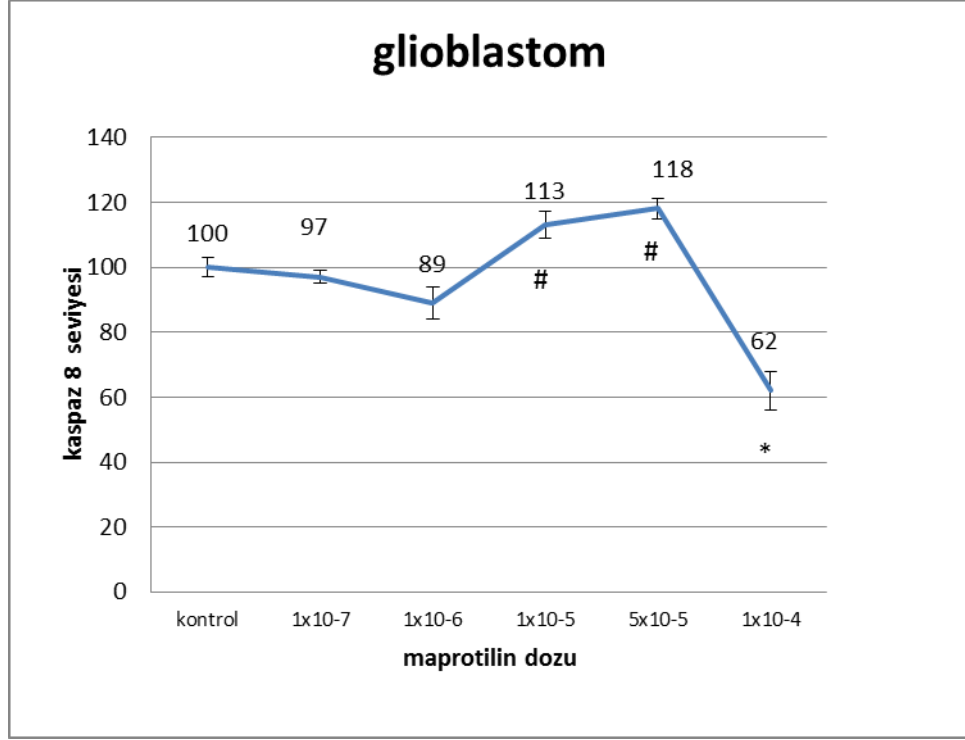
Nöronal hücrelere uygulanan maprotilinin hücre içindeki kaspaz 8 seviyeleri incelendiğinde hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı azalmanın gözlemlendiği 1×10^{-7} dozunda kaspaz 3 seviyesinde % 18'lik bir artış göstermekle birlikte bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak 1×10^{-6} M maprotilin dozunda kaspaz 8 seviyesi % 224'lere kadar ulaşarak anlamlı bir artış göstermiştir. Bu artış 1×10^{-5} M ve 5×10^{-5} M dozlarında da devam etmiştir (Şekil 4.23.).

Glial hücrelerde maprotilinin 1×10^{-5} M dozunda kaspaz 8 düzeyinde %13'lük bir artış gözlenmekle birlikte bu artış istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur.

5×10^{-5} M maprotilin dozunda da % 118 'lik kaspaz 8 seviyesi ile istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.24.).



Şekil 4.23. Maprotilinin nöronal hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi kaspaz-8 seviyelerindeki değişim *; $p < 0,05$, ** ; $p < 0,005$.



Şekil 4.24. Maprotilinin glial hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi kaspaz-8 seviyelerindeki değişim *: $p < 0,005$, #: $p < 0,05$.

4.4. FLORESAN BOYAMA İLE APOPTOZİS ORANININ KALİTATİF OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

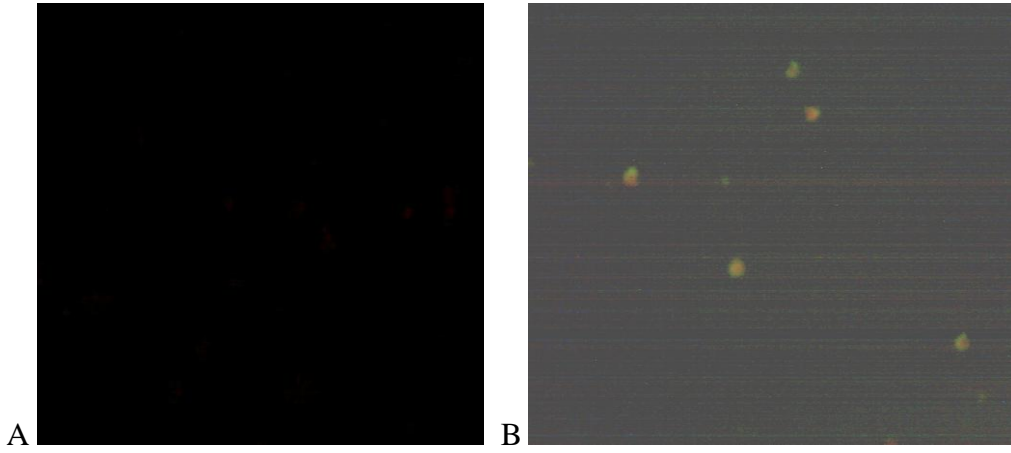
Annexin V/FITC boyaması apoptotik hücrelerin gösterilmesi amacıyla uygulanmaktadır. Annexinler kalsiyum bağımlı, özellikle de plazma membranında bulunan fosfolipitlerin gibi fosfolipitlere bağlanan proteinlerdir (156). Normal fizyolojik şartlarda fosfolipitlerin plazma membranının stozolik tarafında yer alır. Ancak apoptoz başladığı zaman fosfolipitlerin membran dış yüzeyine doğru transloke olur (157). Flourasan etiketli annexin V de hücre yüzeyine taşınan proteinlere bağlanarak fosfolipitlerini görünür hale getirir.

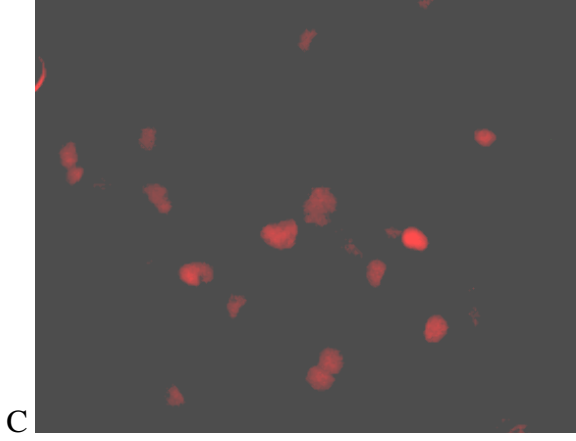
Annexin V ile boyamalarda apoptotik hücre ile nekrotik hücre ölümünü birbirinden ayırmak için propidium iodid boyası da kullanılır. Annexin V⁻/propidium iodid⁺ ise hücre nekrotik, Annexin V⁺/propidium iodid⁺ ise hücre geç apoptotik, Annexin V⁺/propidium iodid⁻ ise de hücre erken apoptotik hücredir (158).

Glioblastom Hücre Serisinde Fluoksetin Etkisi

Fluoksetin uygulanan glial hücre serisinde kaspaz 3 miktarını anlamlı derecede artırdığı ve hücrelerin neredeyse %50'sinin ölümüne neden olduğu 5×10^{-5} M fluoksetin dozunda hücrelerin sadece annexin V ile boyandığı ve dolayısı ile hücrelerin apoptoza gittiği gözlenmiştir (Şekil 4.25 B).

Ancak 10^{-4} M fluoksetin dozunda hücrelerin sadece propidyum ile boyanarak hücrelerin nekroza uğradığı gözlenmiştir (Şekil 4.25 C).



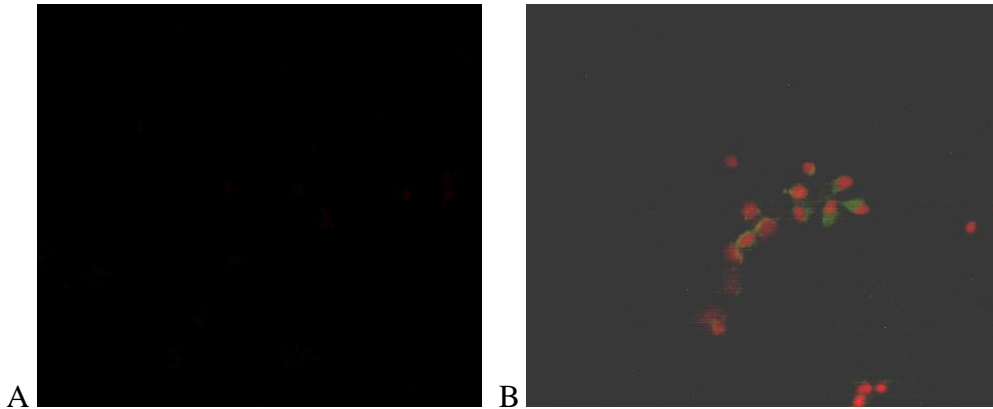


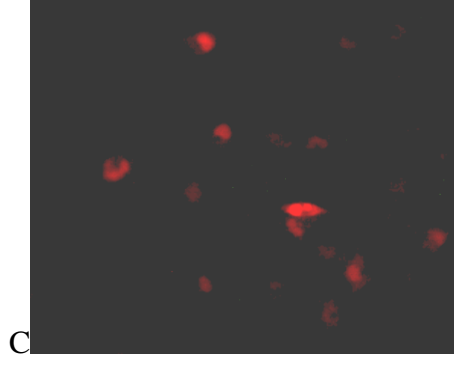
Şekil 4.25. Glial hücrelerde fluoksetinin apoptoz üzerine etkisi .A- Kontrol, B - 5×10^{-5} M fluoksetin, C- 10^{-4} M fluoksetin dozu

4.5.2. Glioblastom Hücre Serisinde İmipraminin Etkisi

Yine kaspaz 3 miktarının anlamlı olarak yüksek bulunduğu ve glial hücrelerin yaklaşık % 50'si'in öldüğü 5×10^{-4} M imipramin dozunda hücrelerin annexin V ve propidium iodidin her ikisiyle birden boyandığı gözlenmiştir. Bud a hücrelerin geç apoptotik fazda olduğunu gösterir (Şekil 4.26 B).

Ancak 10^{-3} M imipramin dozunda hücrelerin sadece propidyum ile boyanarak nekroza uğradığı gözlenmiştir (Şekil 4.26 C).



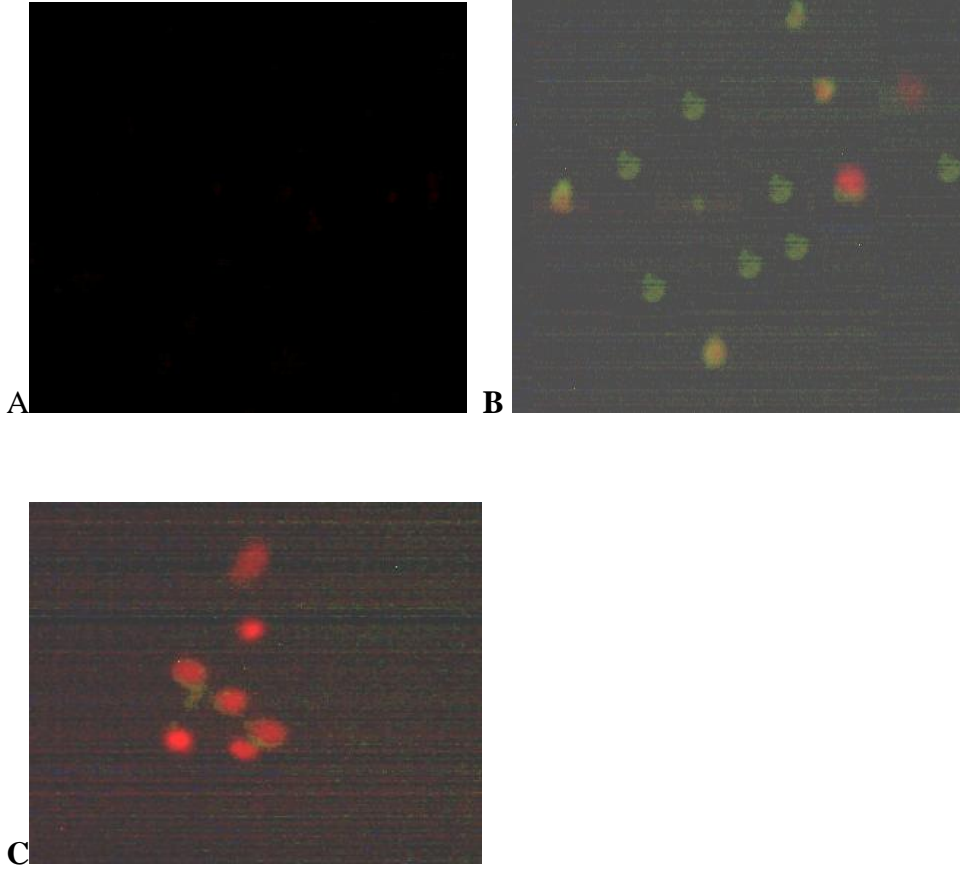


Şekil 4.26. Gliyal hücrelerde imipraminin apoptoz üzerine etkisi A- Kontrol, B - 5×10^{-4} M imipraminin, C- 10^{-3} M imipraminin dozu

