

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

TRİMETAZİDİN'İN NÖRONAL VE GLİAL HÜCRELER
ÜZERİNDEKİ MUHTEMEL NÖROPROTEKTİF VE
NÖRODEJENERATİF POTANSİYELİNİN BELİRLENMESİ

Dr. Recep BAYRAM

UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı:
Prof. Dr. Akçahan GEPDİREMEN

BOLU
2012

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

**TRİMETAZİDİN'İN NÖRONAL VE GLİAL HÜCRELER ÜZERİNDEKİ
MUHTEMEL NÖROPROTEKTİF VE NÖRODEJENERATİF
POTANSİYELİNİN BELİRLENMESİ**

Dr. Recep BAYRAM

UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Akçahan GEPDİREMEN

BOLU

2012

**Bu Tez, Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından “2011.08.03.445” proje numarası ile desteklenmiştir.**

Uzmanlık eğitimim sürecinde bilgi, deneyim ve yardımlarından yararlandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Akçahan Gepdiremen başta olmak üzere Doç. Dr. Özge Uzun ve Yrd. Doç. Dr. Zeynep Güneş Özünal'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim süresince benimle canı gönülden arkadaşlık yapan ve yardımlarını esirgemeyen değerli bölüm arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Muhsine Zeynep Yavuz'a, Biyolog Ayşenur Aydoğar'a ve Biyolog Ali Ucbek'e samimi arkadaşlıklarından ötürü çok minnettar olduğumu iletir ve teşekkürlerimi sunarım.

Manevi desteği ile bütün sıkıntılara katlanan ve her zaman yanımda olan Eşim Emine Bayram, Oğlum Fatih Han Bayram ve Kardeşim Şaban Bayram'a sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Recep Bayram

ÖZET

Trimetazidin'in Nöronal ve Glial Hücreler Üzerindeki Muhtemel Nöroprotektif ve Nörodejeneratif Potansiyelinin Belirlenmesi

Trimetazidin, anti-iskemik ve anti-anjinal bir ajandır. Baş dönmesi, kulak çınlaması gibi endikasyonlarda kullanılan Trimetazidin'in (TMZ) mitokondrial stabilizatör olduğu ve aynı zamanda hipoksi veya iskemi durumlarında yağ asidi oksidasyonunu engelleyerek hücre içi ATP (Adenozin trifosfat) seviyesinin düşüşünü önlediği bilimsel çalışmalarla gösterilmiştir. Genellikle hücreleri hipoksik koşullardan koruyan maddelerin nöroprotektif etki de gösterebileceği bilinmektedir. TMZ'nin kulak çınlaması gibi sensörinöral rahatsızlıklarda yararlı etkilerinin olduğu fark edildiği gibi aksine santral sinir sistemi üzerine nöroleptik ilaçların yan etkilerinden olan hareket bozukluklarına benzer yan etkilerinin olduğu da görülmüştür.

Bu çalışmada, TMZ'nin 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 miktarları karşılaştırılarak araştırılmıştır. Hücrelerde oksidatif stres ve buna bağlı dejenerasyon oluşturmak için hidrojen peroksit (H_2O_2) ve aşırı uyarım sonucu eksitotoksisteye neden olan mono sodyum glutamat (MSG) kullanılmıştır.

Sonuç olarak, TMZ'nin nöronal ve glial hücreleri H_2O_2 ve MSG ile indüklenen hücre ölümüne karşı anlamlı derece koruduğunu ve TMZ'nin bu hücreler üzerindeki toksisitesinin de çok yüksek dozlarda oluştuğunu bulduk. Bu sonuçlardan dolayı TMZ'nin nörodejeneratif hastalıklarda tedavi seçeneklerine katılabileceğini önermekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Trimetazidin, Nöron, Glial, Hücre Kültürü, Apoptozis, MTT

ABSTRACT

The Determination of Possible Neuroprotective and Neurodegenerative Potentiality of Trimetazidine on Neuronal and Glial Cells

TMZ is an anti-ischemic and anti-anginal agent. Scientific studies have shown that trimetazidine is mitochondrial stabilizer used for indications such as dizziness, tinnitus and also shown that in cases of hypoxia or ischemia prevents decreasing of intracellular level of ATP by blocking the oxidation of fatty acids. Generally, substances are known protecting the cells against hypoxic conditions, may show some neuroprotective effect. In sensorineural disorders such as tinnitus, beneficial effects of TMZ was noticed, unlike on the central nervous system, such as movement disorders, which is on the side effects of neuroleptic drugs with similar side effects were observed.

In this study, potential protective and toxic effects of TMZ on neurons and glial cells, the morphological changes of cells evaluated by MTT assay to compare rates of vitality, for the determination of rates of apoptosis and apoptotic markers by fluorescent staining was investigated by comparing the amounts of caspase-3. To form oxidative stress and thus degeneration in cells, we used H_2O_2 and MSG that causes excitotoxicity with excessive excitation.

As a result, we found that toxic dose of trimetazidine is very high, and trimetazidine significantly protects neuronal and glial cells against cell death induced by H_2O_2 and MSG. Because of these findings, we suggest that trimetazidine may participate in the treatment options for neurodegenerative diseases.

Key words: Trimetazidine, Neuron, Glial, Cell Culture, Apoptosis, MTT

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Trimetazidin	3
2.1.1. Trimetazidin'in Etki Mekanizması	3
2.1.2. Trimaetazidi'in Anti Hipoksik ve Anti İskemik Etkileri	7
2.1.3. Trimetazidin'in Sinir Sistemi ile İlişkisi	8
2.1.4. Parkinsonizm ve Trimetazidin	10
2.2. Serbest Oksijen Radikalleri	12
2.2.1. Oksijen Radikallerine Karşı Savunma Mekanizmaları	13
2.2.2. Oksijen Radikallerinin Kaynakları	13
2.2.3. Eksojen H ₂ O ₂ Verilmesiyle Hücrede Apopitotik Yolağın Uyarılması	15
2.3. Glutamat ve Eksitotoksisite	17
2.1.1. Eksitatör Nörotransmitter: Glutamik Asit	17
2.3.2. Eksitotoksisite	18
2.3.3. Eksitotoksite Mekanizması	18
2.4. Hücre Ölüm Mekanizmaları	21
2.4.1. Nekrozis	21
2.4.2. Apopitozis	22
2.4.3. Apopitozisin Görüldüğü Olaylar	23

2.4.4. Apoptozis Mekanizmaları	25
2.4.5. Apoptoziste Hücre İçi Enzimler	30
2.4.6. Apoptotik Hücrede Gözlenen Morfolojik Değişiklikler	32
2.4.7. Apoptozis ve Nekroz Arasındaki Farklar	34
3. MATERYAL VE METOD	37
3.1. Kimyasallar	37
3.2. Hücre Kültürü	38
3.2.1. Hücre Ekimi	38
3.2.2. Tripsinizasyon	38
3.2.3. Hücre Pasajlaması	39
3.3. Deney Dizaynı	39
3.3.1. Deneyin 1. Aşaması: Gözlemsel Olarak Toksik Dozların Belirlenmesi	39
3.3.2. Deneyin 2. Aşaması: Belirlenen Toksik Dozların MTT Testi İle Doğrulanması	40
3.3.3. Deneyin 3. Aşaması: TMZ'nin Koruyuculuğunun Araştırılması	41
3.4. İstatistiksel Değerlendirme	44
4. BULGULAR	45
4.1. TMZ, H ₂ O ₂ ve MSG'nin Toksik Dozlarının Belirlenmesi	45
4.1.1. SH-SY5Y ve T98G Hücre Serileri İçin TMZ'nin Toksik Doz Aralığı	45
4.1.2. SH-SY5Y ve T98G Hücre Serileri İçin H ₂ O ₂ 'nin Toksik Doz Aralığı	48
4.1.3. SH-SY5Y ve T98G Hücre Serileri İçin MSG'nin Toksik Doz Aralığı	51

4.2. TMZ, H ₂ O ₂ ve MSG'nin Toksik Dozlarının MTT Testi İle Belirlenmesi	54
4.2.1. TMZ'nin Toksik Dozunun MTT Testi İle Belirlenmesi	54
4.2.2. H ₂ O ₂ 'nin Toksik Dozunun MTT Testi İle Belirlenmesi	56
4.2.3. MSG'nin Toksik Dozunun MTT Testi İle Belirlenmesi	58
4.3. H ₂ O ₂ ve MSG Toksisitelerine Karşı TMZ'nin Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri	60
4.3.1. H ₂ O ₂ Toksisitesine Karşı TMZ'nin Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri	60
4.3.2. MSG Toksisitesine Karşı TMZ'nin Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri	62
4.4. TMZ'nin Hücre İçi Kaspaz-3 Seviyelerine Etkileri	64
4.4.1. H ₂ O ₂ Toksisitesine Karşı TMZ'nin Kaspaz-3 Seviyelerine Etkileri	65
4.4.2. MSG Toksisitesine Karşı TMZ'nin Kaspaz-3 Seviyelerine Etkileri	67
4.5. Floresan Boyama İle Apoptozis Oranının Kalitatif Olarak Değerlendirilmesi	69
4.5.1. SH-SY5Y Hücre Serisinde H ₂ O ₂ İle İndüklenen Apoptoz Üzerine TMZ'nin Etkisi	69
4.5.2. T98-G Hücre Serisinde H ₂ O ₂ İle İndüklenen Apoptoz Üzerine TMZ'nin Etkisi	71
4.5.3. SH-SY5Y Hücre Serisinde MSG İle İndüklenen Apoptoz Üzerine TMZ'nin Etkisi	73
4.5.3. T98-G Hücre Serisinde MSG İle İndüklenen Apoptoz Üzerine TMZ'nin Etkisi	73
5. TARTIŞMA	76
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	79
7. KAYNAKLAR	80

KISALTMALAR

5HT2A	Serotonin 2A Reseptörü
AMPA	Amino-3-Hydroxil-5-Methyl-4 Isoxazol Propionate
ATP	Adenin Trifosfat
CAD	Caspase Activeted DNase
DNA	Deoksiribonükleaz
D2	Dopamin 2 Reseptörü
EAA	Eksitator Amino Asit
ER	Endoplazmik Retikulum
GABA	Gamma-Aminobutyric Asid
GSH	Glutasyon
GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz
H2O	Su
H2O2	Hidrojen Peroksit
ICAD	Inhibitor Caspase Activeted DNase
KAT	Katalaz
MSG	Mono Sodyum Glutamat
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NMDA	N-Methyl-D-Aspartate
O2-	Süperoksit Anyonu
OH-	Hidroksil Radikali
PARP	Poly-ADP Ribose Polymerase
PTP	Permeability Transition Pore
R-	Karbon Merkezli Organik Radikaller
RCOO-	Organik Peroksitler
RS-	Tiyil Radikalleri
RyR	Riyanodin Reseptörü
SOCC	Store-Operated Calcium Channels
TMZ	Trimetazidin
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 2.1: Trimetazidin hidroklorürün kimyasal yapısı
- Şekil 2.2: β oksidasyon reaksiyon basamakları
- Şekil 2.3: Glikoliz ve β oksidasyon yolğının kesişmesi
- Şekil 2.4: Pirüvattan laktik asit oluşumu
- Şekil 2.5: Pirüvattan asetil-koA oluşumu
- Şekil 2.6: Trimetazidin ile klasik antipsikotiklerden olan klozapinin yapısal karşılaştırılması
- Şekil 2.7: Glutamik asidin kimyasal yapısı
- Şekil 2.8: Hücrenin nekroza gitmesi
- Şekil 2.9: Bir hücrenin (a) nekroz sonrası ışık (b) ve elektron (c) mikroskopi görüntüsü
- Şekil 2.10: Apoptozisin görüldüğü fizyolojik olaylar
- Şekil 2.11: Mitokondri membranında por oluşumu
- Şekil 2.12: Apoptozom oluşumu
- Şekil 2.13: DNA fragmentasyonu
- Şekil 2.14: Dış sinyallerle apoptozisin tetiklenmesi
- Şekil 2.15: Hücrenin apoptozisi
- Şekil 2.16: Apoptoziste görülen morfolojik değişiklikler
- Şekil 2.17: Apoptozis ile nekroz arasındaki farklar
- Şekil 4.1: Nöron hücreleri üzerinde TMZ'nin etkilerinin gösterilmesi
- Şekil 4.2: Glia hücreleri üzerinde TMZ'nin etkilerinin gösterilmesi
- Şekil 4.3: Nöron hücreleri üzerinde H_2O_2 toksisitesi etkilerinin gösterilmesi
- Şekil 4.4: Glia hücreleri üzerinde H_2O_2 toksisitesi etkilerinin gösterilmesi
- Şekil 4.5: Nöron hücreleri üzerinde MSG toksisitesi etkilerinin gösterilmesi
- Şekil 4.6: Glia hücreleri üzerinde MSG toksisitesi etkilerinin gösterilmesi
- Şekil 4.7: Nöronal hücrelerde H_2O_2 ile indüklenen apoptoz üzerine TMZ'nin etkisi
- Şekil 4.8: Glial hücrelerde H_2O_2 ile indüklenen apoptoz üzerine TMZ'nin etkisi
- Şekil 4.9: Nöronal hücrelerde MSG ile indüklenen apoptoz üzerine TMZ'nin etkisi
- Şekil 4.10: Glial hücrelerde MSG ile indüklenen apoptoz üzerine TMZ'nin etkisi

GRAFİK DİZİNİ

- Grafik 4.1: TMZ'nin nöronal hücrelerdeki etkilerinin MTT testi ile gösterilmesi
- Grafik 4.2: TMZ'nin glial hücrelerdeki etkilerinin MTT testi ile gösterilmesi
- Grafik 4.3: H₂O₂'nin nöronal hücrelerdeki toksisitesinin MTT testi ile gösterilmesi
- Grafik 4.4: H₂O₂'nin glial hücrelerdeki toksisitesinin MTT testi ile gösterilmesi
- Grafik 4.5: MSG'nin nöronal hücrelerdeki toksisitesinin MTT testi ile gösterilmesi
- Grafik 4.6: MSG'nin glial hücrelerdeki toksisitesinin MTT testi ile gösterilmesi
- Grafik 4.7: H₂O₂'nin nöronal hücrelerdeki toksisitesine karşı TMZ'nin hücre canlılığı üzerine etkilerinin MTT testi ile gösterilmesi
- Grafik 4.8: H₂O₂'nin glial hücrelerdeki toksisitesine karşı TMZ'nin hücre canlılığı üzerine etkilerinin MTT testi ile gösterilmesi
- Grafik 4.9: MSG'nin nöronal hücrelerdeki toksisitesine karşı TMZ'nin hücre canlılığı üzerine etkilerinin MTT testi ile gösterilmesi
- Grafik 4.10: MSG'nin glial hücrelerdeki toksisitesine karşı TMZ'nin hücre canlılığı üzerine etkilerinin MTT testi ile gösterilmesi
- Grafik 4.11: TMZ'nin nöronal ve glial hücrelerdeki hücre içi kaspaz-3 seviyelerine etkilerinin gösterilmesi
- Grafik 4.12: H₂O₂'nin nöronal hücrelerdeki toksisitesine karşı TMZ'nin hücre içi kaspaz-3 seviyelerine etkilerinin gösterilmesi
- Grafik 4.13: H₂O₂'nin glial hücrelerdeki toksisitesine karşı TMZ'nin hücre içi kaspaz-3 seviyelerine etkilerinin gösterilmesi
- Grafik 4.14: MSG'nin nöronal hücrelerdeki toksisitesine karşı TMZ'nin hücre içi kaspaz-3 seviyelerine etkilerinin gösterilmesi
- Grafik 4.15: MSG'nin glial hücrelerdeki toksisitesine karşı TMZ'nin hücre içi kaspaz-3 seviyelerine etkilerinin gösterilmesi

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nörodejenerasyonun neden olduğu hastalıklar üzerinde birçok araştırma yapılmasına rağmen, kalıcı olarak tam bir tedavi seçeneği halen bulunamamıştır. Sinir hücresi harabiyeti sonucu hastalanmış kişinin yaşam kalitesindeki bozulma, nörolojik hastalıkların toplum üzerindeki duygusal, fiziksel ve sosyoekonomik etkileri gibi çok ciddi problemler olarak ortaya çıkarmaktadır. Bu hastaların önemli bedensel işlevlerini yitirmelerinin yanı sıra, ömür boyu süren tedavileri ve bakım masrafları, işgücü ve gelir kayıpları ile yaşadıkları sosyal ve psikolojik sorunlar hastaları, ailelerini ve ülke ekonomisini ciddi düzeyde etkileyen bir sağlık problemi ile karşı karşıya olduğumuzu göstermektedir.

Santral nöron hasarı olan hastalar tutulum lokalizasyonuna bağlı olarak duygusal, motor ve kognitif defisitlere sahiptirler. Söz konusu hasar, konjenital olarak veya sonradan gelişebilen enfeksiyon, travma, damarsal hastalıklar, tümöral gelişimler, metabolik hastalıklar ve zehirlenmeler gibi nedenlerle de ortaya çıkabilmektedir.

Birçok araştırmacı nörolojik fonksiyonları düzeltmek amacıyla nörodejenasyonun patofizyolojik mekanizmaları üzerinde değişik araştırmalar yapmışlardır. Santral sinir sistemi zedelenmelerini takiben eş-zamanlı olarak hızla gelişen nekrotik hücre ölümleri ve daha yavaş gelişen endojen hücre ölüm yollarının aktivasyonu ile apoptotik hücre ölümleri gerçekleşmektedir. Zedelenmeyi takiben hızlı gelişen hücre ölümlerine karşı tedavinin çok mümkün olmadığı düşünüldüğünden nöranal dejenerasyonun tedavisinde amaç daha çok apoptozisi önlemek veya azaltmaya yönelik olmuştur. Apoptozis temelde mitokondri sitokrom-c, hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanma ve Endoplazmik Retikulum (ER) aracılığıyla temel olarak üzere üç farklı mekanizma ile gerçekleşmektedir.

Araştırmamızda kullanılan hücre kültürü yöntemleri, laboratuvar araştırmalarında kolay uygulanabilirliği ve neden-sonuç ilişkisinin doğrudan gözlemlenebilir olması nedeniyle oldukça yaygınlaşmaktadır.

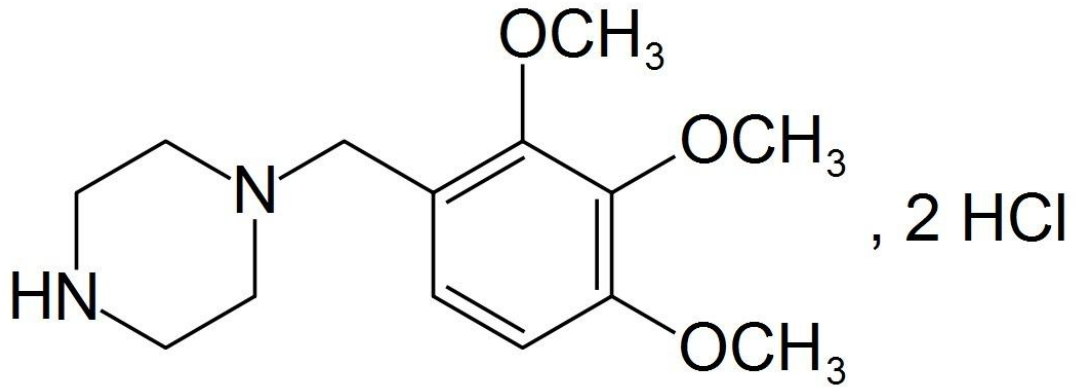
TMZ'nin, antioksidan ve anti-iskemik bir ilaç olmasının yanında mitokondri membranını stabilize ederek, apoptozisi erken dönemde engellemektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda TMZ'nin kalp ve karaciğer hasarında hücre ölümünü azalttığı bildirilmiştir. Bazı hastalarda da doz aşımına bağlı hareket bozukluğu olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmanın amacı, nöronal ve glial kökenli hücre kültür serileri üzerinde TMZ'nin H₂O₂ ve MSG toksisitelerine karşı koruyucu etkilerinin olup olmadığını ve tek başına kullanıldığında hücre ölümüne neden olduğu dozunun belirlenmesidir.

Bu amaca yönelik olarak ilacın etkileri, faz-kontrast mikroskobu ile hücrelerin kaba şekilde histopatolojik incelenmesiyle, MTT testi ile canlılık oranları ölçülerek, ELİSA yöntemiyle apoptozis belirteci bakılarak ve floresan boyama yöntemleri ile detaylı şekilde histopatolojik olarak incelenerek değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. TRİMETAZİDİN

TMZ (1-[2,3,4-trimetoksi-benzil]-piperazin, 2 HCl) ilk kez 1978 de Fransa’da tescil edilmiştir (Şekil 2.1). Bu tarihten itibaren birçok Avrupa ülkesinin yanı sıra Japonya, Asya ve Latin Amerika’da hemodinamik etkileri olmayan, güvenilir hücresel anti-iskemik bir ilaç olarak kullanılmaya başlanmıştır. Kimyasal, farmakolojik, toksikolojik, farmakokinetik ve güvenlik gibi birçok alanda ilaç üzerinde incelemeler yapılmıştır. TMZ’nin etkilerini değerlendirmek üzere yapılan pek çok çalışmada herhangi bir yan etki oluşturmada birçok hücre tipinde anti iskemik etki göstermesi tedavide bir üstünlük olarak ele alınmıştır (1,2,3,4,5).



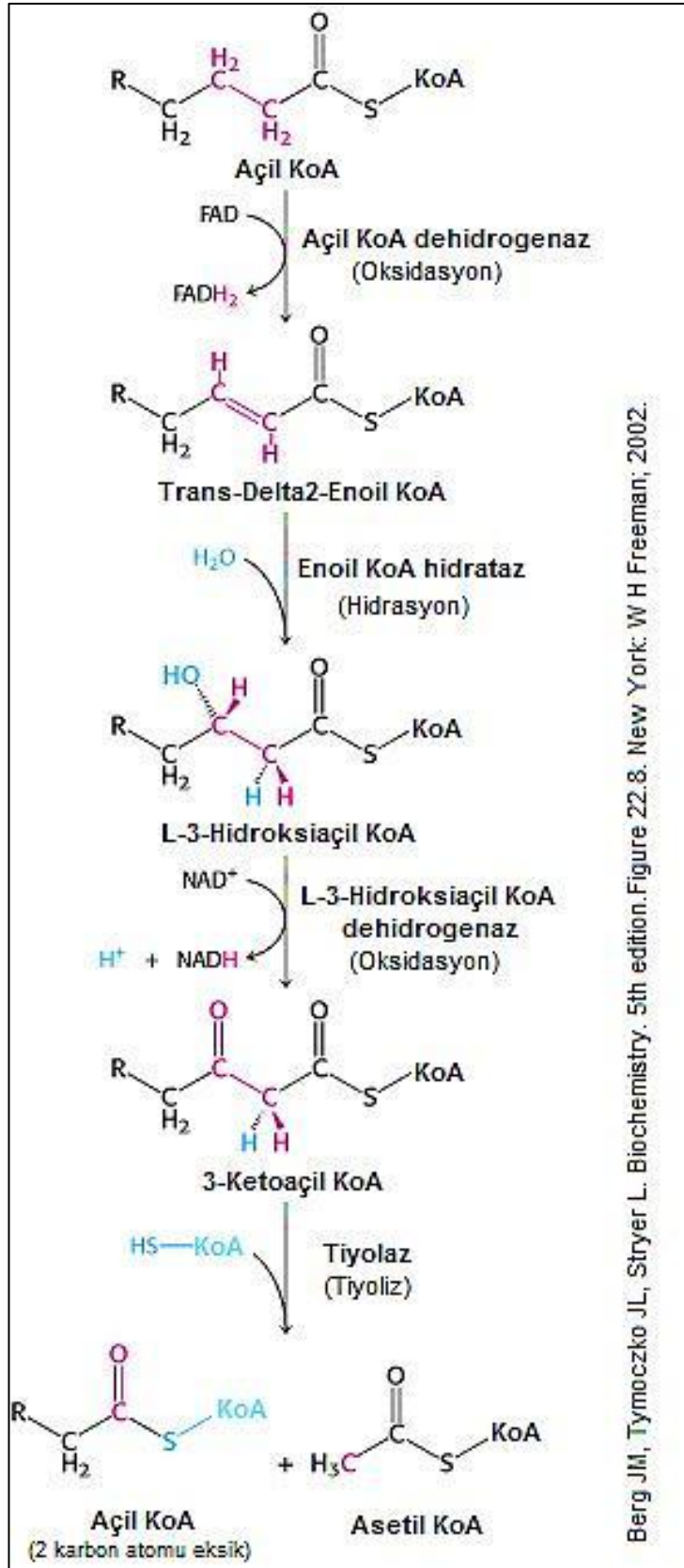
Şekil 2.1. Trimetazidin Hidroklorür’ün kimyasal yapısı

2.1.1. Trimetazidin’in Etki Mekanizması

TMZ, iskemi sırasında hücrelerde gerçekleşen artmış karbonhidrat ve yağ asidi oksidasyonunu, laktat birikimini ve ayrıca sitoplazmada yağ asitlerinin birikmesini önleyerek hücresel homeostazisi korumaktadır. TMZ asıl etkisini mitokondrideki β oksidasyonun dördüncü basamağındaki tiolaz enzimini inhibe ederek göstermektedir.

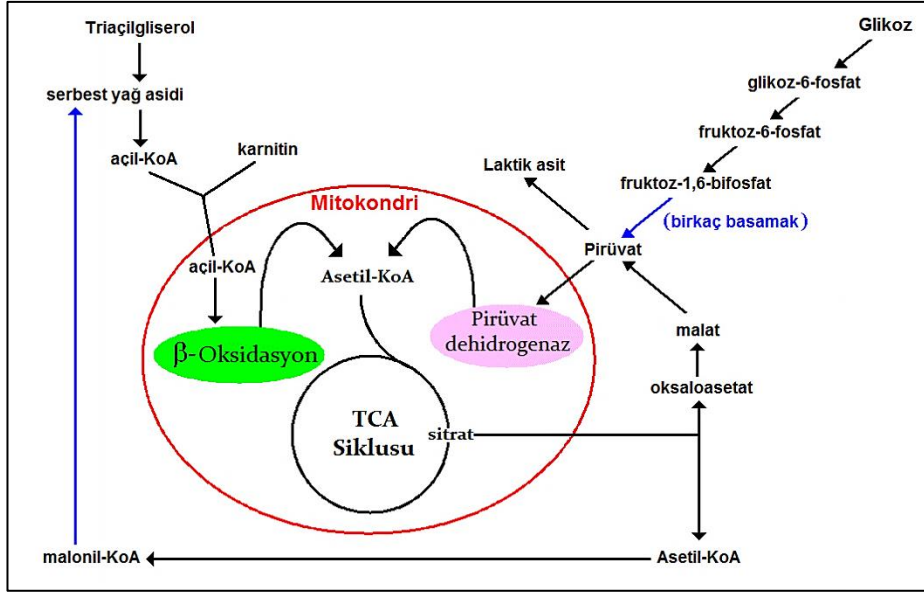
β oksidasyon: Yağ dokularında triaçilgliserol olarak depolanmış yağ moleküllerinin katabolizması sonrasında 1 adet gliserol, 3 adet yağ asidi oluşmaktadır. Dolaşıma geçen yağ asitleri kanda albümine bağlı olarak dolaşmaktadır. Kandan sitozole giren yağ asitleri, mitokondriyal membranları doğrudan geçemezler; ancak bir seri enzimatik reaksiyona uğradıktan sonra oksidasyon için mitokondri matriksine alınırlar. Bunun için önce yağ asidi, dış mitokondriyal membranda bulunan açıl-KoA sentetaz tarafından katalizlenen bir reaksiyonda aktiflenir ve böylece açıl-KoA oluşmaktadır. Dış mitokondriyal membranda oluşan uzun zincirli açıl-KoA bileşikleri, iç mitokondriyal membrandan geçememektedirler; bunların mitokondriyal matrikse alınmaları için karnitin gerekmektedir. 4-12 karbonlu yağ asitlerinin mitokondri matriksine taşınmaları için ise karnitine ihtiyaç yoktur. Yağ açıl-KoA mitokondriyal matrikse alındıktan sonra β oksidasyon denen reaksiyon yolağında, tiyolaz enzimi ile karboksilli uçtan başlayarak asetil-KoA şeklinde iki karbonlu üniteler art arda çıkarılmaktadır. Yağ açıl-KoA'daki karbon atomu tükenene kadar bu reaksiyon dizisi tekrar etmektedir. Örneğin 16 karbon atomu içeren palmitattan 8 adet asetil-KoA molekülü ve β oksidasyon reaksiyonu 7 kez tekrarladığından, 7 adet NADH ve 7 adet $FADH_2$ molekülü oluşmaktadır. Oluşan asetil-KoA'lar sitrik asit döngüsüne katılarak NADH, $FADH_2$ ve GTP moleküllerinin oluşumunu ve sonrasında bu moleküller de elektron transport zincirine katılarak enerji üretimini sağlamaktadırlar.