4.5.3. Glioblastom Hücre Serisinde Maprotilinin Etkisi

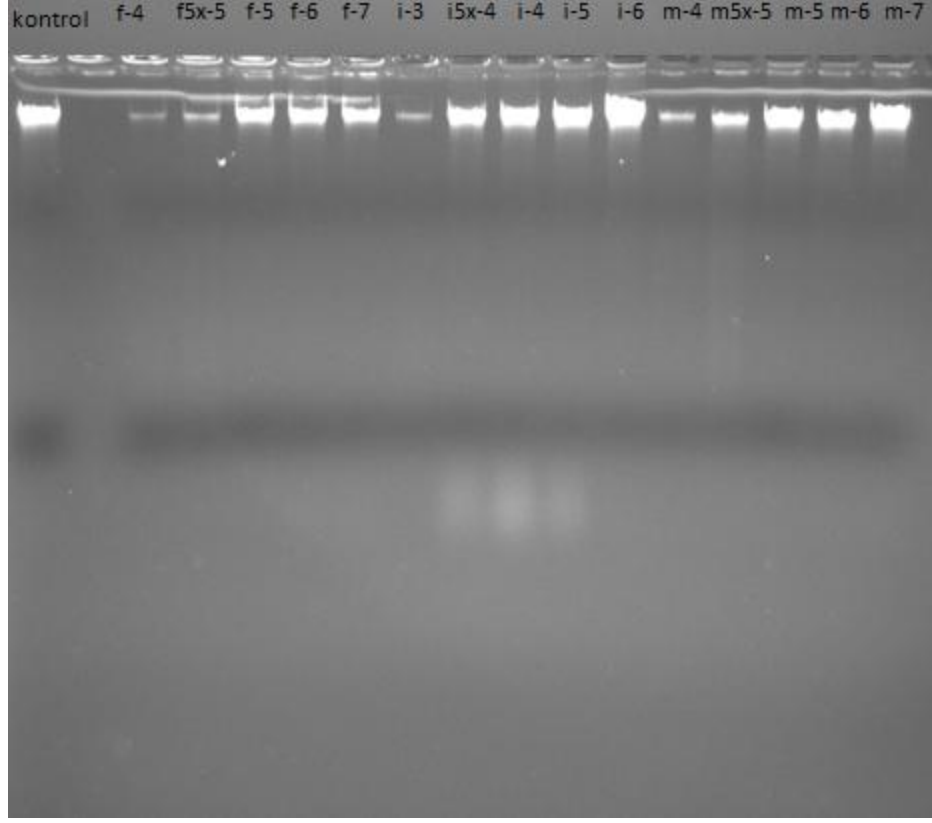
5×10^{-5} M maprotilin dozunda hücrelerin apoptoza uğrayarak annexin V ile boyandığı gözlenmiştir. Daha önceki sonuçlardada gözlendiği gibi bu doz hücrelerin % 30'unun ölümüne neden olan ve kaspaz 3 seviyelerinde anlamlı artışın olduğu dozdur. (Şekil 4.27 B).

10^{-4} M maprotilin dozunda ise hücreler hem anneksin V ile hemde propidium iodid ile boyanmıştır. (Şekil 4.27 C).

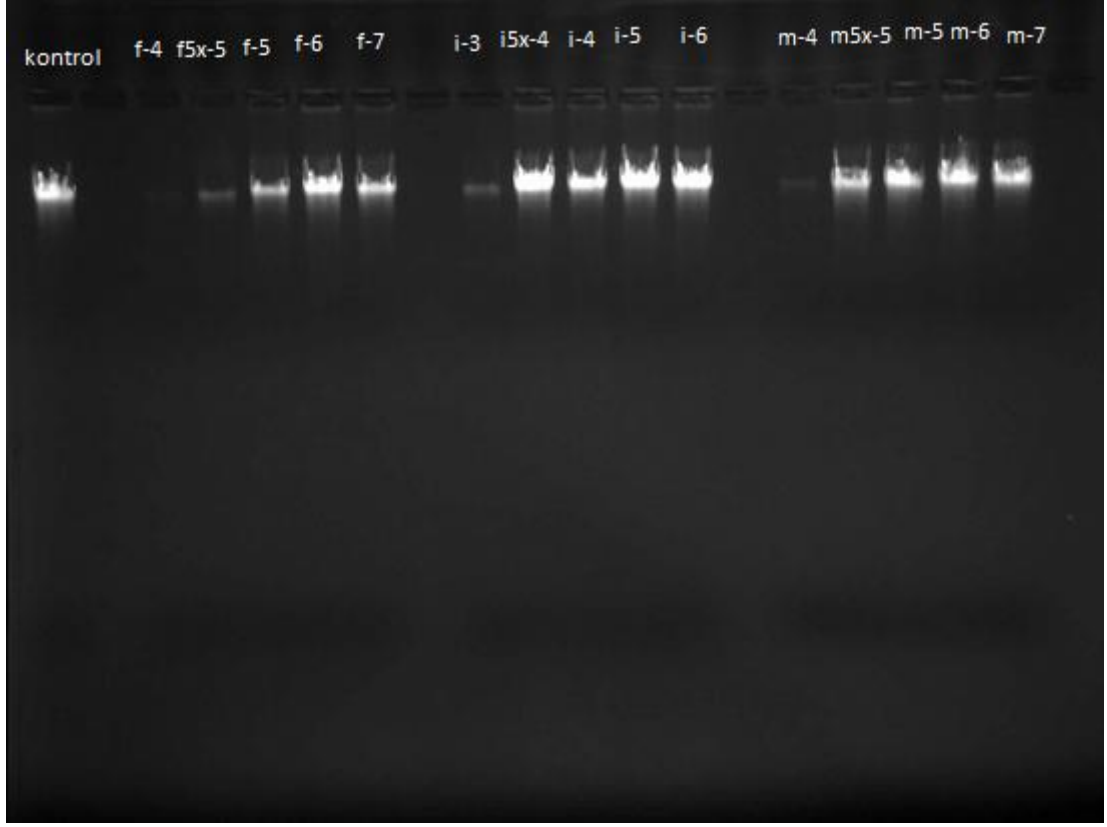


Şekil 4.27. Glial hücrelerde maprotilinin apoptoz üzerine etkisi A- Kontrol, B - 5×10^{-5} M maprotilin, C- 10^{-4} M maprotilin dozu

4.5. FLUOKSETİN, İMİPRAMİN VE MAPROTİLİNİN HÜCRE İÇİNDE MEYDANA GETİRDİKLERİ DNA HASARININ GÖSTERİLMESİ



Şekil 4.28. Nöroblastom hücre serisinde fluoksetin, imipramin ve maprotilinin DNA üzerindeki etkisi



Şekil 4.29. Glioblastom hücre serisinde fluoksetin, imipramin ve maprotilinin DNA üzerindeki etkisi

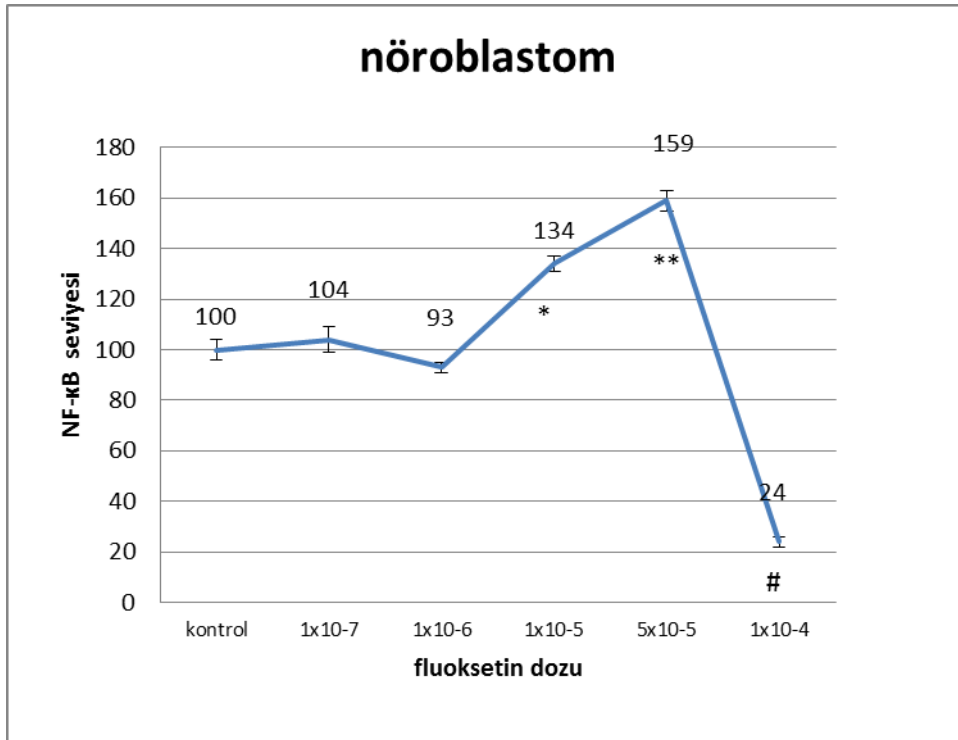
4.6. FLUOKSETİN, İMİPRAMİN VE MAPROTİLİNİN HÜCRE İÇİ NF-κB SEVİYELERİNE ETKİLERİ

Nöral ve glial hücre serilerinde, fluoksetin, imipramin ve maprotilinin hücre içi yaşamsal olaylarda etkin rol oynayan NF-κB seviyesi üzerindeki etkilerini gözlemlemek için ELISA metodu ile hücre içi NF-κB seviyeleri ölçülmüştür.

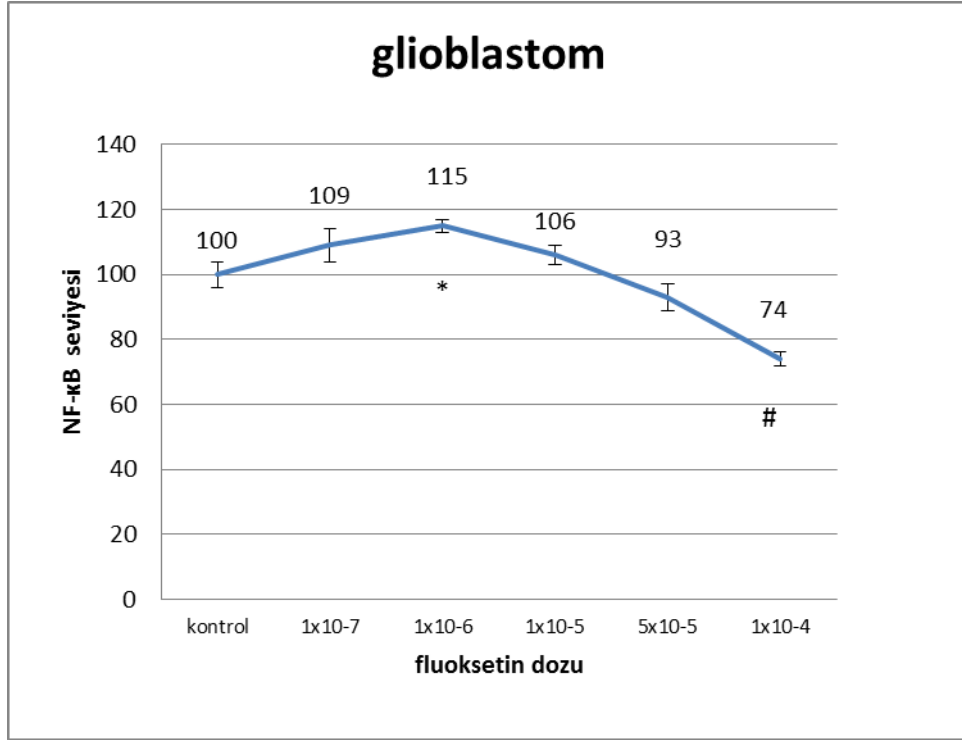
4.6.1 Fluoksetinin NF-κB Seviyelerine Etkileri

Hücre içi NF-κB seviyeleri incelendiğinde nöral hücre serisinde 1×10^{-5} M ve 5×10^{-5} M fluoksetin dozunda istatistiksel olarak anlamlı artışın olduğu gözlenmiştir. Bu artış 1×10^{-5} M 'da % 34, 5×10^{-5} M da ise % 59 civarındadır. 1×10^{-4} M 'lık fluoksetin uygulamasında ise NF-κB düzeyinde anlamlı bir azalma vardır (Şekil 4.30.).

Gliyal hücrelerdeki NF-κB miktarları ölçüldüğünde ise NF-κB düzeyindeki tek anlamlı artışın 1×10^{-6} M'lık fluoksetin dozunda olduğu görülmüştür. Nöroblastom hücre serisinde olduğu gibi gliyal hücrelerde de NF-κB düzeyi 1×10^{-4} M'lık fluoksetin dozunda azalma göstermiştir (Şekil 4.31.).



Şekil 4.30. fluoksetinin nöronal hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi NF-κB seviyelerindeki değişim *; $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, #; $p < 0,05$.

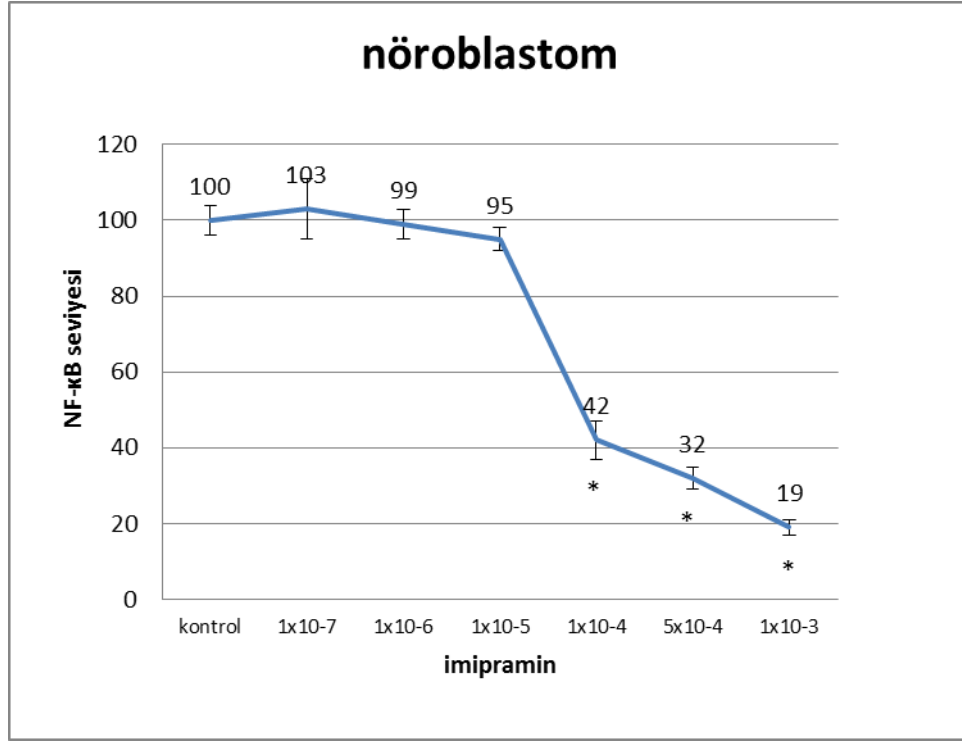


Şekil 4.31. fluoksetinin gliyal hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi NF-κB seviyelerindeki değişim *: p<0,01, #; p<0,05.

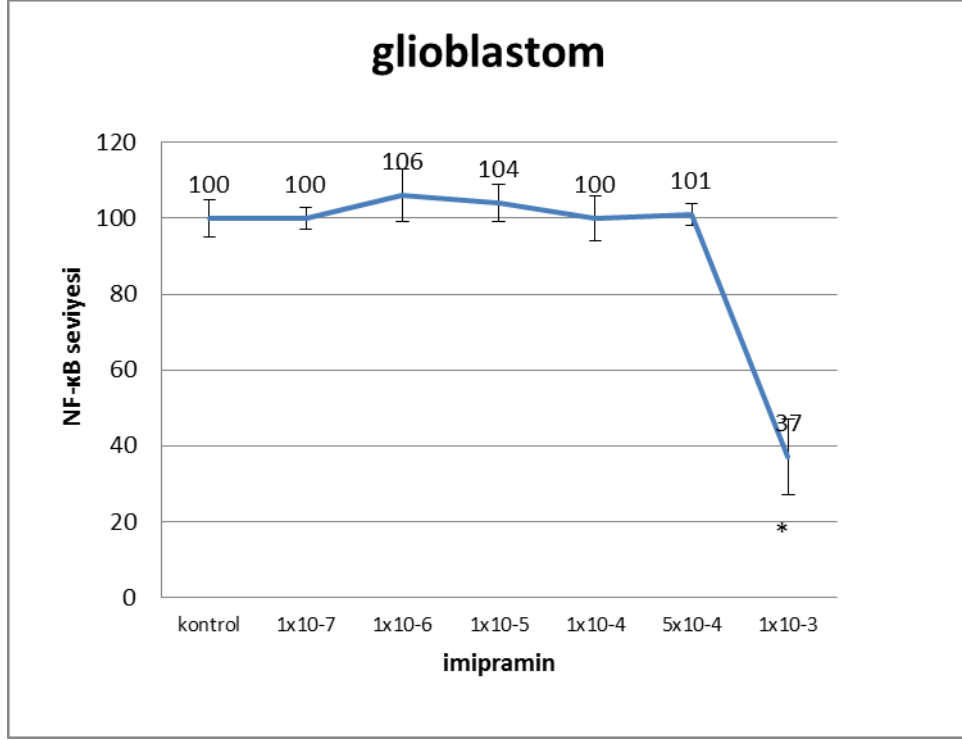
4.6.2 İmipraminin NF-κB Seviyelerine Etkileri

İmipramin ile muameleden sonra hücre içi NF-κB seviyeleri incelendiğinde nöronal hücrelerde hücre canlılığında anlamlı azalmanın olduğu 1×10^{-7} dozunda NF-κB seviyeleri 1×10^{-6} M imipramin dozundan itibaren azalma göstermiştir. Ancak 1×10^{-4} M imipramin dozunda NF-κB seviyesi %42'ye düşerek istatistiksel olarak anlamlılık kazanmıştır (Şekil 4.32.).

Gliyal hücrelerdeki imipramin uygulananında, 1×10^{-7} M, 1×10^{-6} M, 1×10^{-5} M, 1×10^{-4} M ve 5×10^{-4} M imipramin dozlarında hücre içi NF- κ B seviyelerinde herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Ancak 1×10^{-3} M imipramin dozunda hücre içi NF- κ B seviyesinde % 63 oranında azalma tespit edilmiştir.(Şekil 4.33.).



Şekil 4.32. İmipraminin nöronal hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi NF- κ B seviyelerindeki değişim *; $p < 0,005$.



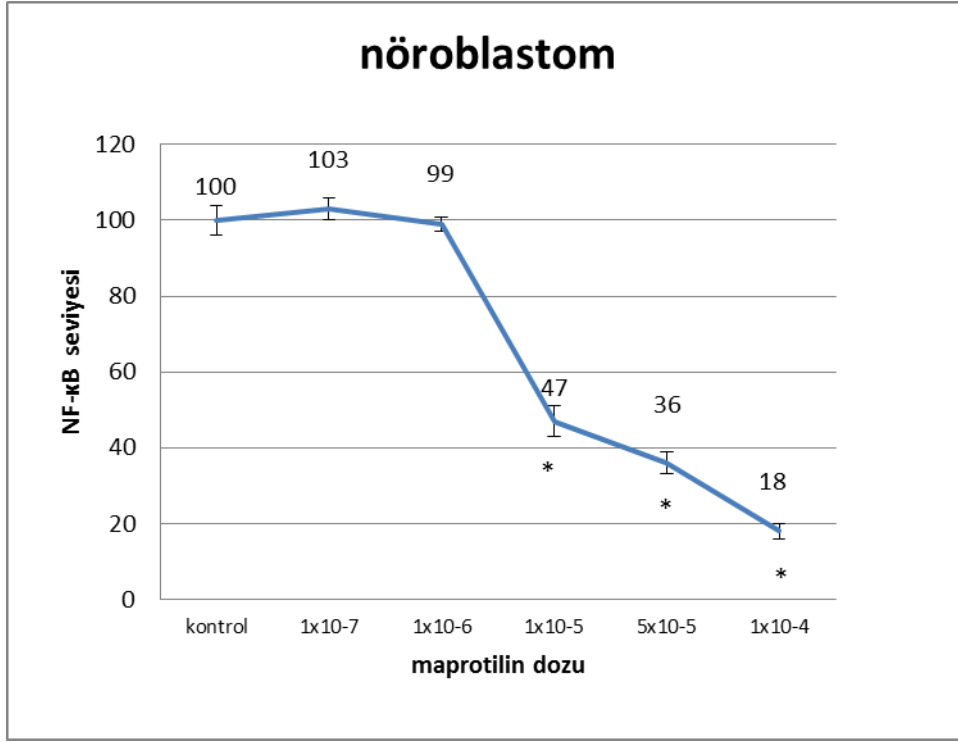
Şekil 4.33. İmipraminin glial hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi NF-κB seviyelerindeki değişim *; p<0,005.

4.6.3 Maprotilinin NF-κB Seviyelerine Etkileri

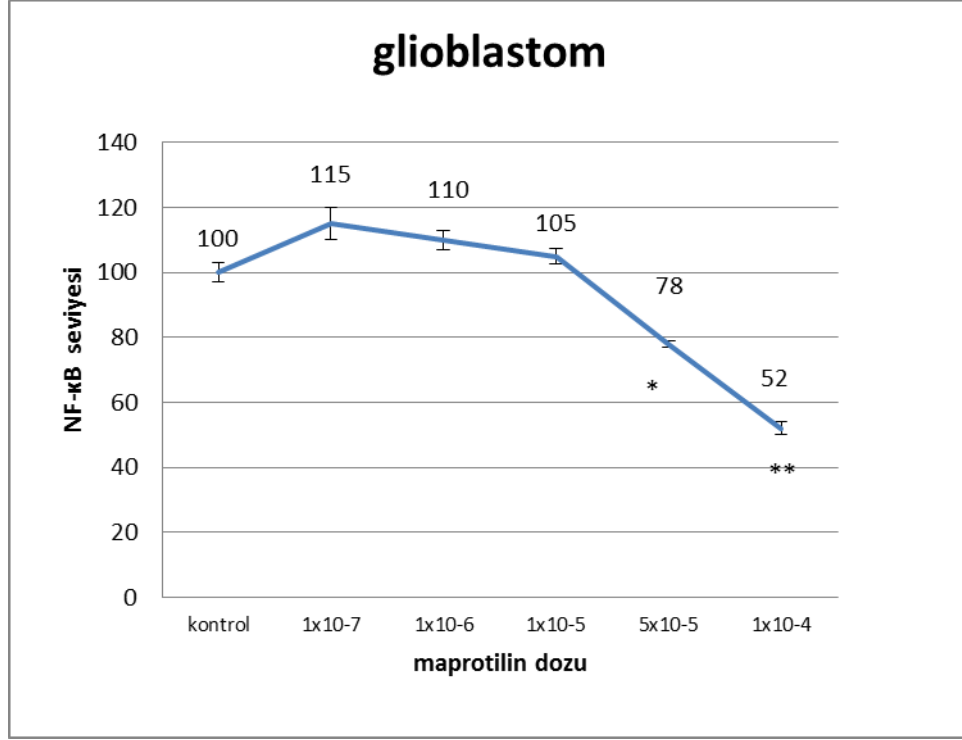
Maprotilinin uygulanan nöroblastom hücre serisinde hücre içindeki NF-κB seviyeleri incelendiğinde 1×10^{-7} M ve 1×10^{-6} M maprotilin dozlarında hücre içi NF-κB düzeylerinde herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Ancak hücre içi NF-κB seviyesinde 1×10^{-5} M maprotilin dozunda %53'lük, 5×10^{-5} M maprotilin dozunda %64 ve 1×10^{-4} M maprotilin dozunda %82'lik azalma gözlenmiştir. Bu dozlardaki değişimlerin hepsi istatistiksel olarak anlamlıdır. (Şekil 4.34.)

Glial hücrelerde maprotilinin 5×10^{-5} M dozunda NF-κB düzeyinde %22'lik bir azalma gözlenmekle birlikte bu azalma istatistiksel olarak da anlamlı

bulunmuştur. 1×10^{-4} M maprotilin dozunda da NF- κ B seviyesindeki azalma devam etmiştir. (Şekil 4.35.)



Şekil 4.34. Maprotilinin nöronal hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi NF- κ B seviyelerindeki değişim , * ; $p < 0,005$.



Şekil 4.35. Maprotilinin glial hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi NF-κB seviyelerindeki değişim *; p<0,05, **; p<0,005.

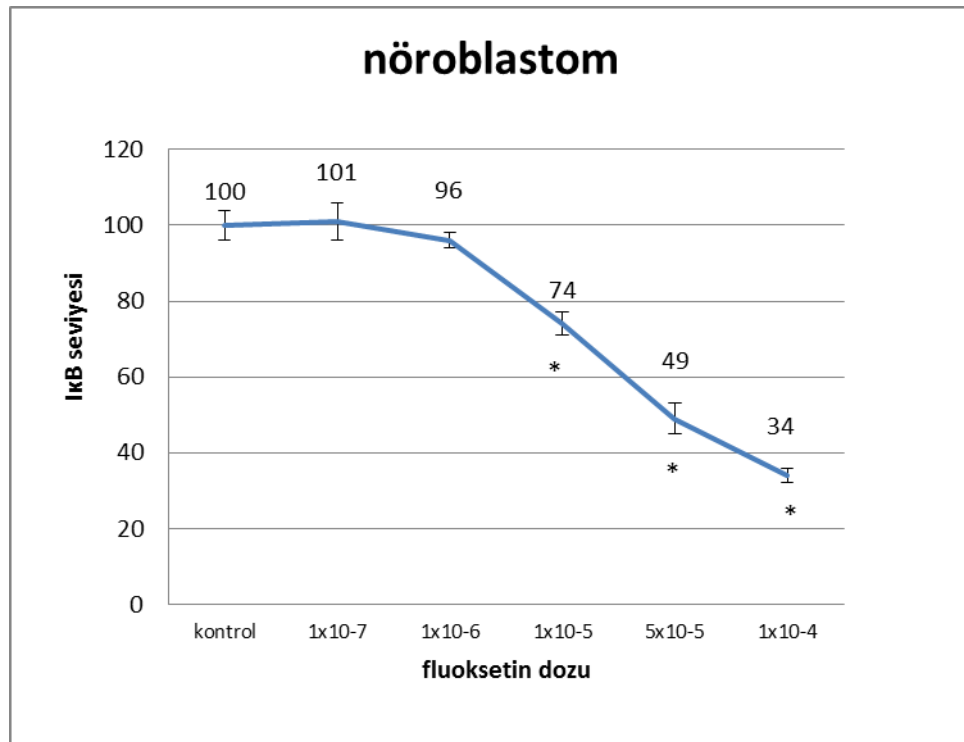
4.7. FLUOKSETİN, İMİPRAMİN VE MAPROTİLİNİN HÜCRE İÇİ İκB SEVİYELERİNE ETKİLERİ

Nöral ve glial hücre serilerinde, fluoksetin, imipramin ve maprotilinin hücre içinde stoplazmada, normalde NF-κB'ye bağlı halde bulunan, ancak uyarı halinde NF-κB'den ayrılan İκB düzeyleri üzerindeki etkilerini gözlemlemek için ELISA metodu ile hücre içi İκB seviyeleri ölçülmüştür.