β oksidasyon sırasında oluşan asetil-KoA aynı zamanda glikoliz yolağının birinci basamağında oluşan pirüvatın yıkımıyla da oluşmaktadır. Pirüvat dehidrogenaz enzimi sayesinde pirüvattan mitokondride 2 molekül asetil-KoA oluşmaktadır. Asetil-KoA bu reaksiyon basamağının son ürünü olduğundan β oksidasyon sırasında oluşan fazla asetil-KoA pirüvat dehidrogenazı baskılamaktadır. Sitozolde biriken pirüvat, laktat dehidrogenaz enzim yolağına kayarak laktik aside dönüşmektedir.

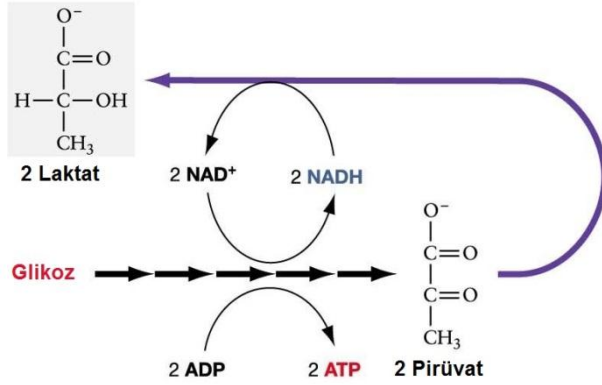


Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry. 5th edition. Figure 22.8. New York: W H Freeman; 2002.

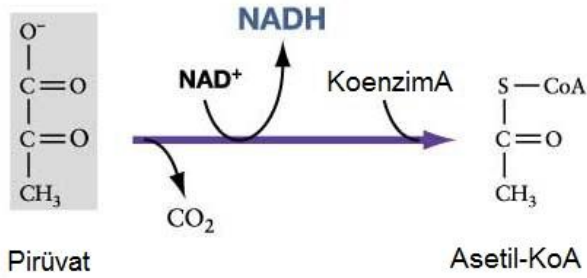
Şekil 2.2. β Oksidasyon reaksiyon basamakları



Şekil 2.3. Glikoliz ve β oksidasyon yolağının kesişmesi



Şekil 2.4. Pirüvattan laktik asit oluşumu



Şekil 2.5. Pirüvattan asetil-KoA oluşumu

TMZ'nin tiyolaz enzimini inhibe etmesiyle β oksidasyon baskılanacağından, enerji için gerekli olan substrat kullanımı glikoz oksidasyonuna doğru kaymakta ve β oksidasyon ile gerçekleşen yağ asidi oksidasyonu sırasında inaktive olmuş olan pirüvat dehidrogenaz enzimi de tekrar aktif hale gelmektedir. TMZ, hücrenin serbest radikal kapasitesini de artırmaktadır (6). Ayrıca bölgesel nötrofil infiltrasyonunu da inhibe ederek enflamasyonu önlemektedir (7,8).

Genel olarak hücresel etkileri şunlardır; (7)

- ❖ Hücresel yağ asidi metabolizmasını azaltıp, glikoz metabolizmasını artırır.
- ❖ Hücre içi ATP düzeylerini yüksek tutar.
- ❖ Hücrede kalsiyum ve sodyum birikmesini azaltır.
- ❖ Hücre içinde asidozu sınırlandırır.
- ❖ Mitokondri fonksiyonlarını korur.
- ❖ Serbest oksijen radikallerinin yol açtığı membran hasarına karşı koruma sağlar.

2.1.2. Trimetazidin'in Anti-Hipoksik ve Anti-İskemik Etkileri

İskemi, belirli bir dokunun kan akışının ciddi olarak azalması sonucu hücrelere gitmesi gereken oksijenin azalmasıyla çeşitli fonksiyonel hücresel bozuklukların ortaya çıkmasıdır. İskemi sonrası görülen reperfüzyon (yeniden kanlanma) başlarda geri-dönüşümlü sonuçlar doğurmaktadır. Bununla birlikte bu süreç ilerledikçe kalıcı morfolojik ve fonksiyonel hasarlar giderek şiddetlenmekte ve sonunda hücresel ölüm gerçekleşmektedir. Hücre içi asidozun, sitoplazmik ve mitokondrial Ca^{+2} birikiminin ve oksijenden kaynaklanan serbest radikallerin aşırı üretiminin neden olduğu membran hasarı ve sonrasında gelişen hücresel enzim sızıntıları iskemik hücrelerde şiddetli olarak görülmektedir.

Yapılan invitro ve invivo çalışmalarla TMZ'nin anti-hipoksik etkisi olduğu gösterilmiştir (9,10). Sıçan miyokard hücrelerinde yapılan çalışmalarda geçici ağır iskemi sonucu oluşan ödemli lezyon alanının TMZ tarafından sınırlandırıldığı ve ayrıca TMZ'nin oksijensiz kalmış ve ekstraselüler Ca^{+2} ile aşırı yüklenmeye maruz kalmış inaktif kardiyak miyositlerde oluşan K^{+} kaçağını ve ATP sentezindeki azalmayı sınırlandırdığı da gösterilmiştir (11).

2.1.3. Trimetazidin'in Sinir Sistemi ile İlişkisi

TMZ'nin, kalp ve çeşitli organlarda iskeminin neden olduğu hücrel hasara karşı koruyuculuk sağladığı yapılan çalışmalar sonucunda gösterilmiştir(1,3). TMZ'nin etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olsa da iskeminin neden olduğu miyokardiyal hasar ile sonuçlanan ciddi hücrel hasar basamakları etkilediği görülmüştür. Yapılan çalışmaların sonuçları, TMZ'nin kalpte oluşan iskeminin neden olduğu hücrel enerji üretim bozukluğunu azalttığı, iskemik şartlarda görülen hücre içi sodyum ve kalsiyum seviyelerini yükselişini önlediği ve ayrıca iskemi sırasında görülen aşırı serbest radikal üretimini azalttığı şeklindedir (1,3,11).

Sinir sistemindeki ve kalpteki iskemik hasar patogenezi benzerlikler göstermektedir. İskemi sonucu sinir sisteminde birçok ciddi hücrel değişiklikler olmaktadır. Kalptekine benzer şekilde; ATP sentezinde azalma, enerji üretiminde bozulma sonucu toksik düzeylerde kalsiyum birikimi (12) ve serbest radikal üretiminde de artış olmaktadır (9). Bu bilgilere dayanarak TMZ'nin sinir sistemi üzerinde etkinliğini gösterebilmek üzere bazı in-vivo çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda;

- 4000 Hz'den yüksek frekanslardaki sesle işitme kayıpları oluşturulan deneklerin TMZ ile 5 günlük tedavileri sonucunda işitmeleri tama yakın bir şekilde düzelmiştir (13). Bu da bize, akustik travma sonrası ani işitme kaybı gelişen olgularda TMZ kullanımı ile etkili sonuçlar alınabileceğini göstermiştir,

- Farklı bir gürültü çalışmasında ise 7 gün boyunca TMZ tedavisi alan deneklere uygulanan gürültü sonrası oluşan koklear hasarın azaldığı görülmüş olup bu da serbest radikal oluşumunun azalmasıyla ilişkilendirilmiştir.
- Başka bir çalışmada ise bir Glutamat analogu olan kainik asidin peritonal ve perilenfatik olarak uygulanması sonucu oluşturulan koklear hasar üzerine TMZ'nin koruyucu etkinliği araştırılmıştır. Sonuçta TMZ'nin bu modelde anlamlı bir şekilde etkili olduğu bulunmuştur. Araştırmaya göre işitme sinir lifi üzerindeki kainik asit toksisitesine karşı TMZ'nin koruyucu etkisinin iki şekilde olabileceği düşünülmektedir: 1) iç kulak tüy hücreleri üzerinde, perisinaptik reseptörlere kainik asidin bağlanmasıyla oluşan aşırı glutamat salıverilmesinin önlenmesi, 2) tip 1 koklear nöronlarda hücre içi asiditeyi ve dolaylı olarak iyon akışı kontrolünü sağlaması.
- Buna benzer bir başka çalışmada ise, TMZ'nin sıçan vestibüler gangliyon nöronlarında AMPA/kainat reseptörlerini modüle ederek potent bir antagonist etkide bulunduğu gösterilmiştir (14). Bu sonuç ile iç kulakta TMZ'nin anti-eksitotoksik etkili koruyucu bir rol oynadığı gösterilmiştir.
- İşitme organı üzerinde TMZ ile ilgili yapılan klinik çalışmalarla, TMZ'nin dejeneratif işitme kaybı (15), Meniere hastalığı ile ilişkili semptomlar (16) ve kulak çınlamasında anlamlı iyileşmeler yaptığı gösterilmiştir (17).
- TMZ'nin iskemi-reperfüzyon sonrası oluşan retina hasarı üzerine de anlamlı koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir (18).
- TMZ'nin spinal kord iskemisi ve travması üzerindeki etkililiği konusunda çalışmalar da yapılmıştır. 24 ve 48 saatlik geçici spinal kord iskemisi modeli ile yapılan bir çalışmada, aort oklüzyonundan önce intra-venöz olarak verilen TMZ'nin, nörolojik değerlendirmede deneklerin motor fonksiyonlarını yükselttiği ve histolojik incelemelerde de spinal kord hasarını azalttığı bulunmuştur. Bu sonuçla TMZ'nin torako-abdominal aort operasyonları sırasında gelişen spinal kord hasarını azaltacağını ve yüksek riskli operasyonlar sırasında tedavi seçeneği olabileceği öngörülmüştür (19).

- Yapılan başka bir spinal kord çalışmasında ise ağırlık düşürme ile oluşturulan spinal kord yaralanmaları sonrasında verilen tek doz bir TMZ türevinin 7 gün sonra histopatolojik incelemelerde apoptotik hücre sayısını anlamlı düzeyde azalttığı ve tedavi grubunda belirgin ve anlamlı bir fonksiyonel iyileşmenin sağlandığı gösterilmiştir (20).

Bu çalışmalar TMZ'nin sinir sistemi hasarları üzerinde etkili olabileceğini ortaya koymaktadır. Ancak TMZ'nin nöronal veya glial hücre koruyuculuğu konusunda yapılmış in-vitro hücre kültürü ve moleküler çalışmalar mevcut değildir. Bu konuda ki yetersizlik TMZ'nin nöroprotektif etkilerinin tam olarak anlaşılmasına neden olmaktadır.

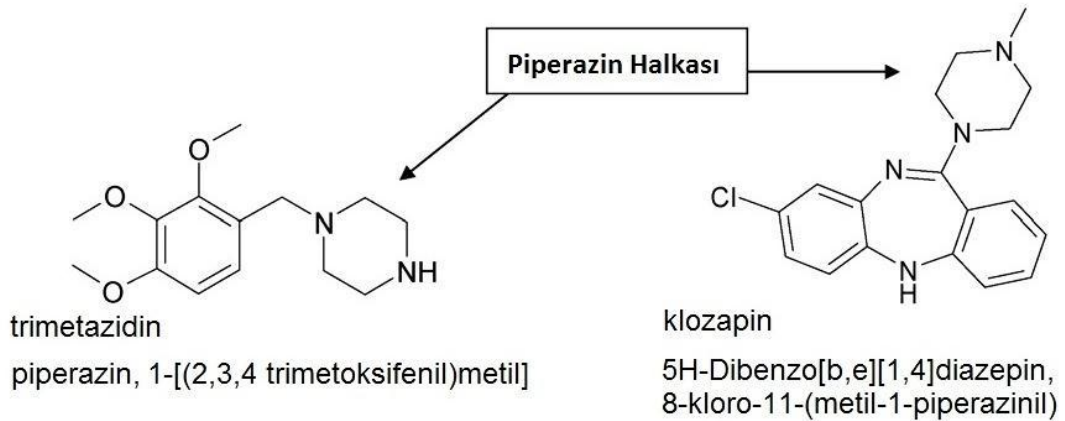
2.1.4. Parkinsonizm ve Trimetazidin

Parkinsonizm klinik bir sendrom olarak tanımlanabilir. Dört ana belirtinin en az iki tanesinin varlığında bu sendromdan söz edilebilir. Bu belirtiler farklı kombinasyonlarda bulunabilmektedir; titreme, iskelet kası sertliği, hareketlerde yavaşlama ve duruş bozukluğu (21). Parkinsonizmin nedenleri arasında parkinson hastalığından sonra ikinci sırada ilaçların tetiklediği parkinsonizm gelmektedir (22,23). İlaçların tetiklediği parkinsonizm daha sıklıkla şizofreni hastalığı tedavisinde kullanılan nöroleptik ilaçların yan etkileri olarak ortaya çıkmaktadır (24,25).

Klasik antipsikotiklerin yapmış olduğu bu yan etkiler ekstrapramidal sistem ile ilgilidir. Bu sistem üzerindeki nigrostriyal bölgedeki dopamin-2 (D2) reseptörlerinin bloke edilmesi sonucu ekstrapramidal bulgular ortaya çıkmaktadır (26). Atipik antipsikotik ilaçlar ise klasik antipsikotiklere göre daha az ekstrapramidal yan etkiler göstermektedir. Bunun nedeni olarak birkaç hipotez üretilmiştir (26):

- 1) Klasik nöroleptiklerin aksine atipik nöroleptikler, serotonin-2A (5-HT_{2A}) reseptörlerini D2 reseptörlerinden daha fazla bloke etmektedirler. Bu da ekstrapramidal yan etkileri azaltmaktadır.
- 2) Klasik nöroleptik tedavisinin sonucu olarak nigrostriyal dopamin reseptör sisteminde dopamine karşı hassasiyet artışı gelişmiş olabilmektedir ama bu atipik nöroleptiklerle gözlenmemektedir.
- 3) Genetik olarak dopamin 3 alleliyle ilişkili bir yatkınlık olabilir.