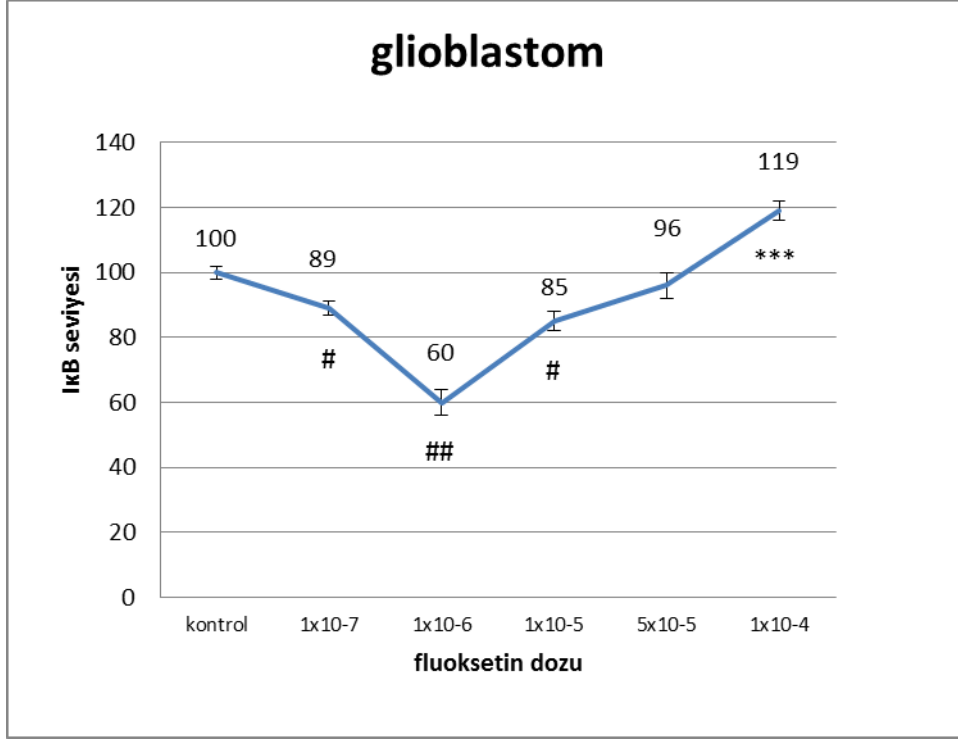
4.7.1. Fluoksetinin İkB Seviyelerine Etkileri

Hücre içi İkB seviyeleri incelendiğinde nöral hücre serisinde 1×10^{-4} M, 5×10^{-5} M ve 1×10^{-5} M fluoksetin dozunda istatistiksel olarak anlamlı azalmanın olduğu ve bu azalmanın da NF-κB sonuçları ile orantılı olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.36.).

Gliyal hücrelerdeki İkB miktarları ölçüldüğünde ise İkB düzeyinde 1×10^{-7} M, 1×10^{-6} M ve 1×10^{-5} M fluoksetin dozlarında anlamlı azalmaların olduğu gözlenmiştir. Bu azalmalar sırası ile %11, % 40 ve % 15 düzeyindedir ve sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı olup NF-κB sonuçları ile de uyumludur. 1×10^{-4} M fluoksetin dozunda ise hücre içi İkB düzeyinde %19'luk anlamlı bir artış vardır (Şekil 4.37.).



Şekil 4.36. Fluoksetinin nöronal hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi İkBα seviyelerindeki değişim *; $p < 0,005$.



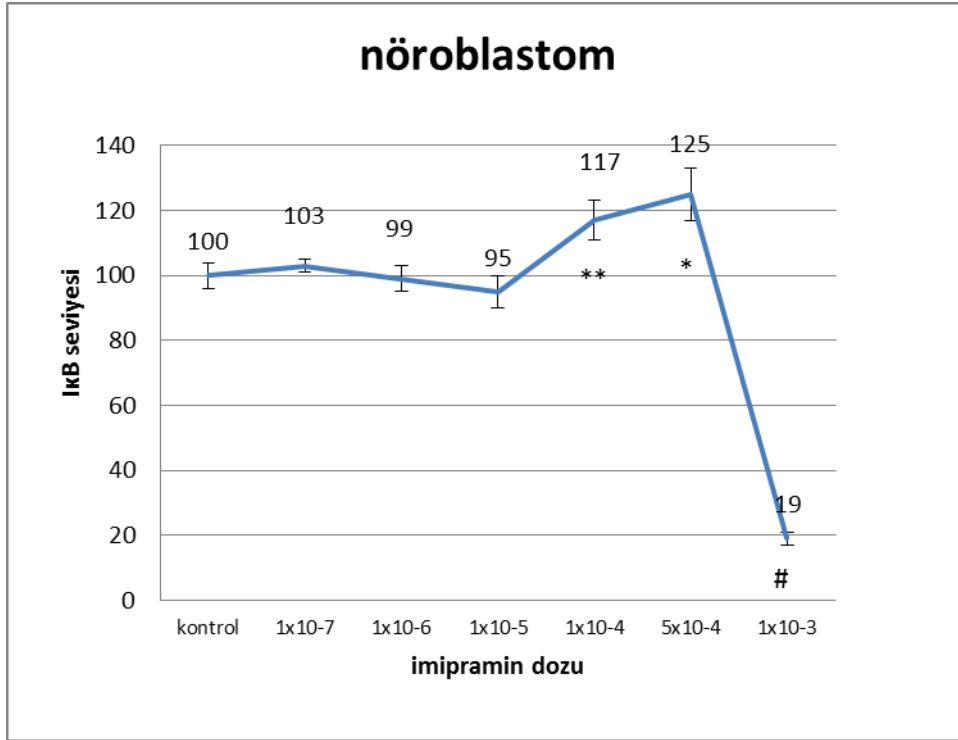
Şekil 4.37. Fluoksetinin glial hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi IκBα seviyelerindeki değişim , * ;p<0,005, #; p<0,05, ##; p<0,01.

4.7.2. İmipraminin IκB Seviyelerine Etkileri

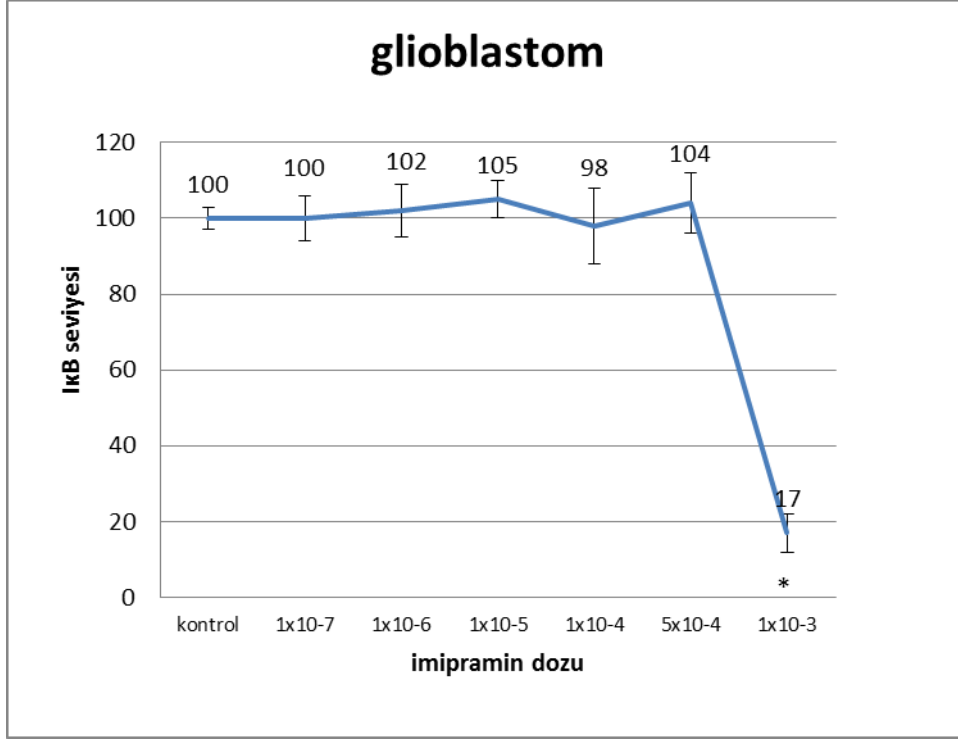
İmipramin uygulanan hücre içi IκB seviyeleri incelendiğinde nöronal hücrelerde 1×10^{-4} M ve 5×10^{-4} M imipramin dozundan itibaren IκB düzeylerinde artış gözlenmiştir. Bu artış 1×10^{-4} M imipramin dozunda %17 ve 5×10^{-4} M imipramin dozunda % 25 seviyesinde olup istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ancak 1×10^{-3} M imipramin dozunda IκB seviyesi % 19 seviyesine düşmüştür (Şekil 4.38.).

Glial hücrelerdeki imipramin uygulanan 1×10^{-7} M, 1×10^{-6} M, 1×10^{-5} M, 1×10^{-4} M ve 5×10^{-4} M imipramin dozlarında hücre içi IκB miktarında yine hücre içi

NF-κB miktarında olduğu gibi herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Ancak 1×10^{-3} M imipramin dozunda hücre içi IκB seviyesi yine hücre içi NF-κB seviyesinde olduğu gibi azalma göstermiştir. Hücre içi IκB seviyesi % 17 civarındadır (Şekil 4.39.)



Şekil 4.38. İmipraminin nöronal hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi IκBα seviyelerindeki değişim *; $p < 0,05$, **; $p < 0,01$, #; $p < 0,05$.



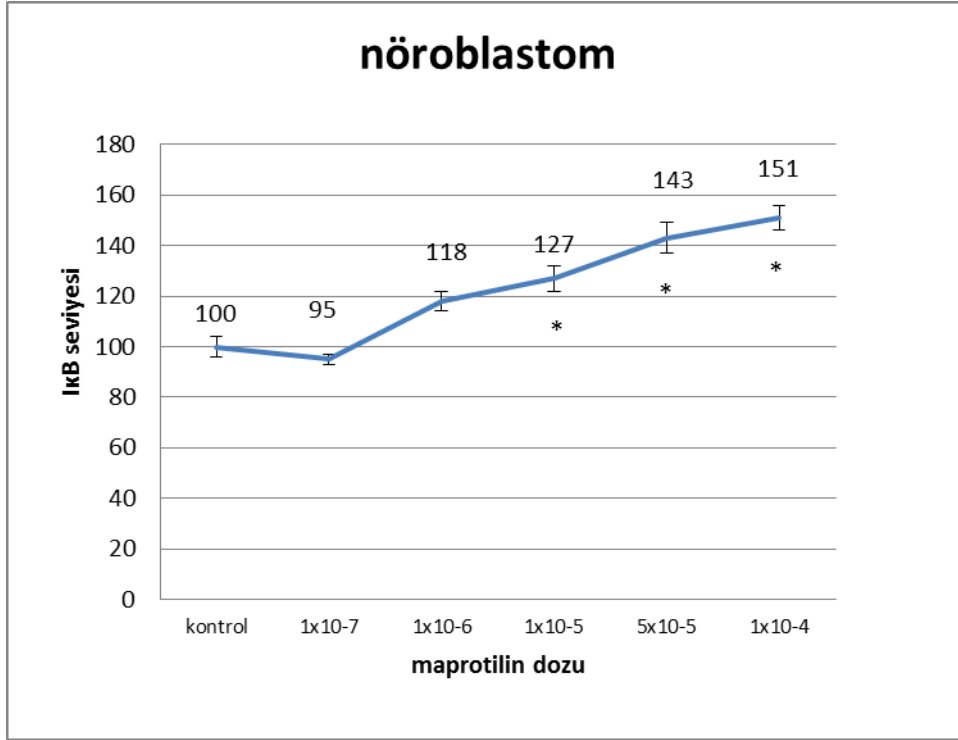
Şekil 4.39. İmipraminin glial hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi IκBα seviyelerindeki değişim *; p<0,005.

4.7.3. Maprotilinin IκB Seviyelerine Etkileri

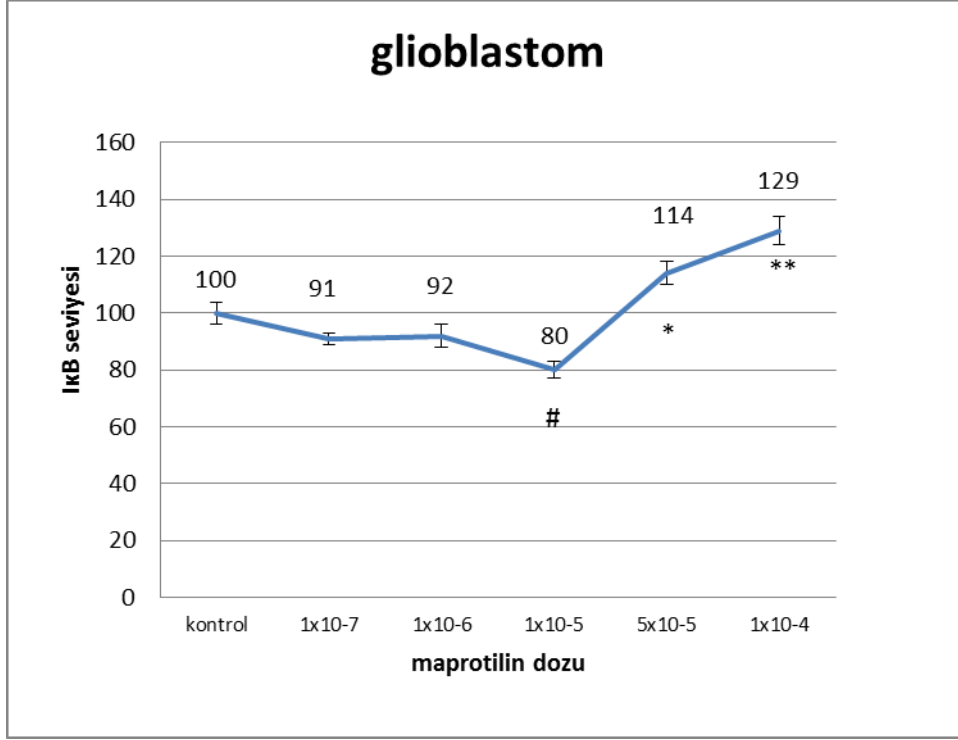
Maprotilinin uygulanan nöroblastom hücre serisinde hücre içindeki IκB seviyesi, 1×10^{-7} M ve 1×10^{-6} M maprotilin dozlarında anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Ancak hücre içi IκB seviyesinde 1×10^{-5} M maprotilin dozunda %27'lük, 5×10^{-5} M maprotilin dozunda % 43 ve 1×10^{-4} M maprotilin dozunda %51'lik artış gözlenmiştir. Bu dozlardaki değişimlerin hepsi istatistiksel olarak anlamlıdır ve sonuçlar NF-κB değişimi ile uyum göstermektedir (Şekil 4.40.)

Glial hücrelerde maprotilinin 10^{-5} M dozunda IκB düzeyinde % 20'lik bir azalma gözlenmekle birlikte bu azalma istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur.

NF- κ B seviyelerinin düştüğü 5×10^{-5} M ve 1×10^{-4} M maprotilin dozunda ise I κ B seviyesinde sırası ile % 14'lük ve % 29'luk artış gözlenmiştir (Şekil 4.41.)



Şekil 4. 40. Maprotilinin nöronal hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi I κ B α seviyelerindeki değişim *; $p < 0,005$.



Şekil 4.41. Maprotilinin glial hücrelerdeki toksisitesi sonucu hücre içi IκBα seviyelerindeki değişim *; p<0,05, **; p<0,005, #; p<0,01.

5. TARTIŞMA

Antidepresan ilaçlar, genel olarak noradrenalin ve serotoninin hücre içine geri alınımını inhibe ederek etkinliklerini göstermektedir. Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalarda depresyonun yalnızca beyindeki serotonin ve noradrenalin miktarındaki azalmayla alakalı olmadığı, aynı zamanda depresyonlu hastalarda patogeneizde beynin bazı odaklarında meydana gelen apoptoz ve benzeri değişikliklerin de etkili olabileceği gözlenmiştir. Yine aynı şekilde antidepresan ilaçların da etkinliklerini kısa sürede değil haftalar ve bazen aylar süren tedavilerin sonucunda göstermeleri etkilerinin sadece serotonin ve noradrenalin geri alımı ile sınırlı olmayacağını düşündürmektedir

Çalışmamızda serotonin geri alım inhibitörü olan fluoksetin, trisiklik antidepresan ailesine üye olan imipramin ve etki mekanizması trisiklik antidepresanlara benzeyen ve tetrasiklik yapıya sahip olan maprotilin kullanılmıştır.

Bu çalışmada fluoksetin, imipramin ve maprotilinin nöroblastom ve glioblastom hücre serilerinde hücre içinde meydana getirdikleri değişiklikleri ve bu değişikliklerin hangi dozlarda ortaya çıktığı araştırılmıştır. Yapılan çalışmada nöroblastom hücre serisinin, glioblastom hücre serilerine göre kullanılan her 3 maddeye daha duyarlı olduğu gözlenmiştir.

Fluoksetin ve norfluoksetinin yapılan çalışmalara göre etkin plazma konsantrasyonu kişiye göre değişmekle birlikte ortalama 100ng/ml dir (159). Ancak yapılan araştırmalarda fluoksetinin beyinde birikme eğilimi gösterdiği ve plazmaya kıyasla yaklaşık 20 kat fazla bulunduğu gösterilmiştir (160) .

Yapılan bir çalışmada nöroblastom kaynaklı hücre serisi olan SKNAS hücreleri kullanılmış, hücelere en düşük doz olarak 5×10^{-6} M fluoksetin uygulanmış ve bu dozda hücre canlılığı yaklaşık olarak %100'den %75'e düşmüştür (161). Yaptığımız çalışmada nöroblastom hücrelerine en düşük doz olarak 1×10^{-8} M fluoksetin

uygulanmış ve hücre canlılığında azalma bu dozda dahi görülmüştür. Ancak hücre canlılığındaki istatistiksel olarak anlamlı azalma 1×10^{-7} M'da gözlenmiştir. Anlamlılığın gözlendiği bu dozda apoptoz göstergesi kaspaz 3 seviyesi de anlamlı olarak artış göstermiştir. Ancak kaspaz 8 seviyelerinde herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Yapılan bazı çalışmalarda SSRI'ların hücreyi kaspaz molekülleri üzerinden apoptoza götürdüğü ispatlanmıştır (162-163).

Bunun yanında fluoksetinin c6 glioma hücrelerinde apoptoza neden olduğu gösterilmiştir (59). Ancak fluoksetinin nöroblastom hücrelerinde kaspaz 8 üzerinde değişiklik yapmadan sadece kaspaz 3'ü yükseltmesi apoptozun nöroblastom hücrelerinde mitokondri /sitokrom c aracılı intrinsek apoptoz yolağını üzerinden gerçekleştirdiğini düşündürmektedir. Yapılan bir çalışmada da bizim bulgularımızla benzer şekilde fluoksetinin sitokrom c ve kaspaz 3 miktarlarını artırdığı gösterilmiştir (163). Fluoksetinin 1×10^{-4} M dozunda kaspaz 3 seviyesinde düşüşe neden olması ise bu dozda hücre ölümünün apoptozdan çok nekroz nedeni ile olabileceğini düşündürür. Çünkü yapılan çalışmalarda kaspaz 3 seviyesindeki artış ile apoptoz gerçekleştiği ortaya konmuştur (98). Nöronal hücre serisinde 1×10^{-5} M ve 5×10^{-5} M fluoksetin dozlarında NF- κ B düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı artışın olduğu gözlenmiştir. Ancak 1×10^{-4} M'lık fluoksetin uygulamasında ise NF- κ B düzeyinde anlamlı bir azalma vardır. Yine bu hücre serisinde hücre içi I κ B seviyesi de, NF- κ B seviyesi ile doğru orantılı olarak 1×10^{-5} M ve 5×10^{-5} M fluoksetin dozlarında istatistiksel olarak anlamlı azalma göstermiştir. I κ B- NF- κ B kompleksi IKK tarafından I κ B fosforillenerek ayrıldığı için fosforile I κ B miktarı artarken I κ B miktarında azalma gözlenir (137) NF- κ B yaşamsal bir proteindir ve stres durumunda uyarının ve hücrenin tipine göre artış veya azalma gösterebilir (126). Bu hücre ve uyarın tiplerinde NF- κ B'nin apoptozdan hücreyi korumak amacıyla arttığı düşünülmektedir. Zira birçok hücre tipinde de NF- κ B'nin miktarının artarak hücreyi apoptoza karşı korumaya çalıştığı gösterilmiştir (140). Bunun yanında yapılan bir çalışmada mikrogial hücre serisinde fluoksetinin NF- κ B'nin DNA'ya bağlanmasını 2 kata kadar artırdığı gözlenmiştir (164) .

Fluoksetinin glial hücrelerin yaşayabilirliği üzerindeki etkileri ise nöronlardan farklıdır. Glial hücrelerin nöronlara göre fluoksetinin etkilerine karşı daha dayanıklı oldukları gözlenmiştir. Hücre canlılığında anlamlı azalma 5×10^{-5} M dozunda gözlenmiştir. Yine glial hücrelerdeki kaspaz-3 miktarları ölçüldüğünde 1×10^{-5} M dozunda hücre içi kaspaz düzeyi istatistiksel olarak artmaya başlamış ve kaspaz miktarı 5×10^{-5} M dozunda pik yapmıştır. Kaspaz 3 seviyesi 1×10^{-4} M dozunda ise tekrar azalma göstermiştir. Fluoksetin nöronal hücrelerde olduğu gibi hücre içi kaspaz 8 seviyesinde herhangi bir değişime neden olmamıştır. Bu sonuçlara göre fluoksetinin 5×10^{-5} M ve 1×10^{-5} M dozlarında apoptozu nöroblastom hücre serisindeki gibi intrinsek yolaktan aktiflediği düşünülmektedir. Yine yapılan bir çalışmada glial hücre serisinde fluoksetinin stokrom c ve kaspaz 3 miktarını artırarak hücreyi intrinsek yolaktan apoptoza götürdüğü gösterilmiştir (163). Hücreler apoptoza uğradıklarında kaspaz 3 seviyeleri artış gözlenirken (98), 1×10^{-4} M dozunda kaspaz 3 miktarındaki azalma bu dozdan itibaren hücrelerde doz bağımlı olarak nekroz aracılı ölüm oluştuğunu düşündürür. Glial hücrelerdeki NF- κ B miktarları ölçüldüğünde ise NF- κ B düzeyindeki tek anlamlı artışın 1×10^{-6} M'lık fluoksetin dozunda olduğu görülmüştür. I κ B miktarları ölçüldüğünde ise I κ B düzeyinde 1×10^{-7} M, 1×10^{-6} M ve 1×10^{-5} M fluoksetin dozlarında anlamlı azalmaların olduğu gözlenmiştir. Bu dozlarda hücre sayısında ve yaşayabilirliğinde herhangi bir azalma gözlenmese de hücrenin strese girmiş olabileceği ve buna karşılık NF- κ B düzeyinin artmış olabileceği düşünülmektedir. NF- κ B düzeyinin hücre içinde artması apoptozisden koruyucu bir etki oluşturur (140). Ancak yapılan bazı çalışmalarda hipokampal nöronlarda ve PC12 hücrelerinde farklı uyarılarla hücre NF- κ B aracılı apoptoza gitmiştir (148-165). Dolayısı ile glial hücrelerdeki hücre ölümü bu doz ve sonrasında geliştiği için NF- κ B bu hücre serisinde apoptoza neden olmuş olabilir.

İmipramin;

İmipraminin çeşitli hücre tiplerinde hücre ölümünü artırdığı gösterilmiştir (166). Çalışmamızda imipraminin nöronal hücre serisi üzerindeki toksik etkileri yine fluoksetinde olduğu gibi 1×10^{-8} M seviyesinde başlamıştır. Kaspaz 3 seviyeleri de

yine aynı şekilde doz bağımlı artış göstermiştir. Yapılan çalışmalarda imipraminin kaspaz 3 seviyelerini artırarak hücreleri apoptoza götürdüğü gösterilmiştir (166). Kaspaz 8 seviyeleri ise kaspaz 3 seviyeleri ile orantılı olarak aynı dozlarda artış göstermiştir. Bu artışlar hücrenin ekstrensek apoptoz yolağını kullanarak apoptoza gitmiş olabileceğini düşündürür. Yapılan bir çalışmada rat hippokampal hücrelerine imipraminin uygulanmasının ardından kaspaz 8 proteinin gen ekspresyonunda önemli derecede artış olduğu saptanmıştır (167) ve; hücre dışı uyarılarla kaspaz 8'in artması ve sonuçta diğer kaspazların artışı ile hücrenin apoptoza sürüklendiği gösterilmiştir (99). İmipraminin hücre canlılığını azaltıcı etkisi birçok yayında gösterilmiştir. Ancak yapılan bazı çalışmalarda canlılıktaki azalmanın apoptoz değilde otofajik hücre ölümü gibi diğer, mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamış ölüm şekilleri ile olabileceği bulunmuştur (47). İmipramin ile uyarılmış nöroblastom hücre serisinde NF-κB düzeyinde ise anlamlı değişiklik 1×10^{-4} dozundan itibaren %60'lık azalma şeklinde olmuştur. İKB düzeyi ise yine orantılı olarak aynı dozlarda artış göstermiştir. Yapılan bir çalışmada astrosit hücre serisinde imipraminin 1×10^{-4} M dozunda p-İKB ve NF-κB düzeyini azalattığı gözlenmiştir (168). Yine yapılan bir başka çalışmada imipraminin NF-κB'nin DNA'ya bağlanmasını azalttığını gösterilmiştir (169). Primer nöron kültürlerinde yapılan çalışmalarda NF-κB'nin DNA'ya bağlanmasının azalmasıyla hücrenin gelişiminin durduğu ve hücrelerin apoptoza sürüklendiği gösterilmiştir (170-174).

İmipraminin glial kaynaklı hücre serisi üzerindeki toksik etkileri 5×10^{-4} M dozundan itibaren ortaya çıkmıştır. Yine bu dozlarda hücre içi kaspaz 3 ve kaspaz 8 seviyelerinde artış gözlenmiştir. Bu sonuçlar nöroblastom hücre serisinde olduğu gibi hücrelerin ekstrensek yoldan apoptoza gittiğini düşündürmüştür. Hücre içi NF-κB ve İKB düzeylerinde belirgin bir değişim gözlenmemiştir. Dolayısı ile imipramin aracılı hücre ölümünde NF-κB'nin olası bir etkisinin olduğu düşünülmemektedir.