TMZ'nin klasik antipsikotiklerle olan yapısal benzerliği nedeniyle dopamin reseptörleri üzerinde antagonist etkili olduğu gösterilmiştir (27). Bu benzerlik yapısındaki piperazin halkasından kaynaklanmaktadır. TMZ uzun süreler kullanıldığında ve aşırı miktarda alındığında hastalarda parkinsonizm bulguları ortaya çıkmaktadır ancak bu bulgular ilaç alınmasının durdurulması ile kısa süre içinde ortadan kalkmakta ve kalıcı bir sekel bırakmamaktadır (27,28). Şekil 2.6.



Sivet J, de la Gastine B, Mosquet B, Lescure P, Boutemy J, Le Boisselier R, Coquerel A.
Trimetazidine-induced encephalopathy with choreiform disorders: a case report. *La Revue de médecine interne* 29 (2008) 512–515

Şekil 2.6. TMZ ile klasik antipsikotiklerden olan klozapinin yapısal karşılaştırması

2.2. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ

Serbest radikal, eşlenmemiş elektron içeren atom veya moleküldür. Genelde elektronlar atom veya molekülde eşlenik olarak bulunmaları nedeniyle molekülde stabildir ve reaktif değildir. Ancak, moleküle bir elektron ilavesi ya da bir elektron kaybı onu reaktif hale getirir (29).

Organizma sürekli olarak serbest radikal ataklarıyla karşı karşıyadır. Atmosferin %21'ini teşkil eden oksijenin aerobik organizmanın yaşamı için gerekliliği kaçınılmazdır. Oksijenin normal hücreler için toksik olabileceği ve doku hasarlanmasına yol açabileceği düşüncesi, ilk kez 1878'de Bert tarafından ortaya atılmıştır (30). Serbest oksijen radikallerinin tanımlanması ve sitotoksik etkilerinin gösterilmesi ile Bert hipotezi doğrulanmış bulunmaktadır.

Normal koşullar altında, biyolojik sistemlerdeki moleküler oksijeninin yaklaşık %95'i mitokondrial sitokrom oksidaz sisteminde 4 elektron daha alarak tetravalan indirgenmeyle suya dönüşmektedir (31). Geriye kalan yaklaşık %5 kadar moleküler oksijen univalan indirgenmeyle son yörüngelerinde ortaklanmamış elektron içeren serbest oksijen radikallerini oluşturmaktadır. Bunlar süperoksit anyonu (O_2^-), H_2O_2 ve yüksek derecede reaktif olan hidroksil radikalidir ($OH^\cdot$). O_2^- , moleküler oksijene tek bir elektronun eklenmesiyle; $OH^\cdot$ ise, bazı metal iyonları varlığında süperoksit radikalinin hidrojen peroksitle reaksiyona girmesi ile meydana gelir (32). Bir insan vücudunda yılda yaklaşık iki kilogram O_2^- oluştuğu bildirilmiştir (33).

İskemi, post-iskemik reperfüzyon, oksijen toksisitesi, radyasyon, kimyasal karsinogenezis, çeşitli tip inflamatuvar reaksiyonlar gibi doku harabiyetinin değişik formlarına neden olan süreçlerde, serbest oksijen radikallerinin önemli mediyatörler olduğu ortaya konulmuştur (34,35). Hidroksil radikali, hücre membranında lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunu başlatabilmektedir. Lipid peroksidasyonunda çoklu doymamış yağ asitleri suda eriyebilir maddelere yıkılır ve bu da membran bütünlüğünün bozulmasına neden olmaktadır (32). Lizozomal membranların

peroksidasyonu ise lizozomal hidrolazların sitoplazmaya salıverilmesine yol açarak yine hücre ölümüne sebep olmaktadır (36).

Diğer taraftan oksijen radikalleri, DNA'da mutasyonlar oluşturabilir; hiyaluranik asit ve ilgili makro molekülleri depolimerize edebilmektedir (37).

2.2.1. Oksijen Radikallerine Karşı Savunma Mekanizmaları

Dokuda oksidatif hasar oluşumuna karşı öncelikli savunma sistemini süperoksit dismutaz, katalaz (KAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimleri oluşturur. Süperoksit dismutazın bilinen tek biyolojik etkisi potansiyel olarak sitotoksik olan $O_2^{\cdot-}$ lerin H_2O_2 ve O_2 'ye katalitik dismutasyonudur (38). Eser miktarda süperoksit dismutaz aktivitesi plazma, spinal sıvı ve lenf sıvısında da saptanmıştır (39).

H_2O_2 de potansiyel olarak sitotoksiktir. KAT ve GSH-Px gibi hücre içi enzimler bu bileşiği suya (H_2O) katabolize etmektedir (40). KAT bir hemoproteindir. H_2O_2 'nin H_2O 'ya dekompozisyonunu katalize eder. GSH-Px ise selenyum içeren sitoplazmik bir enzimdir. H_2O_2 veya organik peroksitlerin H_2O 'ya veya kendine uyan organik alkole dekompozisyonunu katalize eder (41).

Antioksidan enzimlere ek olarak oksidanların neden olduğu doku hasarına karşı ikinci kuşak savunmada askorbik asit, sistein gibi suda eriyen maddeler ve alfa tokoferol, beta karoten gibi yağda eriyen maddeler de antioksidan fonksiyon görürler.

2.2.2. Oksijen Radikallerinin Kaynakları

Serbest oksijen radikalleri oksijenden, nitrik oksitten, uyarılmış nötrofillerden, mitokondrial elektron transport sisteminden, ER'den, peroksizomdan, plazma membranından, prostaglandin sentetaz ve hipooksijenaz sistemlerinden,

soluble enzim ve proteinlerden ve çeşitli bileşiklerin oto-oksidasyonundan oluşabilmektedir.

İskemi reperfüzyonla ilgili doku hasarında reaktif oksijen metabolitlerinin potansiyel kaynağı olarak başlıca iki enzim sorumlu görülmektedir: ksantin oksidaz ve nötrofilik NADPH oksidaz.

Ksantin Oksidaz

Reaktif oksijen türevlerinin en iyi anlaşılmış biyolojik kaynağıdır. Birçok bakteri ve hayvan türünde varlığı gösterilmiştir. Çalışmalar sonucunda memeli dokularında en fazla ksantin oksidaz aktivitesi karaciğer ve ince barsaklarda bulunmuştur (42). Ksantin oksidaz aktivitesi doku homojenatlarında ölçülebilmese karşın selüler lokalizasyonu tam olarak açığa kavuşmamıştır. İmmün-floresan mikroskopi ksantin oksidaz aktivitesinin kapiller endotelyumla sınırlı olduğunu göstermiştir (43). Fakat bu bulgu, intestinal ve hepatik epitel sitozolünün önemli miktarda ksantin oksidaz aktivitesi içerdiğini telkin eden histoşimik verilere ters düşmektedir (44). Diğer taraftan ksantin oksidazın kompetitif inhibitörü olan allopürinol tarafından inhibe edilebilen bir süreç içinde izole hepatositlerin hipoksantini, ürik asit ve allantoina metabolize ettiğinin gösterilmesi de bu enzimin epitelyal lokalizasyonunu destekleyen bir bulgudur (45).

Nötrofilik NADPH Oksidaz

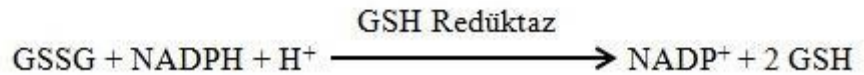
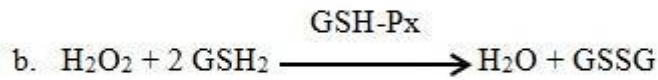
Nötrofil, monosit, eozinofil ve makrofajların NADPH oksidaz ile ilişkili plazma membranı da, reaktif oksijen radikallerinin bir diğer potansiyel kaynağıdır. NADPH oksidaz, sitozolik NADPH'ın oksidasyonu ile birlikte moleküler oksijeni O_2^- 'ye indirger. Nötrofiller ayrıca yüksek konsantrasyonda miyeloperoksidaz da içerirler.

Aktive olmuş fagositik hücreler bakterileri öldürmek için oksijen radikallerini üretirler ve bu işlem sonunda kendilerinin ölümüne de neden olabilirler. Ayrıca bu radikaller enfeksiyonun yaptığı doku hasarına da katkıda bulunabilir (46). Öte yandan oksijen radikallerinin enfeksiyon ve doku hasarı bölgesine nötrofilleri yönelten kemotaktik maddelerin yapımı için plazma faktörü ile reaksiyona girerek akut inflamatuvar cevapta önemli bir rol oynadıkları da gösterilmiştir (47).

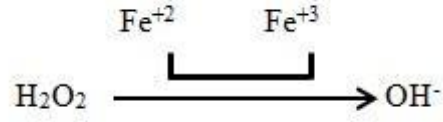
2.2.3. Eksojen H₂O₂ Verilmesiyle Hücrede Apoptotik Yolağın Uyarılması

H₂O₂ hücre kültürü çalışmalarında serbest oksijen radikali hasarı oluşturmak için sıklıkla kullanılan bileşiklerden biridir. H₂O₂ eşlenmemiş elektron içermediği için tek başına radikal değildir (48). Hidrojen peroksitin hücre içinde metabolizması birkaç şekilde olabilir (49).

- 1- H₂O₂, KAT veya GSH-Px tarafından toksik olmayan ürünlere dönüşür.



- 2- H_2O_2 geçiş metallerinin varlığında toksik $\text{OH}^\cdot$ radikaline dönüşür: Fenton reaksiyonu



- 3- $\text{O}_2^\cdot$ varlığında en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan $\text{OH}^\cdot$ dönüşür: Haber-Weiss reaksiyonu



$\text{OH}^\cdot$ radikali, Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları sonucu H_2O_2 'den oluşmaktadır. Ayrıca suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda da oluşabilir (49). Hidroksil radikali son derece reaktif bir oksidan radikaldir, yarılanma ömrü çok kısadır. Hidroksil radikali büyük bir olasılıkla reaktif oksijen türlerinin en güçlüsüdür. Oluştığı yerde tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak tiyil radikalleri ($\text{RS}^\cdot$), karbon merkezli organik radikaller ($\text{R}^\cdot$), organik peroksitler ($\text{RCOO}^\cdot$) gibi yeni radikallerin oluşmasına ve sonuçta büyük hasara neden olabilirler (50).

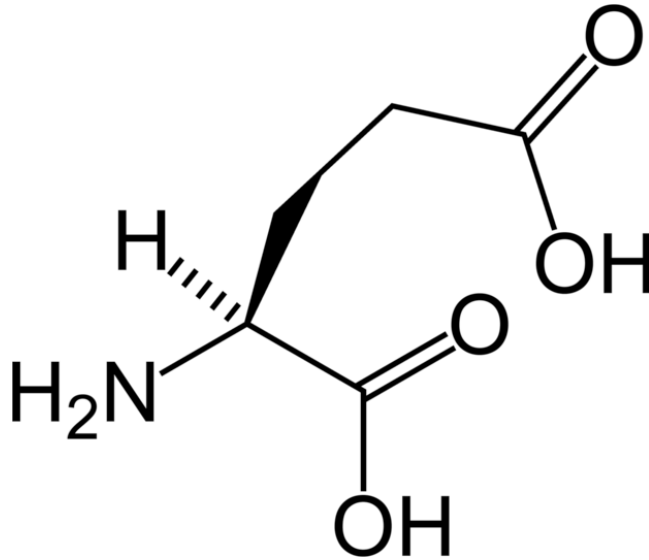
Dışarıdan verilen H_2O_2 , hücrenin savunma mekanizmasındaki antioksidanların kapasitesinden daha fazla olduğunda H_2O_2 'den üretilen serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar (51). Hidroksil radikali deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. DNA'da oluşan hasar düzeltilemeyecek düzeye ulaştığında hücre ölüme gider. Bu süreç ya nekroz olarak adlandırılan hızlı bir süreçtir ya da apoptozis denen kontrollü hücre ölümü şeklinde gerçekleşir. Ölüm şekli doza bağımlı olarak değişmektedir (52).

2.3. GLUTAMAT VE EKSİTOTOKSİSİTE

2.3.1. Eksitatör Nörotransmitter: Glutamik Asit

Glutamik asit (Glu) proteinleri oluşturan 20 aminoasitten biridir. Glutamat olarak da bilinir. Bir amino ve iki karboksil grubu içerir (Şekil 2.7). Glutaminin anyonik formudur. Karaciğerde sentezlenen pıhtılaşma faktörlerinin yapısında, protein S ve C'nin yapısında ve kemiklerde osteokalsinin yapısındaki aminoasit olup K vitaminine bağlı olarak gama karboksile olur. Folik asitin yapısında bulunur. Sinir sisteminde eksitatör etkili bir nörotransmitterdir (53).

Santral sinir sisteminde glutamat, bilişsel işlevler, öğrenme ve hafızada önemli rol oynar (53). Nöronlar arası sinaptik aktivite, sinaptik aralıkta geçici lokal glutamat konsantrasyon artışına yol açar ancak taşıyıcı aracılıklı geri alım ile glutamat homeostasisi tekrar sağlanır (54). Glutamat yaşam için gerekli olsa da merkezi sinir sistemindeki konsantrasyon değişiklikleri glutamatın toksik etkisini ortaya çıkarabilir. Travmatik hasar, bazı toksik biyokimyasal ajanlar, oksidatif stres ve otoimmün hastalıklar glutamata bağlı gelişen yıkım sürecini tetikleyebilir (55,56).



Şekil 2.7. Glutamik Asidin Kimyasal Yapısı

Glutamat ayrıca GABAerjik nöronlardaki inhibitör GABA'nın (gamma-amino bütirik asit) sentezi için de öncül maddedir. Bu reaksiyon serebellum ve pankreasta çokça bulunan glutamat dekarboksilaz tarafından katalize edilir.

2.3.2. Eksitotoksisite

İlk olarak T. Hayashi tarafından 1954 yılında glutamatın olumsuz etkileri; glutamatın doğrudan uygulanmasıyla merkezi sinir sisteminde konvülsiyona neden olduğu gözlenmiştir (57). Bu raporu takiben 1957 yılında DR Lucas ve JP Newhouse, yeni doğmuş farelerde MSG'nin subkutan enjeksiyonunun retinanın iç katmanlarındaki nöronları tahrip ettiğini gözlemiştir (58). Daha sonra, 1969 yılında John Olney bunun sadece retina ile sınırlı olmadığını, beyin genelinde olduğunu keşfetti ve eksitotoksisite terimini türetti. Olney, hücre ölümünün sadece postsinaptik nöronlarla sınırlı olmadığını, glutamat agonistlerinin de glutamat kadar glutamat reseptörlerini aktive edebileceğini ve glutamat antagonistlerinin nörotoksisiteyi durdurabileceğini de belirtmiştir (59).

Glutamat reseptörlerinin aşırı aktivasyonunun nöronal hasara yol açığının anlaşılmasından sonra inme, travma ve çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda da glutamat reseptörlerinin aşırı aktivasyonunun, nöronal ve glial hücre harabiyetine ve ölümüne yol açtığı bulunmuştur. Eksitotoksisite, birçok nöronal hastalığın ortak nedenidir (60).

2.3.3. Eksitotoksite Mekanizması

Merkezi sinir sisteminde eksitotoksisite ve katyon aracılı hücre harabiyetinde glutamat en sık görülen eksitator transmitterdir. Glutamat hücre içine Ca^{+2} girişine neden olarak nöronları zedelemektedir. Bunun sonucu olarak meydana gelen depolarizasyon ise voltaj bağımlı Ca^{+2} kanallarının açılmasına neden olmakta ve NMDA, AMPA ve kainat reseptörlerini uyarmaktadır. Çok hızlı oluşan glutamat artışı, NMDA reseptörlerinin aşırı uyarımına neden olarak yüksek Ca^{+2} girişine bağlı

olaylar zincirini başlatmakta ve buna bağlı olarak mitokondrial işlev kaybı, nükleer şişme ve membran hasarı görülmektedir (nekrotik hücre ölümü). Daha yavaş oluşan glutamat artışlarında hücre içine Ca^{+2} girişi olmasına rağmen mitokondri fonksiyonu bozulmaz, hücreler apoptozis ile ölümü seçmektedirler. Hücre içi yüksek Ca^{+2} seviyeleri fosfolipaz, proteaz ve endonükleaz gibi enzimlerin aktivasyonuna neden olmaktadır. Ekstansör aminoasitler (EAA), reseptörlere bağlanarak etkilerini gösterirler. Bu reseptörler 3 ana grupta sınıflandırılmaktadır. Bunlardan biri voltaja bağlı olarak çalışan N-methyl-D-Aspartate (NMDA) reseptörleri olup glutamik asit bağlanması sonrasında sodyum ve Ca^{+2} 'un hücre içine girişine, potasyumun ise hücre dışına çıkışına sebep olmaktadır. Bu grup reseptörler Mg^{+2} ile bloke edilmektedir (61). Diğer EAA reseptörü ise AMPA (amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole propionate) olup voltaja bağımsız olarak çalışmaktadır. Bunun aktivasyonu sonucunda sodyum hücre içine K^+ hücre dışına doğru çıkmaktadır (61). Ancak yapılan son çalışmalar bazı AMPA reseptörlerinde Ca^{+2} geçirgen olabileceğini göstermiştir (62). Bir diğer EAA reseptör grubunda metabotropik EAA reseptörleri olarak adlandırılan gruptur. Bu reseptörler ise aktive olduğunda fosfolipaz C'yi aktif hale getirerek hücre içinde bağlı olarak bulunan Ca^{+2} 'un, serbest hale getirilmesini sağlamaktadır.

Eksitotoksitenin epilepsi, nörodejeneratif hastalıklar, travma, serebral iskemi gibi birçok nörolojik hastalıkta doku hasarını arttırdığı düşünülmektedir (60). EAA'lerin tetiklediği hücre ölümünün sebebi halen tam olarak açıklanamamakla birlikte uzamış postsinaptik eksitasyon ile birlikte olan glutamat salıverilmesinin iki ana yol üzerinden etkili olduğu kanısına varılmıştır. Bunlardan birincisi AMPA reseptörleri aracılığı ile hücre içi Na^+ 'un erken dönemde aşırı derecede birikerek akut nöronal şişmeye sebep olması, ikinci ve daha geç olarak ise Ca^{+2} 'un hücre içine NMDA reseptörleri aracılığı ile girip nöronlarda metabolik bozukluklar kaskadına sebep olması şeklindedir (63).

Hücre içi Ca^{+2} iyonunun artması ile gelişen olaylar (63):

- 1- Fosfolipaz A2 aktivasyonu,
- 2- Serbest yağ asitlerinin serbestlenmesi,
- 3- Toksik eikosanoidlerin sentezi,
- 4- Serbest radikallerin ortaya çıkması,
- 5- Kalsiyuma bağımlı ATP aktivasyonu sonucu enerji rezervlerinin tükenmesi,
- 6- Reseptör proteinlerin kovalent modifikasyonu,
- 7- Hücre iskeletinin mikrotubuler ve nörofilament komponentlerinin modifikasyonu,
- 8- Mitokondrial oksidatif fosforilasyonun bozulması,
- 9- Aksonal dejenerasyon,
- 10- Proteaz, fosfataz ve endonükleaz gibi litik enzimlerin aktivasyonu.

Sitozolik kalsiyum iyon konsantrasyonundaki artışın sürmesi, birçok doku tipinde hücre ölümünün ortak sebebidir. Eksitotoksik hücre ölümünü önlemek amacıyla yapılan hücre kültürü çalışmalarında, kalsiyum kanal blokörleri denenmiştir. Bu ajanların hücre ölümlerini azalttığına dair birçok çalışma vardır (64,65,66).

Glutamat, plazma membran depolarizasyonu ile Ca^{+2} 'un hücre içine girişine, nöronal nitrik oksit sentaz gibi serbest radikal oluşturan sistemlerin aktivasyonuna ve sonuç olarak oksidatif strese bağlı nöronal ve glial hücre ölümüne neden olur (67). Glutamat, reseptörden bağımsız olarak glutatyonun (GSH) harcanmasıyla nöronlarda ve henüz miyelin yapmamış oligodendrositlerde hücre ölümünü de tetikler (68). Oksidatif stres sırasında reaktif oksijen ürünlerindeki artış ile birlikte GSH sentezinde başlangıçta gerekli olan sistin düzeyleri düşmekte ve hücre içi oksidan/antioksidan dengesi bozularak hasarlandırıcı etkiler ortaya çıkmaktadır (67).

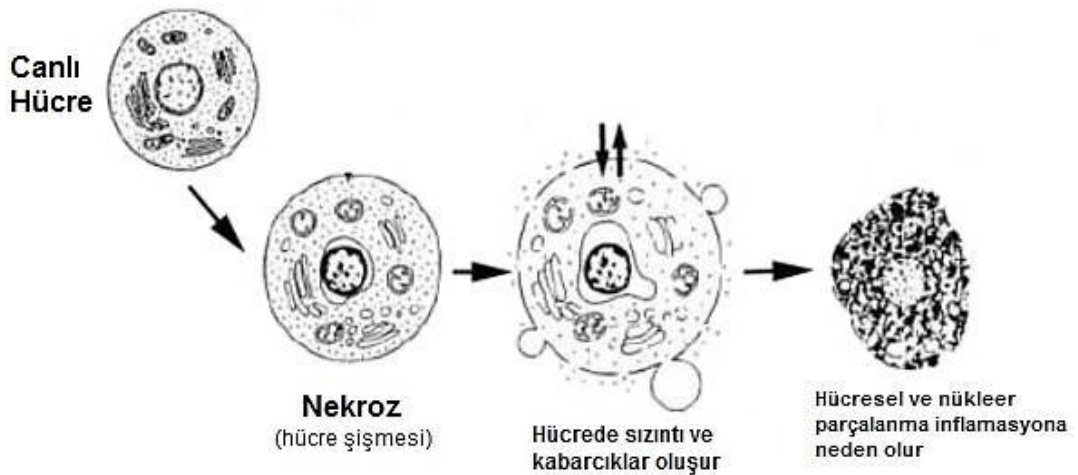
Glutamat taşıyıcılarının aktivasyonu hücre dışı ortamdaki aşırı glutamatın uzaklaştırılması için önem taşımaktadır. Halen bilinen 5 farklı glutamat taşıyıcısı

(GLT-1, GLAST, EAAC1, EAAT4 ve EAAT5) vardır. GLT-1 ve GLAST en fazla astrositler üzerinde bulunurlar. Bunların seviyelerindeki azalma, artmış hücre dışı glutamat seviyeleri ve eksitotoksik nörodejenerasyon ile sonuçlanır (69).

2.4. HÜCRE ÖLÜMÜ MEKANİZMALARI

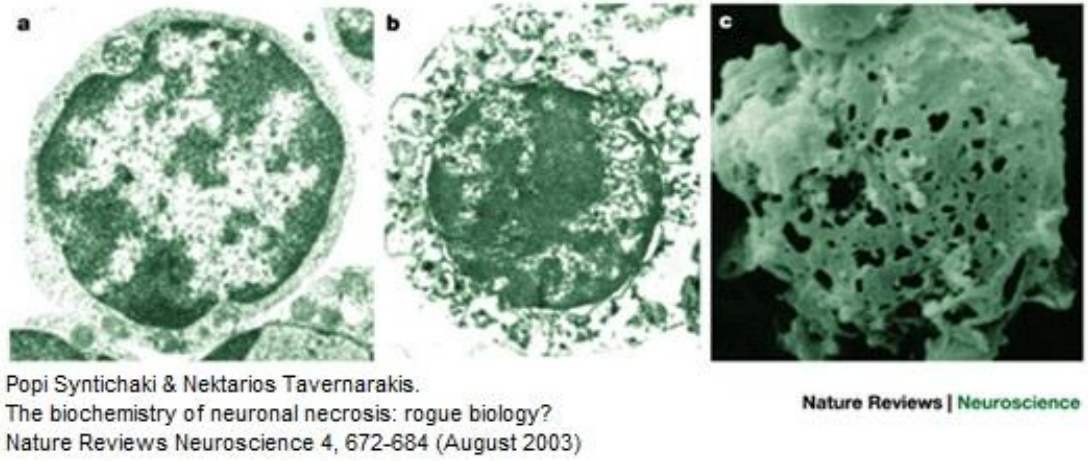
2.4.1. Nekroz

Nekroz hücre ölümünün akut şeklidir. Dışarıdan gelen hasarla plazma membranında oluşan değişiklikler sonucu meydana gelir. 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. Hücre zedelenmesi sonucu hücrede gelişen geri dönüşü olmayan hasar, hücrenin ölümüne neden olur (Şekil 2.8, 2.9). Nekrotik hücre ölümüne genellikle yüksek toksin seviyeleri gibi, ciddi hücresel stres neden olur. Nekroz programlanmış bir hücre ölümü değildir ve oluşmasında tanımlanabilen biyokimyasal bir yolak yoktur. Nekroz başladığında, terapötik müdahaleler için çok fazla olasılık yoktur (70).



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 2.8. Hücrenin nekroza gitmesi



Şekil 2.9. Bir hücrenin (a) nekroz sonrası ışık (b) ve elektron (c) mikroskobu görüntüsü

2.4.2. Apoptozis

Programlı hücre ölümü olarak da bilinen apoptoz 1964'te Lockshin tarafından ilk kez ipekböceği metamorfozu sırasında tanımlanmıştır. 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 kullanılsa da morfolojik olarak apoptotik hücreler gösterilmiştir (71).

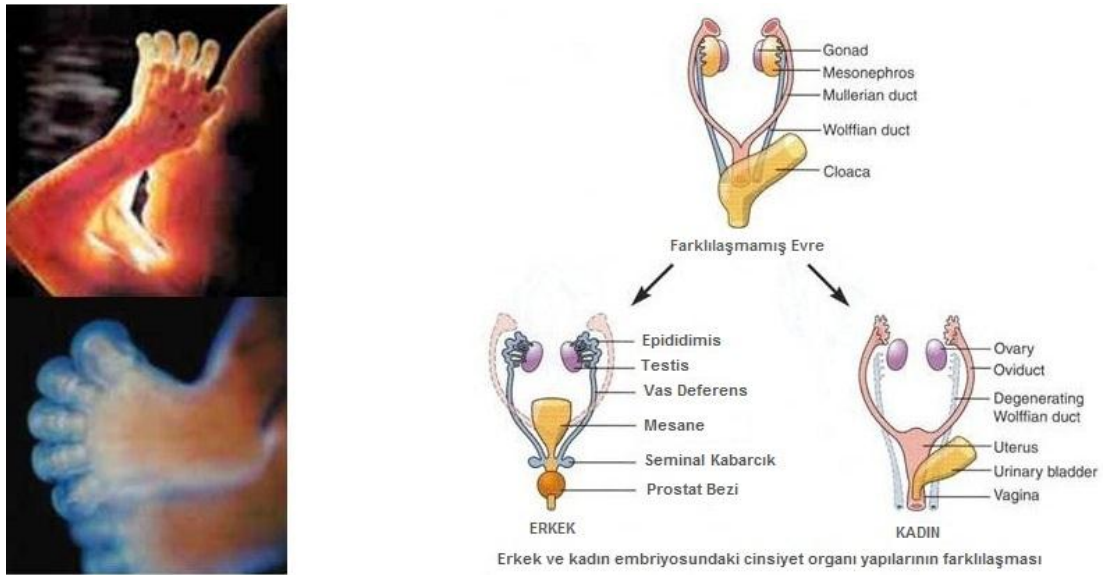
Yunancada 'apo' =ayrı, 'ptosis' =düşen anlamındadır. 1983 yılında Duke ve arkadaşları jel elektroforezi ile apoptozda endonükleazların aktive olarak DNA kırıklarına neden olduğunu göstermiştir. Böylece apoptotik hücre ölümünün ilk biyokimyasal kanıtı elde edilmiştir. Bu tarihten sonra apoptoz ile ilgili çalışmalar hızlı bir şekilde artmıştır (72,73). 1993 yılında Cohen, yüksek dozda kullanılan steroidlerin timus hücreleri üzerine etkilerini incelemiş ve timus hücrelerinin direkt olarak apoptozisi seçmediğini, hücre ölümüne neden olacak genleri oluşturarak hücreleri apoptozise yönlendirdiğini bildirmiştir (74). Böylece apoptozisin genler

tarafından düzenlenen bir hücre ölümü olduğu ortaya çıkmıştır (75). Apoptozis genetik olarak kontrol edilen fizyolojik mekanizmalarla düzenlenmektedir (75).

Apoptozisin nöronlar ile glial hücreleri de etkilediği bilinmektedir (76,77) ve glutamat, Ca^{+2} iyonları, serbest radikaller, Fas bağımlı protein faktörleri, hücre tarafından salıverilen sitokinler ve nitrik oksit apoptozisin oluşumundan sorumlu tutulmaktadır (78).