Maprotilin;

Maprotilinin nöronal kaynaklı hücre serisi üzerindeki toksik etkileri 1×10^{-8} M seviyesinde başlamıştır ve daha sonraki dozlarda da devam etmiştir. Hücre

sayısındaki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu 1×10^{-7} M dozunda kaspaz 3 ve kaspaz 8 seviyelerinde artış gözlenmiştir. Bu artış 1×10^{-5} M maprotilin dozuna kadar devam etmiştir. Dolayısı ile bu doz aralığında hücrenin kaspaz 8 bağımlı ekstrensek yolak ile apoptoza uğradığı düşünülmüştür. Maprotilinin apoptotik etkisi ile ilgili yapılmış pek çok çalışma bulunmamakla birlikte bir çalışmada Neuro 2a hücre serisinde hücre canlılığında 1×10^{-5} M maprotilin dozundan itibaren azalma gözlenmiştir. Yine aynı çalışmada 2×10^{-5} M maprotilin dozundan itibaren kaspaz 3 seviyesinin arttığı belirlenmiştir (175). Bir başka çalışmada ise maprotilinin hücre içi Ca düzeyini artırarak hücreyi apoptoza sürüklediği gösterilmiştir (176). Ancak kaspaz 3 ve kaspaz 8 seviyelerinde ani düşmenin olduğu 1×10^{-5} M ve sonraki dozlarda ise hücrelerin doz bağımlı olarak nekroza gittiği düşünülmektedir. Yine hücre kaspaz seviyelerinin de azaldığı 1×10^{-5} dozundan itibaren NF- κ B seviyesinde azalma ve IKB seviyesinde artış görülmüştür.

Maprotilin, glial kaynaklı hücre serisi üzerinde, 1×10^{-8} , 1×10^{-7} ve 1×10^{-6} M dozlarında hücre canlılığı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı artışa neden olmuştur. Ancak 5×10^{-5} M dozunda hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı azalmaya neden olmuştur. Glial hücrelerde maprotilinin 1×10^{-5} dozundan itibaren kaspaz 3 ve kaspaz 8 seviyelerinde artış gözlenmiştir. Bu da hücrelerin bu dozlarda apoptoza gittiğini ve apoptozun da nöronal hücrelerde olduğu gibi ekstrensek yoldan olduğunu düşündürür. NF- κ B seviyesi de kaspaz seviyelerinin yüksek olduğu 5×10^{-5} M dozunda azalma göstermiştir. IKB seviyelerinde ise bu dozda artış bulunmuştur. Dolayısı ile NF- κ B'nin yaşamsal olarak gerekli bir madde olduğu ve azalmasının da apoptozu tetikleyici rol oynadığı düşünülür. Literatürde maprotilin ve NF- κ B seviyesi arasındaki ilişkiyi gösteren herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Yaptığımız çalışmada kullandığımız ilaçlarda hiçbiri subtoksik dozlarda hücre içi NF- κ B düzeyini azaltmamıştır. Ancak fluoksetin glioblastom hücrelerinde hücre için toksik olmayan 1×10^{-6} M dozunda NF- κ B seviyesi anlamlı derecede arttırmıştır. Yapılan bazı çalışmalarda beyinde apoptozis oluşturarak depresyona neden olan serbest oksijen radikalleri gibi maddelerin hücreyi uyarması sonucu NF- κ B'nin seviyesinin arttığı ve hücreyi apoptoza karşı korumaya çalıştığı gözlenmiştir (32-33).

Depresyon ile ilgili yapılan bazı çalışmalarda ise depresyonlu hastalarda NF- κ B düzeyleri yüksek bulunmuştur ve bu yüksekliğin depresyonun primer nedenlerinden biri olduğu düşünülmüştür (29-30-31). Bizim çalışmamızda ise imipramin uyarısı sonucunda hücrenin strese korunmak amacı ile NF- κ B düzeyini artırdığı düşünülmüştür.

Glioblastom ve nöroblastom gibi kanser türleri için kullanılan ajanlarda majör problem kan-beyin bariyerini ilaçların kolaylıkla aşamamalarıdır (177). İmipramin, maprotilin ve fluoksetin kan beyin bariyerini kolaylıkla geçebilen ve diğer kemoteropatik ajanlara göre de daha az toksik ajanlardır (34-177). Kanser tedavisi sırasında oluşabilecek depresyonun tedavisi amacı ile sıklıkla kullanılan bu ilaçlar, antikanser tedavilerde yardımcı ajan olarak da kullanılabilirler.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırmada fluoksetin, imipramin ve maprotilin ile oluşturulan apoptotik hücre ölümü histopatolojik (faz kontrast mikroskopisi), spektrofotometrik ölçüm (MTT testi ve Kaspaz-3, kaspaz-8 ELISA yöntemi), DNA fragmantasyonu ve histokimyasal boyama (anneksin V) ile, hücre içi NF- κ B ise spektrofotometrik ölçüm (NF- κ B ve IKB ELISA yöntemi) ile incelenmiştir.

Sonuçta;

1. Kontrol gruplarında olmayan apoptotik hücreler fluoksetin, imipramin ve maprotilin ile indüklenen gruplarda anlamlı düzeyde ortaya çıkmıştır.
2. Oluşan apoptozun doz bağımlı olduğu ve özellikle nöroblastom kaynaklı hücre serisinde bazı dozlardan itibaren nekrozun olduğunu gözlenmiştir.
3. Fluoksetin kaspaz 8'den bağımsız olarak kaspaz 3 seviyesini artırmıştır.

4. İmipramin ve maprotilindeki kaspaz 3 değişimleri kaspaz 8 ile doğru orantılıdır.
5. Fluoksetin nöral hücre serisinde toksik dozlarda, glial hücre serisinde ise subtoksik dozlarda NF-κB seviyesinde artışa neden olmuştur.
6. İmipramin ve maprotilin ise her iki hücre serisinde de NF-κB düzeylerinde azalmaya neden olmuştur.

7. KAYNAKLAR

- 1- Sibel Örsel ; Depresyonda Tedavi: Genel ilkeler ve Kullanılan Antidepresan ilaçlar, Klinik Psikiyatri 2004;Ek 4:17-24
- 2- Felker BL, Hedrick SC, Chaney FE ve ark. (2003) Identifying depressed patients with a high risk of comorbid anxiety in primary care. Prim Care Companion J Clin Psychiatry, 5:104-110.
- 3- Stahl MS (2000) Depression and Bipolar Disorders. Essential Psychopharmacology. Neuroscientific Basis and Practical Applications, 2. Baský, Cambridge University Press, s.135-199.
- 4- Yüksel N (2003) Antidepresan Ýlaçlar. Psikofarmakoloji. Ankara, Çizgi Týp Yayýnevi, s. 169-264.
- 5- Cryan, J.F., Holmes, A., 2005. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. Nature Reviews: Drug Discovery 4, 775–790
- 6- Kendler, K.S., Karkowski, L.M., Prescott, C.A., 1999. Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. The American Journal of Psychiatry 156, 837–841.
- 7- Pittenger, C., Duman, R.S., 2008. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. Neuropsychopharmacology 33, 88–109
- 8- Nemeroff, C.B., Vale, W.W., 2005. The neurobiology of depression: inroads to treatment and new drug discovery. The Journal of Clinical Psychiatry 66 (Suppl.7), 5–13
- 9- Anisman, H., Matheson, K., 2005. Stress, depression, and anhedonia: caveats concerning animal models. Neuroscience and Biobehavioral Reviews 29, 525–546

- 10-** Van Praag, H.M., 2004. Can stress cause depression? *Progress in Neuro-psycho-pharmacology & Biological Psychiatry* 28, 891–907
- 11-** Charney, D.S., Manji, H.K., 2004. Life stress, genes, and depression: multiple pathways lead to increased risk and new opportunities for intervention. *Science's STKE* 2004, re5.
- 12-** Tafet, G.E., Bernardini, R., 2003. Psychoneuroendocrinological links between chronic stress and depression. *Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry* 27, 893–903.
- 13-** Pariante, C.M., 2003. Depression, stress and the adrenal axis. *Journal of Neuroendocrinology* 15, 811–812
- 14-** Gould, T.D., Manji, H.K., 2005. Glycogen synthase kinase-3: a putative molecular target for lithium mimetic drugs. *Neuropsychopharmacology* 30, 1223–1237
- 15-** Bremner, J.D., Narayan, M., Anderson, E.R., Staib, L.H., Miller, H.L., Charney, D.S., 2000. Hippocampal volume reduction in major depression. *The American Journal of Psychiatry* 157, 115–118
- 16-** Frodl, T., Meisenzahl, E.M., Zetzsche, T., Born, C., Groll, C., Jager, M., Leinsinger, G., Bottlender, R., Hahn, K., Moller, H.J., 2002. Hippocampal changes in patients with a first episode of major depression. *The American Journal of Psychiatry* 159, 1112–1118
- 17-** MacQueen, G.M., Campbell, S., McEwen, B.S., Macdonald, K., Amano, S., Joffe, R.T., Nahmias, C., Young, L.T., 2003. Course of illness, hippocampal function, and hippocampal volume in major depression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 1387–1392
- 18-** Drevets, W.C., Price, J.L., Simpson Jr., J.R., Todd, R.D., Reich, T., Vannier, M., Raichle, M.E., 1997. Subgenual prefrontal cortex abnormalities in mood disorders. *Nature* 386, 824–827.

19- Rajkowska, G., 2000. Postmortem studies in mood disorders indicate altered numbers of neurons and glial cells. *Biological Psychiatry* 48, 766–777

20- Czeh, B., Lucassen, P.J., 2007. What causes the hippocampal volume decrease in depression? Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated?. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 257, 250–260

21- Lucassen, P.J., Muller, M.B., Holsboer, F., Bauer, J., Holtrop, A., Wouda, J., Hoogendijk, W.J., De Kloet, E.R., Swaab, D.F., 2001. Hippocampal apoptosis in major depression is a minor event and absent from subareas at risk for glucocorticoid overexposure. *American Journal of Pathology* 158, 453–468

22- Declan P. McKernan, Timothy G. Dinan, John F. Cryan. “Killing the Blues”: A role for cellular suicide (apoptosis) in depression and the antidepressant response?; *Neurobiology* 88 (2009) 246–263

23- Dwivedi, Y., Rizavi, H.S., Roberts, R.C., Conley, R.C., Tamminga, C.A., Pandey, G.N., 2001. Reduced activation and expression of ERK1/2 MAP kinase in the post-mortem brain of depressed suicide subjects. *Journal of Neurochemistry* 77, 916–928.

24- Paul J. Lucassen, Vivi M. Heine, Marianne B. Muller, Eline M. van der Beek, Victor M. Wiegant, E. Ron De Kloet, Marian Joels, Eberhard Fuchs, Dick F. Swaab and Boldizsar Czeh, *Stress, Depression and Hippocampal Apoptosis, CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 2006, 5, 531-546

25- Sweatt, J.D., 2004. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Current Opinion in Neurology* 14, 311–317

26- Duman, C.H., Schlesinger, L., Kodama, M., Russell, D.S., Duman, R.S., 2007. A role for MAP kinase signaling in behavioral models of depression and antidepressant treatment. *Biological Psychiatry* 61, 661–670.

27- Ley, R., Ewings, K.E., Hadfield, K., Cook, S.J., 2005. Regulatory phosphorylation of Bim: sorting out the ERK from the JNK. *Cell Death and Differentiation* 12, 1008–1014

28- Harlan, J., Chen, Y., Gubbins, E., Mueller, R., Roch, J.M., Walter, K., Lake, M., Olsen, T., Metzger, P., Dorwin, S., Lador, U., Egan, D.A., Severin, J., Johnson, R.W., Holzman, T.F., Voelp, K., Davenport, C., Beck, A., Potter, J., Gopalakrishnan, M., Hahn, A., Spear, B.B., Halbert, D.N., Sullivan, J.P., Abkevich, V., Neff, C.D., Skolnick, M.H., Shattuck, D., Katz, D.A., 2006. Variants in Apaf-1 segregating with major depression promote apoptosome function. *Molecular Psychiatry* 11, 76–85.

29- Kumar A, Takada Y, Boriek AM, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *J Mol Med* 2004;82:434–48

30- Ryan J. Van Lieshout, John Bienenstock, Glenda M. MacQueen, A Review of Candidate Pathways Underlying the Association Between Asthma and Major Depressive Disorder. *Psychosomatic Medicine* February/March 2009 vol. 71 no. 2 187-195

31- Bethea CL, Reddy AP, Smith LJ. Nuclear factor kappa B in the dorsal raphe of macaques: an anatomical link for steroids, cytokines and serotonin. *J Psychiatry Neurosci* 2006;31:105–14.

32- M. Mattson NF-kappaB in the survival and plasticity of neurons *Neurochem Res*, 30 (2005), pp. 883–893

33- Elisa Brietzke, Flávio Kapczinski TNF-A as a molecular target in bipolar disorder *Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 32 (2008) 1355–1361

34- Kayaalp

35- Depresyonda Tedavi: Genel ilkeler ve Kullanılan Antidepresan ilaçlar, Sibel Örsel *Klinik Psikiyatri* 2004;Ek 4:17-24.