2.4.3. 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 (79) (Şekil 2.10). Ayrıca apoptozis her türlü neoplastik oluşumda; hem büyüme hem gerileme döneminde görülebilir (80). 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 (79).



Şekil 2.10. Apoptozisin görüldüğü fizyolojik olaylar

Bu anlamda apoptozis spesifik bir uyarana maruz kalan hücrenin, bu uyarana aktif olarak verdiği düzenleyici bir cevaptır (81). Apoptozisli hücreler sağlıklı doku içinde dağılmış şekilde veya belli bir alanda yoğunlaşmış şekilde bulunabilmektedir (74).

Apoptozisin görüldüğü başlıca olaylar şunlardır:

1. Fizyolojik olaylar

- a) Embriyogenez ve metamorfoz sürecinde programlı hücre yıkımı (fetüs implantasyonu, organogenezis ve gelişim sürecinde yaşanan involüsyon) (82).
- b) Erişkinde hormona bağımlı involüsyon (menstrüel siklusta endometriyum hücrelerinin yıkımı, menopozda folikül atrezisi, laktasyonun kesilmesinden sonra meme bezlerinin rejenerasyonu) (74).
- c) Sürekli çoğalan hücre gruplarında hücre sayısının dengelenmesi amacı ile hücre azaltılması (barsak kript epitelleri) (74).
- d) İmmün hücrelerin seçimi (hem B hem de T hücrelerinin sitokin depleksiyonundan sonra ve timusun gelişimi sırasında otoreaktif T hücrelerinin ortadan kaldırılması) (75).

2. Patolojik Olaylar

- a) Tümörlerde hücre ölümü (hem büyüme hem de regresyon aşamasında) (75).
- b) Hormonlara bağlı dokularda patolojik atrofi (kastrasyon sonrası prostat atrofisi, glukokortikoid kullanımı sonrası timusta lenfosit kaybı) (79,81).
- c) Parankimden zengin dokularda duktus tıkanmasından sonra patolojik atrofi (pankreas ve böbrek tübüllerinde olduğu gibi) (83).
- d) Sitotoksik T hücreleri ile oluşturulan hücre ölümü (otoimmün hastalıklar) (75).
- e) Çeşitli etkenlerle oluşan hücre ölümü (radyasyon, antikanser ilaçlar, hipertermi, hipoksi, travma) (83).

2.4.4. Apoptozis Mekanizmaları

Hücresinin apoptozise gidebilmesi için ilk önce, ilgili genetik mekanizmayı harekete geçirecek bir sinyal ile karşılaşması gerekmektedir. Bu sinyal hücre dışından veya hücre içinden gelebilmektedir. DNA hasarı, hücre içi pH değişiklikleri, hücre içi kalsiyum seviyesinde artış ve hücre siklus bozuklukları hücreyi apoptozise götüren hücre ölüm sinyallerini başlatmaktadır. Hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerinin spesifik ligandlarına bağlanması sonucu hücre içi proteazlar yani kaspazlar aktive olmaktadır.

Sistein proteazların bir ailesi olan kaspazlar apoptozisi gerçekleştiren proteolitik kaskadı düzenlemekte ve hücre içi hedef proteinleri yıkarak, hücre içi değişikliklere neden olmaktadır (84).

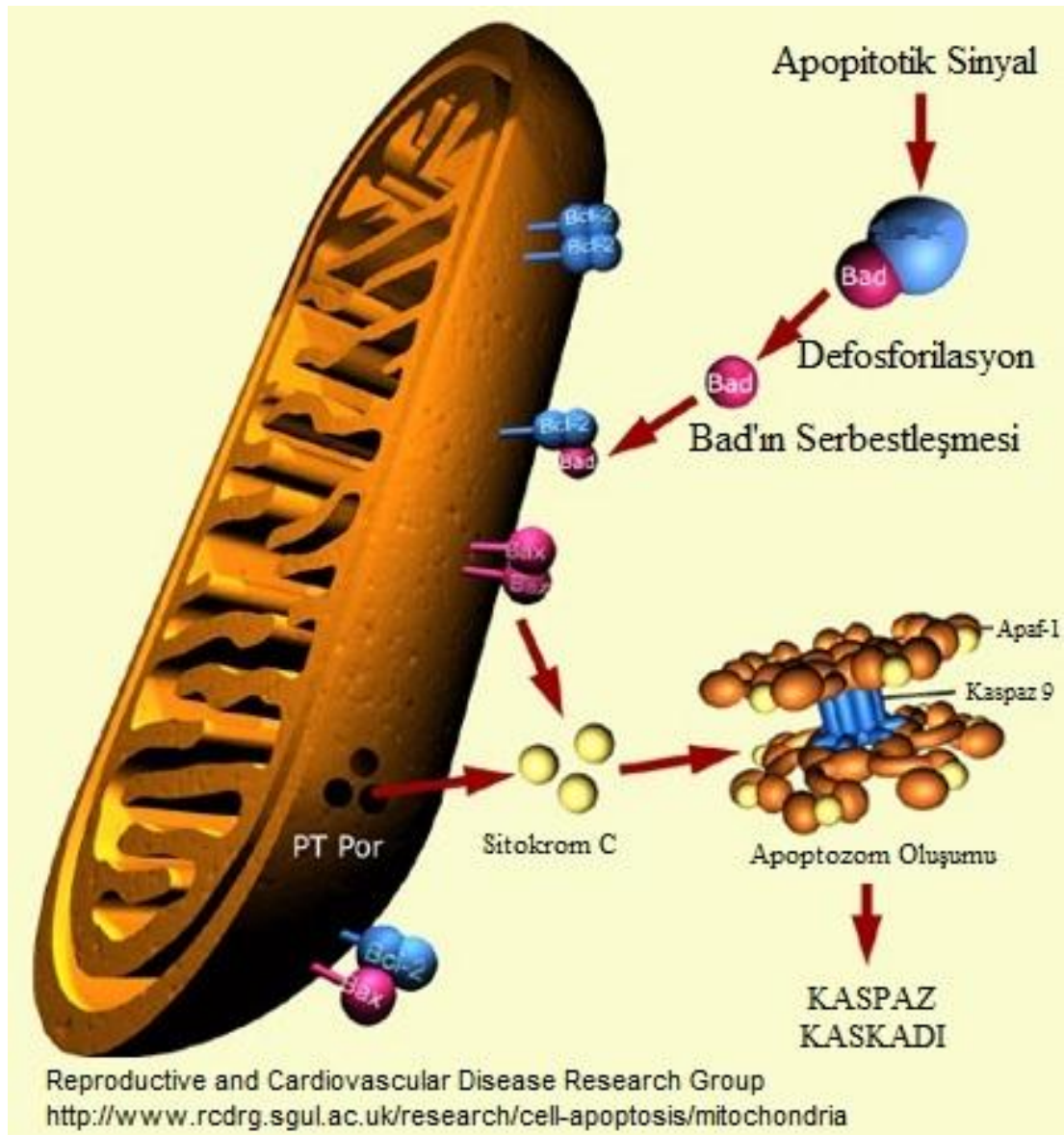
Apoptoziste üç farklı mekanizma vardır:

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

1. Mitokondri/Sitokrom-C aracılı apoptozisin oluşumu:

Mitokondri normal şartlar altında ATP oluşturmak üzere sitokrom-c bulundurmaktadır. Mitokondrial stres durumlarında serbestleşen sitokrom-c apoptotik hücre ölümünde kaspaz -3 aktivasyonunda önemli rol oynamaktadır. 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 apoptozisi indükleyici faktör (AIF) sitoplazmaya salıverilmektedir (85). Sitokrom-c'nin mitokondriden sitoplazmaya salıverilmesi apoptozis yoluna girmiş bir hücrede geri dönüşümsüz (irreversibl) bir döneme girildiğine işaret etmektedir.

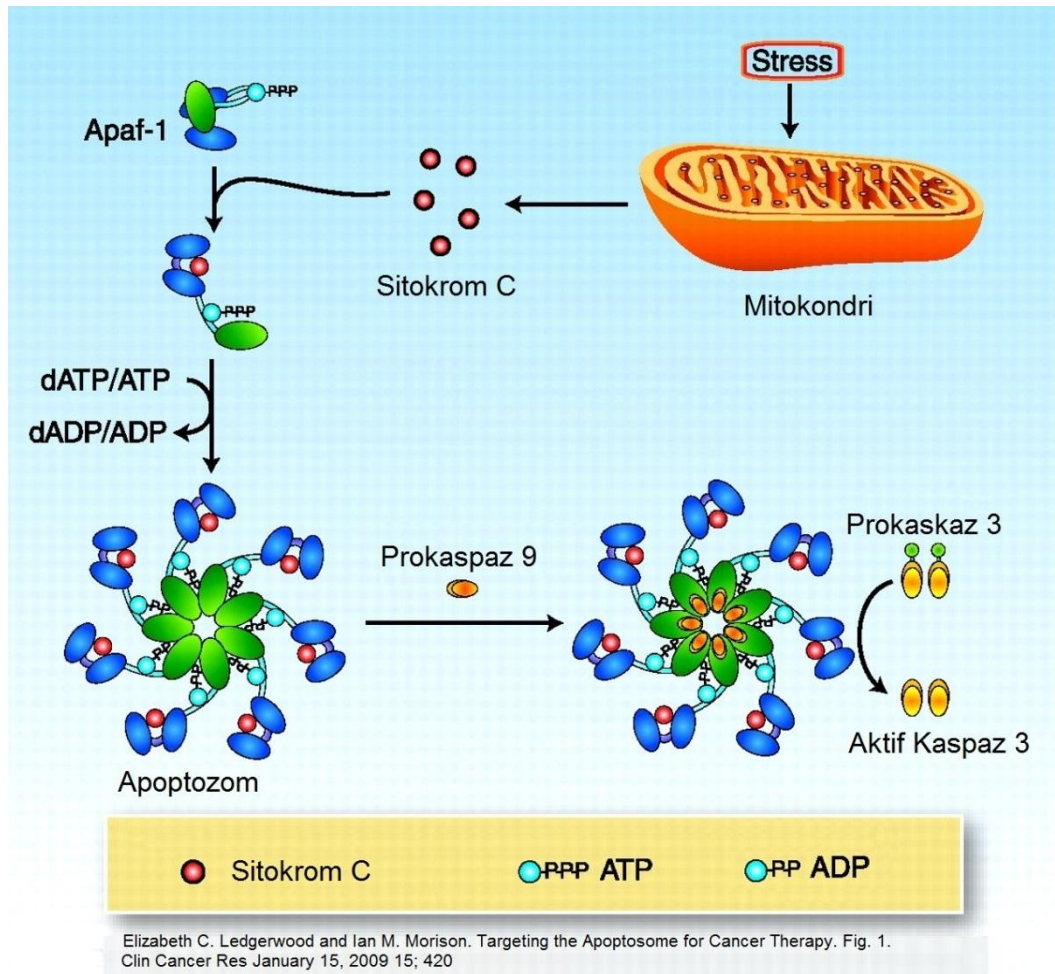
Mitokondriden sitokrom-c saliverilmesini sağlayan faktörler net olarak bilinmemektedir. Bax ve diğer Bcl-2 proteinleri por oluşturuucu proteinlerle yapısal benzerlik gösterdikleri için Bax proteininin mitokondri dış membranında bir transmembran por oluşturabileceği, böylece membran potansiyel kaybı ve 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.



Şekil 2.11. Mitokondri membranında por oluşumu

Aynı zamanda Bax ve Bad gibi bu proteinlerin geniş çapta PTP (permeability transition por) oluşumunu ve buna bağlı olarak sitokrom-c kaybı ve apoptozisin başlamasını da sağlayabildikleri düşünülmektedir (86,87) (Şekil 2.11). Bcl-2 proteinleri, neden olduğu hasarla mitokondride çatlaklar oluşturarak sitokrom-c salıverilmesine yol açar (88).

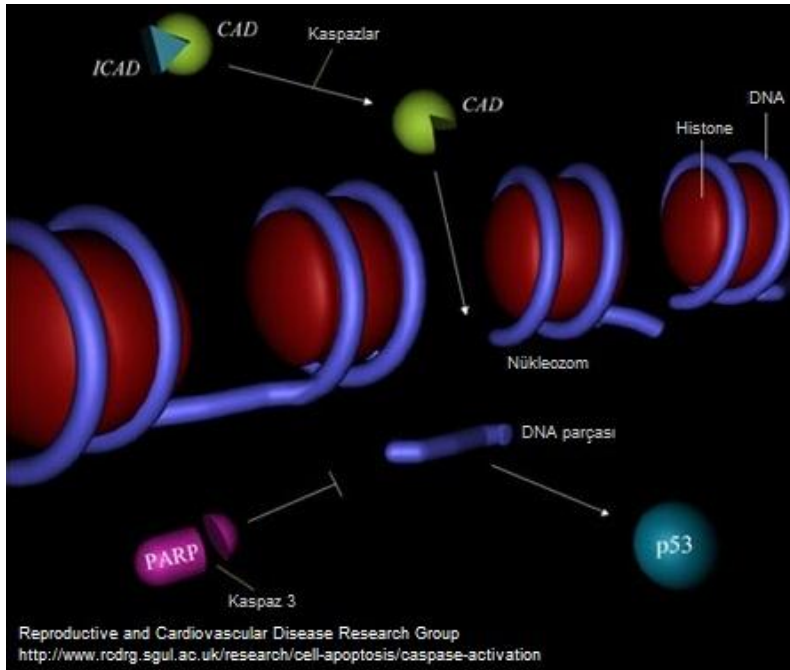
Serbestleşen sitokrom-c apoptotik hücre ölümünde kaspaz-3 aktivasyonu için önemli rol teşkil etmektedir (85). Sitokrom-c sitoplazmik protein olan APAF-1'e (apoptotic protease activating factor-1) bağlanır ve onu aktive eder, ardından ATP'nin de katılımıyla "apoptozom" adı verilen bir kompleks oluşur (89). Bu kompleks inaktif olan prokaspaz-9'un aktif kaspaz-9 haline dönüşmesini sağlar. Aktif kaspaz-9 ise efektör kaspazlardan prokaspaz-3'ü aktive etmektedir(Şekil 2.12).



Şekil 2.12. Apoptozom oluşumu

Kaspaz kaskadında terminal uç kaspaz-3'dür. Bu proteolitik aktivite ile sitoplazmada yapısal proteinlerin sindirimi, kromozomal DNA'nın degradasyonu ve hücrenin fagositozu sağlanmaktadır.