36- Licinio J, Wong ML. Back to where it all started: monoamines and behavior--from drug responses to genes. *Mol Psychiatry*. 2004 May;9(5):427

37- Manji HK, Drevets WC, Charney DS The cellular neurobiology of depression. *Nat Med*. 2001 May;7(5):541-7

- 38-** Krishnan V, Nestler EJ The molecular neurobiology of depression. *Nature*. 2008 Oct 16;455(7215):894-902. doi: 10.1038/nature07455
- 39-** G. Racagni, M. Popoli, The pharmacological properties of antidepressants, *Int. Clin. Psychopharmacol.* 25 (2010) 117–131.
- 40-** J. Tuomisto, E. Tukiainen, R. Voutilainen, P. Tuomainen, Inhibition of 5-hydroxytryptamine and noradrenaline uptake in platelets and synaptosomes
- 41-** P.J. Tutton, D.H. Barkla, Influence of inhibitors of serotonin uptake on intestinal epithelium and colorectal carcinomas, *Br. J. Cancer* 46 (1982) 260–265.[23]
- 42-** C. Sauter, Cytostatic activity of commonly used tricyclic antidepressants, *Oncology* 46 (1989) 155–157.[24]
- 43-** S. Merry, T.G. Hamilton, P. Flanigan, R.I. Freshney, S.B. Kaye, Circumvention of pleiotropic drug resistance in subcutaneous tumours in vivo with verapamil and clomipramine, *Eur. J. Cancer* 27 (1991) 31–34.[25]
- 44-** A. Serafeim, M.J. Holder, G. Grafton, A. Chamba, M.T. Drayson, Q.T. Luong, C.M. Bunce, C.D. Gregory, N.M. Barnes, J. Gordon, Selective serotonin reuptake inhibitors directly signal for apoptosis in biopsy-like Burkitt lymphoma cells, *Blood* 101 (2003) 3212–3219.[26]
- 45-** H. Arimochi, K. Morita, Characterization of cytotoxic actions of tricyclic antidepressants on human HT29 colon carcinoma cells, *Eur. J. Pharmacol.* 541(2006) 17–23.
- 46-** J. Zschocke, N. Zimmermann, B. Berning, V. Ganal, F. Holsboer, T. Rein, Antidepressant drugs diversely affect autophagy pathways in astrocytes and neurons – dissociation from cholesterol homeostasis, *Neuropsychopharmacology* 36 (2011) 1754–1768

47- The tricyclic antidepressant imipramine induces autophagic cell death in U-87MG glioma cells. Seung-Hyun Jeon, Se Hyun Kim, Yeni Kim, Yong Sik Kim, Yoongho Lim, Young Han Lee, Soon Young Shin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 413 (2011) 311–317

48- Fuller RW, Wong DT, Robertson DW. Fluoxetine, a selective inhibitor of serotonin uptake. *Med Res Rev* 1991;11:17-34. 2.

49- Wong DT, Bymaster FP, Engleman EA. Prozac (fluoxetine, Lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: twenty years since its first publication. *Life Sci* 1995;57:411-441.

50 - Vaswani M, Linda FK, Ramesh S. Role of selective serotonin reuptake inhibitors in psychiatric disorders: a comprehensive review. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003;27:85-102

51- . Nibuya M, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. *J Neurosci* 1996;16:2365-2372.

52- Chiou SH, Chen SJ, Peng CH, Chang YL, Ku HH, Hsu WM, et al. Fluoxetine up-regulates expression of cellular FLICE-inhibitory protein and inhibits LPS-induced apoptosis in hippocampus-derived neural stem cell. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;343:391-400.

53- Reagan LP, Hendry RM, Reznikov LR, Piroli GG, Wood GE, McEwen BS, et al. Tianeptine increases brain-derived neurotrophic factor expression in the rat amygdala. *Eur J Pharmacol* 2007;565:68-75.

54- Reiersen GW, Mastronardi CA, Licinio J, Wong ML. Repeated antidepressant therapy increases cyclic GMP signaling in rat hippocampus. *Neurosci Lett* 2009;466:149-153.)

55- (Krishnan A, Hariharan R, Nair SA, Pillai MR. Fluoxetine mediates G0/G1 arrest by inducing functional inhibition of cyclin dependent kinase subunit (CKS)1. *Biochem Pharmacol* 2008;75 :1924–34.

56- Stepulak A, Rzeski W, Sifringer M, Brocke K, Gratopp A, Kupisz K et al. Fluoxetine inhibits the extracellular signal regulated kinase pathway and suppresses growth of cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2008;7:1685–93.)

57- Serafeim A, Holder MJ, Grafton G, Chamba A, Drayson MT, Luong QT et al. Selective serotonin reuptake inhibitors directly signal for apoptosis in biopsy-like Burkitt lymphoma cells. *Blood* 2003;101:3212–9.

58- Levkovitz Y, Gil-Ad I, Zeldich E, Dayag M, Weizman A. Differential induction of apoptosis by antidepressants in glioma and neuroblastoma cell lines: evidence for p-c-Jun, cytochrome c, and caspase-3 involvement. *J Mol Neurosci* 2005; 27 :29–42.)

59- spanova A, Kovaru , H, Lisa V, Lukasova E (1997) Estimation of apoptosis in C6 glioma cells treated with antidepressants. *Physiol. Res.*, 46.161-164)

60- Post A, Crochemore C, Uhr M, Holsboer F, Behl C. Differential induction of NF- κ B activity and neural cell death by antidepressants in vitro . *Eur J Neurosci* 2000; 12 :4331–7

61- BartholomP, Erlandsson N, Kaufmann K, Rçssler OG, Bau-mann B, Wirth T et al. Neuronal cell death induced by antidepressants: lack of correlation with Egr-1, NF- κ B and extracellular signal-regulated protein kinase activation. *Biochem Pharmacol* 2002;63 :1507–16

62- Seong joon Koh, Junj Mogg Kim, In-Kyoung Kim, Noyoung Kim, Hyun Chae Jung, In Sung Song, Joo Sung Kim Am J fluoksetin inhibits nf- κ b signaling in intestinal epithelial cells and ameliorates experimental colitis and colitis-associated colon cancer in mice. *Physiol Gastrointest Liver Physiol* 301: G9- G19, 2011

63- Li, S.W., Yan, H.Q., 1989. Maprotiline (Ludiomil) treatment of mental depression—a clinical report of 65 cases. *Proc. Chin. Acad. Med. Sci. Peking Union Med. Coll.* 4, 139–141

64- Maitre, L., Waldmeier, P.C., Baumann, P.A., Staehelin, M., 1974. Effect of maprotiline, a new antidepressant drug, on serotonin uptake. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 10, 297–304.

65- Baumann, P.A., Maitre, L., 1979. Neurobiochemical aspects of maprotiline (Ludiomil) action. *J. Int. Med. Res.* 7, 391–400

66- Ferrari, D., Pinton, P., Szabadkai, G., Chami, M., Campanella, M., Pozzan, T., Rizzuto, R., 2002. Endoplasmic reticulum, Bcl-2 and Ca²⁺ handling in apoptosis. *Cell Calcium* 32, 413–420.

67- Hsu, S.S., Chen, W.C., Lo, Y.K., Cheng, J.S., Yeh, J.H., Cheng, H.H., Chen, J.S., Chang, H.T., Jiann, B.P., Huang, J.K., Jan, C.R., 2004. Effect of maprotiline on Ca²⁺ movement in human neuroblastoma cells. *Life Sci.* 75, 1105–1112.

68- Mechanism of maprotiline-induced apoptosis: Role of [Ca²⁺]_i, ERK, JNK and caspase-3 signaling pathways Chung-Ren Jana, Jian-An Sub,c, Chih-Chuan Tengd,e,f, Meei-Ling Sheug,h, Paul-Yann Lini, Miao-Ching Chie,j, Chia-Hao Changd,e, Wayne C. Liaod,e, Chun-Chi Kuok, Chiang-Ting Choud,e,* *Toxicology* 304 (2013) 1– 12

69- Okada H, Mak TW; Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells; *Nat Rev Cancer.* 2004 Aug;4(8):592-603

70- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G; Nomenclature Committee on Cell Death 2009. 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.*

71- Dive, C., Gregory, C. D., Phipps, D. J., Evans, D. L., Milner, A. E., Wyllie, A. H., *Analyses and Discrimination of necrosis and Apoptosis (Programmed*

Cell Death) by Multiparameter Flow Cytometry, *Biochimica et Biophysica*, 1992; 1133, 275-285

72- Brenner S; The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 1974 May;77(1):71-94.

73- Fauser BCJM, Rutherford AJ, Strauss JF, Van A. *Molecular biology in reproductive medicine*; Parthenon Publishing Group Inc. New York. 1th Edition, 1999; 80-87

74. Thompson CB. Apoptosis. In: Paul WE, ed. *Fundamental Immunology*. Lippincott-Raven Publishers, 1999.

75. Wyllie AH, Duvall E. Cell death. *Oxford Textbook of Pathology*, vol 1. USA, Oxford University Press 1992; 142-147.

76- Ellis HM, Horvitz HR; Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*. 1986 Mar 28;44(6):817-29

77- Hengartner MO, Ellis RE, Horvitz HR; *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature*. 1992 Apr 9;356(6369):494-9.)

78- Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):205-19.

79- Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today* 1993; 14: 126-130.

80- Li GL, Brodin G, Farooque M, Funa K, Holtz A, Wang WL, Olsson Y. Apoptosis and expression of Bcl-2 after compression trauma to rat spinal cord. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55: 280-289.

81- Wyllie AH, Kerr J.F.R., Currie A.R. Cell death: The significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 1980; 68: 251-306.

82- Zurita M, Vaquero J. Presence and significance of CD-95 (Fas/APO1) expression after spinal cord injury. *J Neurosurg.* 2001; Apr;94(2 Suppl):257-64.

- 83** Bellamy CO, Malcomson RD, Harrison DJ, Wyllie AH. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Cancer Biology*, 1995; 6: 3-16.
- 84-** Jacobson MD. Programmed cell death: a missing link is found. *Trends Cell Biol.* 1997 Dec;7(12):467-9
- 85-** Jenner P, Olanow CW. Understanding cell death in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 1998 Sep;44(3 Suppl 1):S72-84.
- 86-** Kim M, Velier J, Chase K, Laforet G, Kalchman MA, Hayden MR, Won L, Heller A, Aronin N, Difiglia M. Forskolin and dopamine D1 receptor activation increase huntingtin's association with endosomes in immortalized neuronal cells of striatal origin. *Neuroscience.* 1999;89(4):1159-67
- 87-** Gurney ME. Transgenic-mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med.* 1994 Dec 22;331(25):1721-2.
- 88-** Lipton P Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev.* 1999 Oct;79(4):1431-568. Review.
- 89-** Yakovlev AG, Faden AI. Caspase-dependent apoptotic pathways in CNS injury. *Mol Neurobiol.* 2001 Aug-Dec;24(1-3):131-44. Review.
- 90-** Bengzon J, Kokaia Z, Elmér E, Nanobashvili A, Kokaia M, Lindvall O. Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Sep 16;94(19):10432-7.
- 91-** Cummings MC, Winterford CM, Walker NI. Apoptosis. *Am J Surg Pathol.* 1997; 21: 88-101.
- 92-** Zhang Y, Bhavnani BR. Glutamate-induced apoptosis in neuronal cells is mediated via caspase-dependent and independent mechanisms involving calpain and caspase-3 proteases as well as apoptosis inducing factor (AIF) and this process is inhibited by equine estrogens. *BMC Neurosci.* 2006; Jun 15;7:49.

93- Norberg E, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF). *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 396: 95-100.

94- Palmer AM, Greengrass PM, Cavalla D. The role of mitochondria in apoptosis. *Society for Medicines Research. Drug News Perspect.* 2000; Aug;13(6):378-84.

95- Pollack M, Leeuwenburgh C. Apoptosis and aging: role of the mitochondria. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2001; Nov;56(11):B475-82.

96- Nakatsuka H, Ohta S, Tanaka J, Toku K, Kumon Y, Maeda N, Sakanaka M, Sakaki S. Release of cytochrome c from mitochondria to cytosol in gerbil hippocampal CA1 neurons after transient forebrain ischemia. *Brain Research,* 1999; 849: 216-219.

97- Elizabeth C. Ledgerwood and Ian M. Morison. Targeting the Apoptosome for Cancer Therapy. *Clin Cancer Res.* 2009;15:420-424.

98- Nagase H, Fukuyama H, Tanaka M, Kawane K and Nagata S. Mutually regulated expression of caspase-activated DNase and its inhibitor for apoptotic DNA fragmentation. *Cell Death and Differentiation.* 2003; 10, 142–143.

99- Micheau O, Thome M, Schneider P, Holler N, Tschopp J, Nicholson DW, Briand C, Grütter MG. The Long Form of FLIP Is an Activator of Caspase-8 at the Fas Death-inducing Signaling Complex. *J Biol Chem.* 2002; Nov 22;277(47):45162-71.

100- Ittner LM, Gotz J. Amyloid-beta and tau—a toxic pas de deux in Alzheimer’s disease. *Nat Rev Neurosci.* 2011; 12:65–72. [PubMed: 21193853]

101- Imai Y, Soda M, Takahashi R. Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. *J Biol Chem.* 2000; 275:35661–64. [PubMed: 10973942]

102- Atkin JD, Farg MA, Walker AK, et al. Endoplasmic reticulum stress and induction of the unfolded protein response in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis.* 2008; 30:400–7.[PubMed: 18440237]

103- Boden G, Duan X, Homko C, et al. Increase in endoplasmic reticulum stress-related proteins and genes in adipose tissue of obese, insulin-resistant individuals. *Diabetes.* 2008; 57:2438–44. [PubMed: 18567819]

104- Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell.* 2011; 145:341–55. [PubMed: 21529710]

105- Nakamura K, Bossy-Wetzell E, Burns K, Fadel MP, Lozyk M, Goping IS, Opas M, Bleackley RC, Green DR, Michalak M. Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis. *J Cell Biol,* 2000; 150: 731-740.

106- Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, del Rio G, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: mechanism of caspase activation. *J Biol Chem,* 2001; 276: 869-874.