Aktif kaspaz-3, ICAD'ı (inhibitor of caspase activated DNase) CAD (caspase activated DNase) haline getirmektedir ve kaspaza bağlı DNA fragmentasyonu başlatmaktadır (90). Kaspazlar ayrıca DNA'nın tamirinde görevli olan enzimlerden PARP'ı (Poly ADP-ribose polymerase) da engellemektedir. Böylelikle DNA küçük parçalara ayrılmaktadır. (Şekil 2.13).

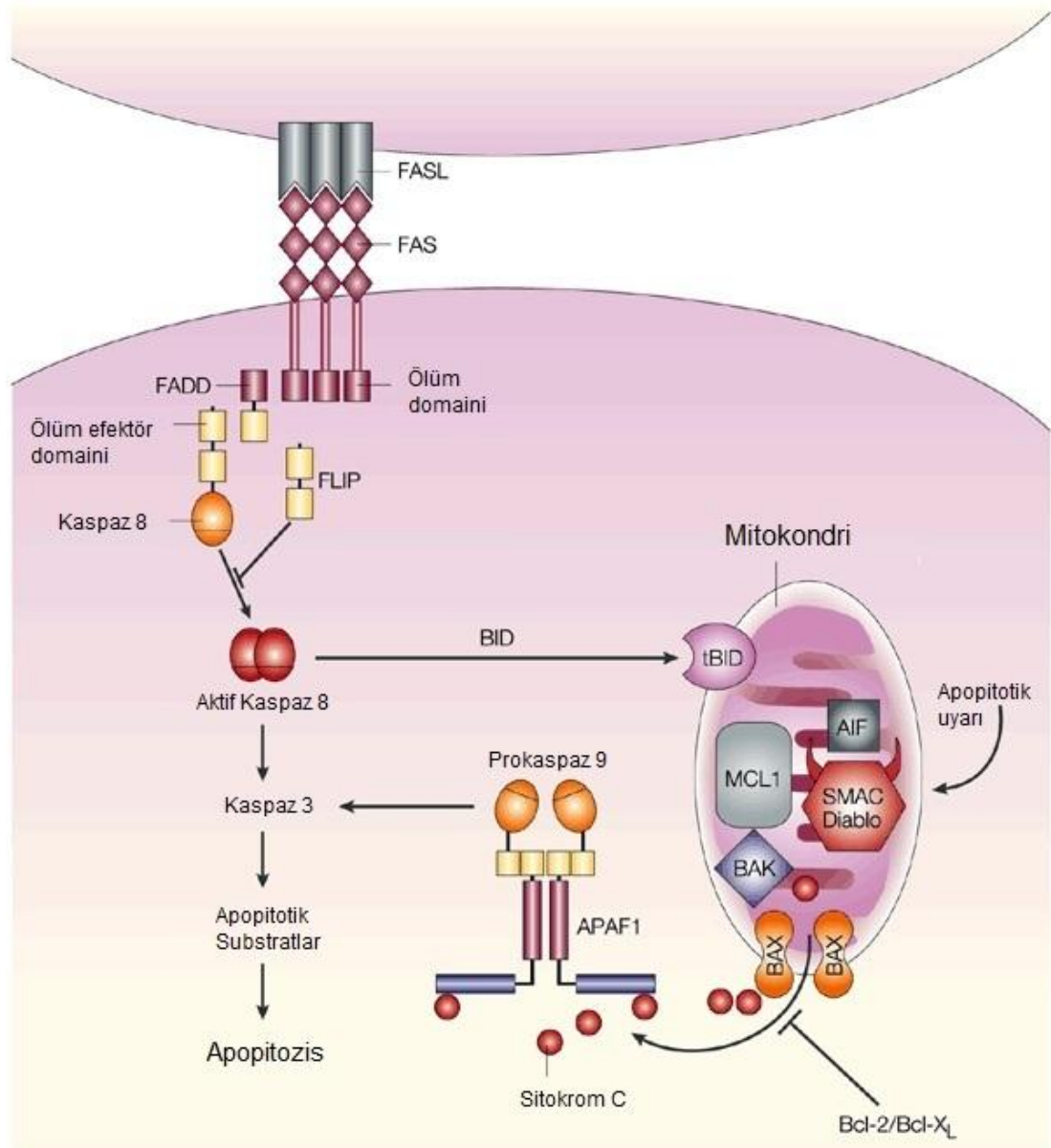


Şekil 2.13. DNA'nın fragmentasyonu

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 (91). Bu reseptörler TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor) gen ailesinin üyeleridir. Fas, FASR reseptörlerine ve TNF de TNFR-1 reseptörlerine bağlanmaktadır. Ligandları

ile birleşen reseptörler ölüm uyarıcılarını (FADD ve TRADD) tetikler. Bu sitozolik ölüm reseptörleri prokaspaz-8'e doğrudan bağlanmaktadır. Bu bağlanma kaspaz-8'in aktivasyonuna neden olmaktadır. Kaspaz-8 (kaspaz-9 gibi) diğer kaspazları uyarmakta ve hücrenin fagositozuna yol açmaktadır (91)(Şekil 2.14).



Richard M. Pope. Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis. Nature Reviews Immunology 2, 527-535 (July 2002)

Nature Reviews | Immunology

Şekil 2.14. Dış sinyallerle apoptozisin tetiklenmesi

3. Endoplazmik retikulum aracılı apoptozisin oluşumu:

ER; protein sentezi, protein katlanması, strese karşı hücrel cevap ve hücre içi Ca^{+2} seviyelerini düzenler. Uzun süren ER stresi hücre ölümüne katkıda bulunmaktadır ve birçok farklı nörodejeneratif hastalığın patofizyolojisi ile de bağlantılıdır. ER apoptotik sinyallerin yayılmasında, kaspazların ve diğer proteazların aktivasyonunda önemli bir rol oynayabilmektedir. Son zamanlarda amiloid-s nörotoksitesine katkıda bulunan kaspaz-12'ye bağımlı ER aracılı apoptotik yol tarif edilmiştir (92). Bu yol mitokondrial/sitokrom-c ve ölüm reseptör aracılı apoptozisten farklı bir yoldur. Kaspaz-12, ER membranında lokalize olan ve ER aracılı apoptozis için esas teşkil eden bir kaspazdır. Son çalışmalarda Ca^{+2} seviyelerinin ve kalpainin ER'yi etkilemesi ile prokaspaz-12'nin aktiflendiği gösterilmiştir.

Aktiflenmiş kaspaz-12 sitoplazmaya yönelir. Kaspaz-9 ile etkileşerek sitozolik kaspaz kaskadını aktive etmektedir (93). Böylece ER stresinin oluşturduğu apoptozis kaskadını başlatmaktadır.

2.4.5. Apoptozisde Hücre İçi Enzimler 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 (74). Sitoplazmadaki Ca^{+2} iyonu miktarındaki hafif artış, c-myc, c-fos gibi ısı şok proteinlerini harekete geçirir ve hücrenin apoptozise gitmesine neden olur. Ca^{+2} adenilat siklazları aktive ve inhibe etme yeteneğine sahiptir (79). 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 etkin hale getirerek sitoplazmik proteinlerin parçalanmasına ve apoptozise özgü internükleozomal DNA kırıklarına neden olur (94).

Kalsiyum iyonları hücre içinde eşit oranda dağılmamıştır. ER içinde sitoplazmadan daha fazla Ca^{+2} iyonu mevcuttur. ER'de yüksek Ca^{+2} iyonu bulunmasını sağlayan ve sitoplazmadan Ca^{+2} taşıyan Ca^{+2} -ATPase pompasının inhibe edilmesi durumunda, sitoplazmada Ca^{+2} yoğunluğunun artması ile hücrenin apoptozise gittiği gözlenmiştir (79).

Ca^{+2} iyonu, inaktif durumdaki endonükleaz, proteaz, transglutamaz, fosfolipaz gibi latent enzimleri aktive ederek apoptozise neden olur (94).

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(94,95,96,97).

Transglutamazlar: Apoptoziste hücreler büzüşür ve küçük parçalara ayrılır. Bu parçalar; transglutamazların yaptığı protein çapraz bağlanmaları ile kimyasal maddelere karşı dayanıklı hale getirilir (75,79).

Proteazlar: Proteazlar histonları ve kromatin yapısını stabilize eden proteinleri parçalarlar (97). Kalsiyum bağımlı nötral bir proteaz olan 'kalpin' hücrenin iskelet yapısını bozar (94). Lizozomal bir proteaz olan katepsin-D apoptozisin geç evresinde ortaya çıkan bir endopeptidazdır ve lizozomların proteolitik aktivitesinin oluşumunda önemlidir(74,79).

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 (79). Apoptotik indüksiyon olduğunda bu enzim etkilenir ve zar asimetrisi bozulur. Makrofajlar hücreyi yabancı bir hücre olarak algırlar ve fagosite ederler (98).

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 (75,95).

2.4.6. 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 sıkıştıkları 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 immun sistemi enflamasyon yönünde uyarımasıdır. 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 (Şekil 2.15, 2.16);

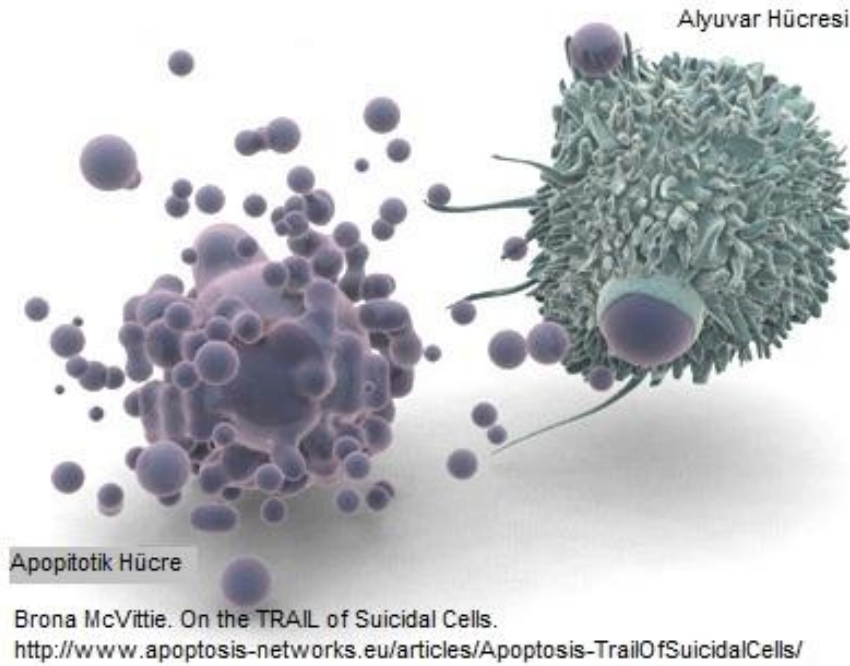
1. Yüzey Organellerinin Kaybı: Apoptozise uğrayan hücrenin komşu hücrelerle bağları kesilir. Hücre yüzeyindeki mikrovillüsle ve diğer hücrelerle yaptıkları özel bağlar ortadan kalkar, hücre yüzeyi yuvarlaklaşır (99,96).

2. Hücre Büzülmesi: Apoptotik hücre komşu hücreye göre daha küçük ve sitoplazması daha yoğundur. ER dışında diğer hücre organelleri yapılarını korur (74).

Sitoplazma yoğunluğu arttığı için organeller kalabalık görünür. Hücre zarı sağlam olduğundan nekrozda olduğu gibi bir inflamatuvar reaksiyon gözlenmez (96,75,99).

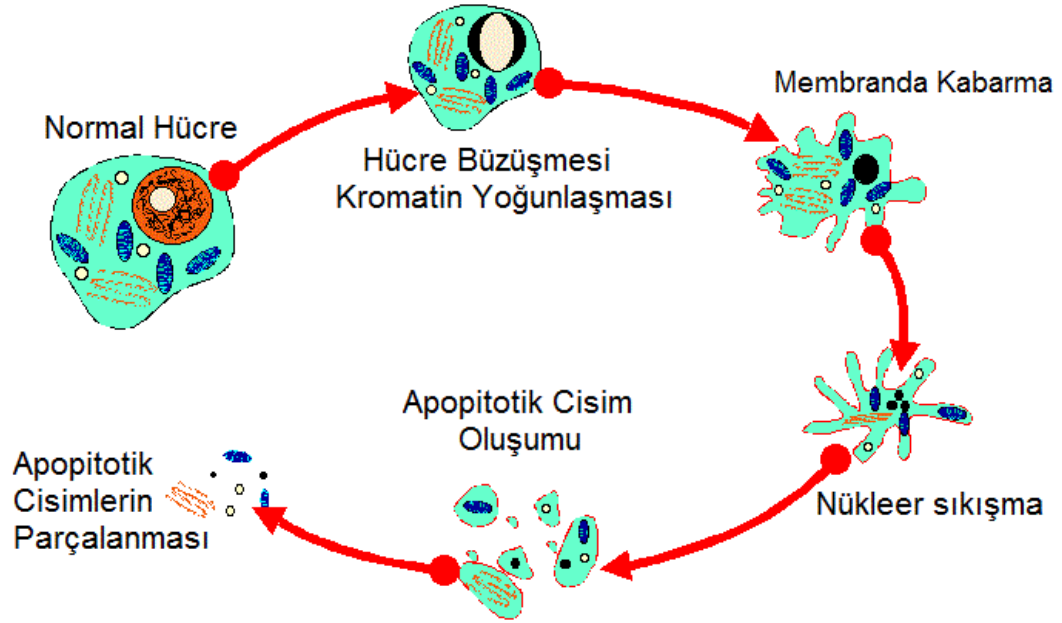
3. Kromatin Yoğunlaşması: Önemli yapısal değişiklikler çekirdekten başlayarak izlenir. Çekirdek apoptoziste odak noktasıdır. Hücreden hücreye değişmekle birlikte genellikle çekirdek büzülür (74,96). Kromatin çok yoğun bir hale gelir ve parçalar halinde bir araya toplanır. Çekirdek porları seçilemez. Çekirdek şekli düzensizleşir ve ileri evrede küçük çekirdek parçalarına bölünür. Çekirdekçik genişler ve granülleri kaba granüller halinde dağılır (75,96,99).

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 (75,99). (Şekil 2.15)



Şekil 2.15. Hücrenin apoptozisi

Apoptozis (Programlanmış Hücre Ölümü)



Apoptosis. August 20, 2011. <http://mutation.blogspot.com/2011/08/apoptosis.html>

Şekil 2.16. Apoptoziste görülen morfolojik değişiklikler

Apoptozis için morfolojik değişimler hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, hücre membran tomurcuklanması olurken fosfatidilserin de açığa çıkar. Sağlıklı hücrelerde plazma membranının içinde bulunan fosfatidilserin apoptotik hücrelerde plazma membranının dış yüzünde bulunur ve fagositik hücreler için sinyal görevi görür (100).