107- Earnshaw WC. Nuclear changes in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol,* 1995; 7: 337-43

108- Eastman A. Survival factors, intranuclear signal transduction and the activation of endonucleases in apoptosis. *Cancer Biology,* 1995; 6: 45-52.

109- Balakumran A, Campbell GA, Maslen MT. Calcium channel blockers induce thymic apoptosis in vivo in rats. *Toxicol Appl Pharmacol,* 1996; 139: 122-127.

110- Collins JA, Cynthia CA, Young KK, Vesely JM. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J Histochem Cytochem,* 1997; 45: 923-934.

111- Cohen JJ. Apoptosis: The physiological pathway of cell death. *Hosp Pract* 1993; 15: 35-43.

- 112-** Bortner CD, Odernburg NBE, Crdlowski JA. The role of fragmentation in apoptosis. *Trends in Cell Biology*, 1995. 5: 21-28.
- 113-** Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 1980; 284: 555-556.
- 114-** Lu J, Ashwell K, Ken WS, Waite P. Advances in spinal cord injury: Role of Apoptosis. *Spine*, 2000; 25: 1859-1866.
- 115-** Majno G, Torisl A. Apoptosis oncosis and necrosis. *Am J Pathol*, 1995; 146: 3-15.
- 116-** Cummings MC, Winterford CM, Walker NI. Apoptosis. *Am J Surg Pathol*. 1997; 21: 88-101.
- 117-** Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 1986;47:921-8
- 118-** Huxford T, Huang DB, Malek S, Ghosh G. The crystal structure of the I κ B α /NF- κ B complex reveals mechanisms of NF- κ B inactivation. *Cell*. 1998;95(6):759-70.
- 119-** Jacobs MD, Harrison SC. Structure of an I κ B α /NF- κ B complex. *Cell*. 1998;95(6):749-58.
- 120-** Sen R, Baltimore D. Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. *Cell*. 1986;47(6):921-28.
- 121-** collins T., Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: Nf-kb and cytokine inducible enhancers *FASEB J* 1995; 9: 899-909
- 122-** Toubi E, Shoenfeld Y. Toll-like receptors and their role in the development of autoimmune diseases. *Autoimmunity*. 2004;37(3):183-88
- 123-** Bassères DS, Baldwin AS. Nuclear factor- κ B and inhibitor of κ B kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene*. 2006;25(51):6817-30

124- Courtois G, Gilmore TD. Mutations in the NF- κ B signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene*. 2006;25(51):6831–43

125- A single NF κ B system for both canonical and non-canonical signaling. Vincent Feng-Sheng Shih, Rachel Tsui, Andrew Caldwell, Alexander Hoffmann. *Cell Research* (2011) 21:86-102

126- Margaret Barkett, Thomas d gilmore. control of apoptosis by Rel/Nfkb transcription factors.. *Oncogene* (1999 18, 6910-6924.

127- Gilmore TD (2006). "Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives". *Oncogene* 25 (51): 6680–4.doi:10.1038/sj.onc.1209954. PMID 17072321.

128- Brasier AR (2006). "The NF- κ B regulatory network".*Cardiovasc. Toxicol.* 6 (2): 111–30. doi:10.1385/CT:6:2:111.PMID 17303919.

129- Perkins ND (January 2007). "Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function". *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8(1): 49–62. doi:10.1038/nrm2083. PMID 17183360

130- <http://en.wikipedia.org/wiki/NF-%CE%BAB>

131- http://www.nature.com/nrc/journal/v2/n4/box/nrc780_BX1.html

132- Johanna Napetschnig and Hao Wu; Molecular Basis of NF- κ B Signaling; *Annu Rev Biophys.* 2013 May 6; 42: 443–468

133- Vincent Feng-Sheng Shih, Rachel Tsui, Andrew Caldwell, Alexander Hoffmann. A single NF κ B system for both canonical and non-canonical signaling. *Cell Research* (2011) 21:86-102

134- amin RH, Schlissel MS,. Nfkb comes home.*Immunity* 2005; 22:401-2

135- Scheidereit C. IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription. *Oncogene* 2006; 25:6685-6705

136- Tergaonkar V. Nfkb pathway. A good signaling paradigm and therapeutic target. *Int J Biochem cell Biol* 2006;38:1647-53

137- Perkins ND, Gilmore TD. Good cop, Bad cop: different faces of NF- κ B. *Death and differentiation* 2006;13:759-72

138- www1.imperial.ac.uk

139- www.mdcberlin.de/34804647/de/phd_ausbildung/phd_program

[/People/Faculty/Faculty_info/Research_Groups/Wolf](#)

140- Wu M, Lee H, Bellas RE, Schauer SL, Arsur M, Katz D, FitzGerald MJ, Rothstein TL, Sherr DH, Sonenshein GE. Inhibition of NF- κ B/Rel induces apoptosis of murine B cells; *EMBO J.* 1996 Sep 2;15(17):4682-90

141- Grumont RJ, Rourke IJ, O'Reilly LA, Strasser A, Miyake K, Sha W and Gerondakis S. (1998). *J. Exp. Med.*, 187, 1-12

142- Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Baeuerle PA. 1993. Brain synapses contain inducible forms of the transcription factor NF- κ B. *Mech Dev* 43: 135 – 147.

143- Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Neumann H, Wekerle H, Baeuerle PA. 1994. Constitutive NF- κ B activity in neurons. *Mol Cell Biol* 14:3981 – 3992.

144- Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Baeuerle PA. 1995. Stimulation of ionotropic glutamate receptors activates transcription factor NF- κ B in primary neurons. *Proc Natl Acad Sci* 92: 9618 – 9622.

145- Lilienbaum A, Israel A. 2003. From calcium to NF- κ B signaling pathways in neurons. *Mol Cell Biol* 23:2680 – 2698

146- Meffert MK, Chang JM, Wiltgen BJ, Fanselow MS, Baltimore D. 2003. NF- κ B functions in synaptic signaling and behavior. *Nat Neurosci* 6:1072 – 1078

147- NF κ B in the Nervous System Barbara Kaltschmidt and Christian Kaltschmidt *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009;1:a001271

148- Clemens JA, Stephenson DT, Dixon EP, Smalstig EB, MincyRE, Rash KS and Little SP. (1997). *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 48, 187 ± 196.

149- Clemens JA, Stephenson DT, Yin T, Smalstig EB, Panetta JA and Little SP. (1998). *Stroke*, 29, 677 ± 682., Grilli M, Pizzi M, Memo M and Spano PF. (1996). *Science*, 274, 1383 ± 1385.

150- Grimm S, Bauer MKA, Baeuerle PA and Schulze-Osthoff K. (1996). *J. Cell Biol.*, 134, 13 ± 23

151- Grilli M, Pizzi M, Memo M and Spano PF. (1996). *Science*, 274, 1383 ± 1385.

152- Grimm S, Bauer MKA, Baeuerle PA and Schulze-Osthoff K. (1996). *J. Cell Biol.*, 134, 13 ± 23

153- Lin Y-Z, Yao SY, Veach RA, Torgerson TR and Hawiger J. (1995b). *J. Biol. Chem.*, 270, 14255 ± 14258.

154- Schneider A, Martin-Villalba A, Weih F, Vogel J, Wirth T and Schwaninger M. (1999). *Nature Med.*, 5, 554 ± 559

155- Guo Q, Robinson N and Mattson MP. (1998). *J. Biol. Chem.*, 273, 12341 ± 12351

156- Zhang G, Gurtu V, Kain SR, Yan G. Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V. *Biotechniques*. 1997;13:525–531.

157- Else Dapat, Sonia Jacinto, and Thomas Efferth. A phenolic ester from *Aglaia loheri* leaves reveals cytotoxicity towards sensitive and multidrug-resistant cancer cells. *BMC Complement Altern Med*. 2013; 13: 286.

158- Liao PC, Lieu PC (2005) Cell cycle specific induction of apoptosis and necrosis by paclitaxel in the leukemic U937 cells. *Life Sci* 76: 1623-1639.

159- Jay D. Amsterdam, M.D., Jan Fawcett, M.D., Frederic M. Quitkin, M.D., Frederick W. Reimherr, M.D., Jerrold F. Rosenbaum, M.D., David Michelson,

M.D., Mady Hornig-Rohan, M.D., and Charles M. Beasley, M.D. Fluoxetine and Norfluoxetine Plasma Concentrations in Major Depression: A Multicenter Study, *Am J Psychiatry* 154:7, July 1997

160- Karson CN, Newton JE, Livingston R, Jolly JB, Cooper TB, Sprigg J, Komoroski RA (Human brain fluoxetine concentrations, *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* 1993;5:322-329,

161- Andrzej Stepulak, Wojciech Rzeski, Marco Sifringer, Katja Brocke, Alexander Gratopp, Krzysztof Kupisz, Lechoslaw Turski and Chrysanthy Ikonomidou. Fluoxetine inhibits the extracellular signal regulated kinase pathway and suppresses growth of cancer cells *Cancer Biology & Therapy* 7:10, 1685-1693; October 2008]; ©2008 Landes Bioscience

162- Serafeim A, Holder MJ, Grafton G, Chamba A, Drayson MT, Luong QT et al. Selective serotonin reuptake inhibitors directly signal for apoptosis in biopsy-like Burkitt lymphoma cells. *Blood* 2003;101:3212–9.

163- Levkovitz Y, Gil-Ad I, Zeldich E, Dayag M, Weizman A. Differential induction of apoptosis by antidepressants in glioma and neuroblastoma cell lines: evidence for p-c-Jun, cytochrome c, and caspase-3 involvement. *J Mol Neurosci* 2005; 27 :29–42.)

164- Eunyoung Haa, Kyung Hee Jungb, Bong-Keun Choec, Jae-Hoon Baed, Dong-Hoon Shine, Sung-Vin Yimb, Hyung Hwan Baika. Fluoxetine increases the nitric oxide production via nuclear factor kappa B-mediated pathway in BV2 murine microglial cells *Neuroscience Letters* 397 (2006) 185–189

165- Draczynska-Lusiak B, Chen YM, Sun AY. Oxidized lipoproteins activate NF-kappaB binding activity and apoptosis in PC12 cells. *Neuroreport*. 1998 Feb 16;9(3):527-32.

166- Xia Z, Bergstrand A, DePierre JW, Nässberger L The antidepressants imipramine, clomipramine, and citalopram induce apoptosis in human acute myeloid

leukemia HL-60 cells via caspase-3 activation. *J Biochem Mol Toxicol.* 1999;13(6):338-47.

167- Lee JH, Ko E, Kim YE, Min JY, Liu J, Kim Y, Shin M, Hong M, Bae H; Gene expression profile analysis of genes in rat hippocampus from antidepressant treated rats using DNA microarray. *BMC Neurosci.* 2010 Nov 30;11:152. doi: 10.1186/1471-2202-11-152.

168- Lee YH, Kim SH, Kim Y, Lim Y, Ha K, Shin SY; Inhibitory effect of the antidepressant imipramine on NF- κ B-dependent CXCL1 expression in TNF α -exposed astrocytes. *Int Immunopharmacol.* 2012 Apr;12(4):547-55. doi: 10.1016/j.intimp.2012.01.011. Epub 2012 Feb 8

169- Yang J, Qu JM, Summah H, Zhang J, Zhu YG, Jiang HN. Protective effects of imipramine in murine endotoxin-induced acute lung injury. *Eur J Pharmacol.* 2010 Jul 25;638(1-3):128-33. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.04.005. Epub 2010 Apr 18

170- Bhakar AL, Tannis LL, Zeindler C, Russo MP, Jobin C, Park DS, MacPherson S & Barker PA. Constitutive nuclear factor-kappa B activity is required for central neuron survival. *J Neurosci* 22, 8466–8475

171- Maggirwar SB, Sarmiere PD, Dewhurst S & Freeman RS. Nerve growth factor-dependent activation of NF-kappaB contributes to survival of sympathetic neurons. *J Neurosci* 18, 10356–10365.

172- Middleton G, Hamanoue M, Enokido Y, Wyatt S, Pennica D, Jaffray E, Hay RT & Davies AM. Cytokine-induced nuclear factor kappa B activation promotes the survival of developing neurons. *J Cell Biol* 148, 325–332.

173- Koulich E, Nguyen T, Johnson K, Giardina C & D'mello S. NF-kappaB is involved in the survival of cerebellar granule neurons: association of IkappaBbeta [correction of Ikappabeta] phosphorylation with cell survival. *J Neurochem* 76, 1188–1198

174- Chiarugi A. Characterization of the molecular events following impairment of NF-kappaB-driven transcription in neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 109,179–188

175- Jan CR, Su JA, Teng CC, Sheu ML, Lin PY, Chi MC, Chang CH, Liao WC, Kuo CC, Chou CT. Mechanism of maprotiline-induced apoptosis: role of $[Ca^{2+}]_i$, ERK, JNK and caspase-3 signaling pathways. *Toxicology*. 2013 Feb 8;304:1-12. doi: 10.1016/j.tox.2012.11.013. Epub 2012 Dec 3

176- Wei-Chuan Liao, Chorng-Chih Huang, Yih-Chau Lu, Chao-Chuan Chi, Sau-Tung Chu, Hsing-Hao Su, Chun-Chi Kuo, Jin-Shiung Cheng, Li-Ling Tseng, Chin-Man Ho, and Chung-Ren Jan; Maprotiline-Induced Ca Fluxes and Apoptosis in Human Osteosarcoma Cells, *Drug Development Research* 71:268–274 (2010)

177- L.L. Muldon, C. Soussain, K. Jahnke, C. Johanson,, Chemotherapy delivery issues in central nervous system malignency: a reslity check. *Jclin. Oncol.* 25 (2007)2295-2305