2.4.7. Apoptozis ve Nekroz Arasındaki Farklar

Apoptozis, hücrede yarattığı bu değişikliklerle nekrozun bir parçasıymış gibi algılanabilir. Ancak nekrozdan farkları şunlardır:(Şekil 2.17).

Fiziksel Farklılıklar

1. Nekroz bileşik hücre gruplarını etkiler, oysa apoptoziste tek tek hücreler etkilenir.
2. Nekroz fizyolojik olmayan uyaranlarla başlar, apoptozis fizyolojik uyaranla da başlayabilir (hormonal dengenin değişmesi) (79,99).
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 (79,80,81).

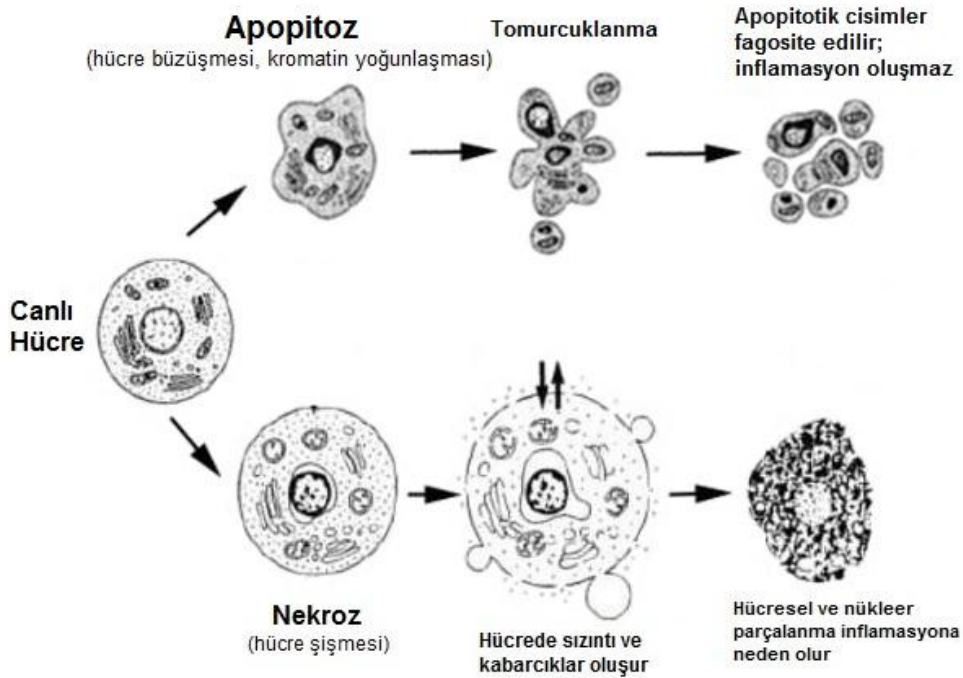
Morfolojik Farklılıklar

1. Nekrozda zar bütünlüğü bozulur, apoptoziste zarda kabarcıklar görülür fakat asla zar bütünlüğü bozulmaz (74,101).
2. Nekroz sitoplazma ve mitokondride şişme ile başlar, apoptoziste ise sitoplazmada büzülme ve çekirdek yoğunlaşması görülür (74,81).
3. Nekroz total hücre parçalanması ile sonlanır, oysa apoptozis hücrenin daha ufak fragmanlara dönüşmesi ile sonlanır (apoptotik cisimler) (81).
4. Nekrozda hücre zarında vezikül formasyonu yoktur, total parçalanma olur; oysa apoptoziste zara bağlı veziküller oluşur (75).
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 (74,75).

Biyokimyasal Farklılıklar

1. Nekrozda iyon dengesi kaybolur, apoptoziste ise sıkı bir şekilde kontrol edilen enzimatik olaylar mevcuttur (99).

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 (75).
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 (95,99).
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) (95,98).
5. Nekroz sırasında nonspesifik zar parçalanması olurken, apoptoziste zar asimetrisinde değişiklikler olur (fosfatidilserin zarın sitoplazmik yüzünden ekstrasellüler yüzüne doğru yer değiştirir). Bu değişiklik apoptotik hücrenin inflamatuvar reaksiyon oluşturmada lokal hücrelerce tanınıp, fagosite edilmesini sağlar (75).



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 2.17. Apoptozis ile nekroz arasındaki farklar

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. TMZ saf maddesi Mustafa Nevzat İlaç Sanayii Anonim Şirketi kalite kontrol biriminden temin edilmiştir. Uygulama sırasında TMZ bidistile saf suda çözüldü ve her iki hücre serisinde de denenmek üzere ardışık dozlarda hazırlanmıştır. Her iki hücre serisinde de glutamat ve H₂O₂ toksisitesi için doz-cevap sonuçları alındı. Hücre tiplerinde alınan iki anlamlı toksik doza karşı TMZ'nin canlılık üzerine anlamlı farklı dozlarının koruyuculuğu olup olmadığına belirli testlerle bakılmıştır. 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) Trypsin EDTA, %0.05, Gibco
- 4) DMSO, Sigma
- 5) Antibiyotik-Antimikotik, Gibco 100X
- 6) Caspase 3 colorimetric kit, Invitrogen
- 7) MTT, Roche
- 8) PBS, Santa Cruz 10X liquid
- 9) Biüret çözeltisi
- 10) Bovine Serum Albumine, %10, Beit Haemek
- 11) Acridine orange, Invitrogen
- 12) Hidrojen Peroksit, Acros
- 13) Mono Sodyum Glutamat, Invitrogen
- 14) Trimetazidin, Mustafa Nevzat İlaç San.

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 eklenip ve hücreler iyice süspanse edildikten sonra, hücreler 75 cm²'lik flasklara aktarılmıştır. Ardından mikroskop altında incelenmiştir. Hücrelerin yapışması için 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 süspanسیونunun üzerine 4 ml medyum eklenmiş ve süspanسیون 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 flasklara aktarılması şeklinde yapılmıştır. Çalışmadan bir önceki pasajın semi-konflens 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 toksik madde olarak kullanılacak H₂O₂ ve MSG için literatürde çok farklı doz aralıkları ve uygulama şekilleri bulunmaktadır. Bu doz 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

TMZ, H₂O₂ ve MSG’nin geniş aralıklı olarak 15 farklı dozu hazırlanmıştır.

- **TMZ için;** 100 - 50 - 25 - 10 - 5 - 2,5 - 1 - 0,5 - 0,25 - 0,1 - 0,05 - 0,025 - 0,01 - 0,005 - 0,001 mM
- **H₂O₂ için;** 2 - 1,5 - 1 - 0,75 - 0,5 - 0,375 - 0,25 - 0,188 - 0,125 - 0,1 - 0,05 - 0,025 - 0,01 - 0,005 - 0,001 mM
- **MSG için;** 1000 - 800 - 600 - 400 - 200 - 100 - 80 - 60 - 40 - 20 - 10 - 7,5 - 5 - 2,5 - 1 mM

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 TMZ, H₂O₂ ve MSG 1/1 oranında olacak şekilde bu iki hücre serisi üzerine eklenmiştir. 24 saat sonunda TMZ, H₂O₂ ve MSG'nin 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 H₂O₂ ve MSG'nin 7 farklı dozu belirlenmiştir.

SH-SY5Y hücre serisinde:

- **TMZ için;** 25 - 10 - 5 - 1 - 0,1 - 0,01 - 0,001 mM
- **H₂O₂ için;** 0,125 - 0,1 - 0,05 - 0,025 - 0,01 - 0,005 - 0,001 mM
- **MSG için;** 200 - 100 - 80 - 60 - 40 - 20 - 10 mM

T98G hücre serisinde:

- **TMZ için;** 25 - 10 - 5 - 1 - 0,1 - 0,01 - 0,001 mM
- **H₂O₂ için;** 0,75-0,5-0,375-0,25-0,188-0,125-0,1 mM
- **MSG için;** 200-100-80-60-40-20-10 mM

Yine sırasıyla 300000 hücre/ml ve 100000 hücre/ml konsantrasyonlarında SH-SY5Y ile T98G hücreleri ekilmiş 96 kuyulu plakanın her bir kuyusuna TMZ, H₂O₂ ve MSG 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 (102).

MTT solüsyonunu eklemeyen önce hücrelerin üzerindeki medyum tazelenmiş ve MTT solüsyonu son konsantrasyon 1/10 olacak şekilde bütün örneklerle 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 çözünmüş formazan miktarı ELİSA okuyucuda 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

3.3.3. Deneyin 3. Aşaması: TMZ'nin Koruyuculuğunun Araştırılması

Bu aşamada ilk olarak TMZ'nin önceki testlerde toksisite göstermeyen doz aralığından belirlenen 5 farklı dozunun (0,5-0,1-0,05-0,01-0,005 mM) MSG ve H₂O₂'nin toksik iki dozuna karşı koruyuculuk etkisinin olup olmadığı her iki hücre serisinde de MTT testi ile araştırılmıştır.

Bu testin sonucuna göre TMZ'nin iki farklı dozunun MSG ve H₂O₂'nin toksik iki dozuna karşı etkileri kaspaz-3 kolorimetrik ELİSA yöntemiyle kaspaz-3 seviyeleri ölçülerek ve floresan akrinin oranj boyama yöntemi ile de morfolojik değişiklikleri değerlendirilerek bakılmıştır.

Kolorimetrik Kaspaz 3 ELİSA Metodu:

Kaspaz-3 seviyeleri İnvitrogen kaspaz-3 kolorimetrik ölçüm kiti kullanılarak ölçülmüştür. Yöntemin prensibi kaspaz-3'ün substratı olan N-Asetil-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilid'den (Ac-DEVDpNA) kromofor p-nitroanilinin (pNA) serbestleşmesinin spektrofotometrik olarak ölçümü esasına dayanmaktadır.

SH-SY5Y ve T98G hücreleri sırasıyla 900.000 ve 400.000 sayıda 25 cm²'lik kültür kaplarına ekilmiştir. Ekilen hücreler 1 gün inkübasyondan sonra 1 gün de ilaç uygulamasına bırakılmıştır. TMZ'li medyum toksik madde uygulamalarından 2 saat önce hücrelerin bulunduğu medyuma 1'e 1 oranında eklenmiştir. İlaç uygulamasının sonunda ELİSA kitinin içerisinde bulunan protokol uygulanmıştır:

1. Hücreler kültür kaplarından tripsin ile çıkarılıp, medyumları ile birlikte 15 ml'lik deney tüpülerine toplanmış ve 1500 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir.
2. Süpernatantları atılarak hücrelerin üzerlerine 1,5 ml medyum eklenip süspansiyon edildikten sonra ependorf tüplerine aktarılmıştır.
3. Ependorf tüpündeki hücre süspansiyonu 4000 rpm'de 4 dakika santrifüj edilmiştir.
4. Süpernatantları atıldıktan sonra pellet üzerine 50 µl Cell Lysis Buffer eklenmiş ve vorteks ile hafifçe süspansiyon edildikten sonra buzun üzerinde 10 dakika inkübe edilmiştir.
5. Örnekler 1 dakika 11.000 rpm'de santrifüj edildikten sonra süpernatantları ayrı ependorflara aktarılmış ve buzun üzerine konulmuştur.
6. Herbir örnekten 15 µl protein süspansiyonu alınıp 96 kuyucuklu ELİSA plakasının kuyucuklarına konulmuştur. Plakanın başka kuyucuklarına da %10'luk sığır serum albümin solüsyonundan hazırlanan 0-1-2-4-8-16-32 mg/ml konsantrasyonlarındaki kalibratörler eklenmiştir. Örneklerin üzerlerine 90 µl Biüret solüsyonu eklendikten sonra 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.

7. Örneklerin protein miktarları, kalibrasyonlar ile ELİSA okuyucuda 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür.
8. Ependorf tüplerindeki geride kalan protein solüsyonları içeriğindeki protein miktarları Cell Lysis Buffer solüsyonu ile seyreltilerek eşitlenmiştir.
9. Protein solüsyonlarından 50 µl alınıp 96 kuyucuklu ELİSA plakasının kuyucuklarına yerleştirilmiştir.
10. Üzerlerine %1 1M'lık DTT içeren 2x Reaction Buffer solüsyonundan 50 µl eklenmiştir.
11. Ardından örnekler 4 mM'lık DEVD-pNA substratından 5 µl eklendi ve 37°C de 2 saat inkübe edilmiştir.
12. 96 kuyucuklu plakadaki örnekler ELİSA okuyucuda 405 nm dalga boyunda okutulmuştur.
13. Gruplardaki kaspaz-3 seviyelerinin kontrol grubuna göre kaç kat artış veya azalış gösterdikleri hesaplanmıştır.

Akridin Oranj ile Floresan Boyama:

Akridin orange plazma membranından girmekte ve hücre içi nükleik asitlere tutunarak, onları boyamaktadır. Yeşil ve turuncu floresan ışık oluşmaktadır.

SH-SY5Y ve T98G hücreleri sırasıyla 600.000 ve 200.000 sayıda 6'lık kültür kaplarına ekilmiştir. Ekilen hücreler 1 gün inkübasyondan sonra 1 gün de ilaç uygulamasına bırakılmıştır. TMZ'li medyum, toksik madde uygulamalarından 2 saat önce hücrelerin bulunduğu medyuma 1'e 1 oranında eklenmiştir. Daha önceden fosfat tampon solüsyonu (PBS) içinde 0,3 mg/ml konsantrasyonda 100 kat olarak hazırlanmış stok akridin oranj boyası, yine PBS içinde 2 kat olacak şekilde seyreltilmiştir. Hücrelerin içinde bulunduğu medyuma 1'e 1 oranında eklenmiştir. 10 dakika beklendikten sonra floresan görüntüleme sistemiyle gruplar incelenerek, görüntüleri alınmıştır. Gruplardaki hücrelerin morfolojik yapıları ve yoğunlukları kontrol grubuna göre kıyaslanarak değerlendirilmiştir.

3.4. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Deney sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi, SPSS (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 ve $p < 0,005$ anlamlı fark olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. TMZ, H₂O₂ ve MSG’NİN TOKSİK DOZLARININ GÖZLEMSEL OLARAK BELİRLENMESİ

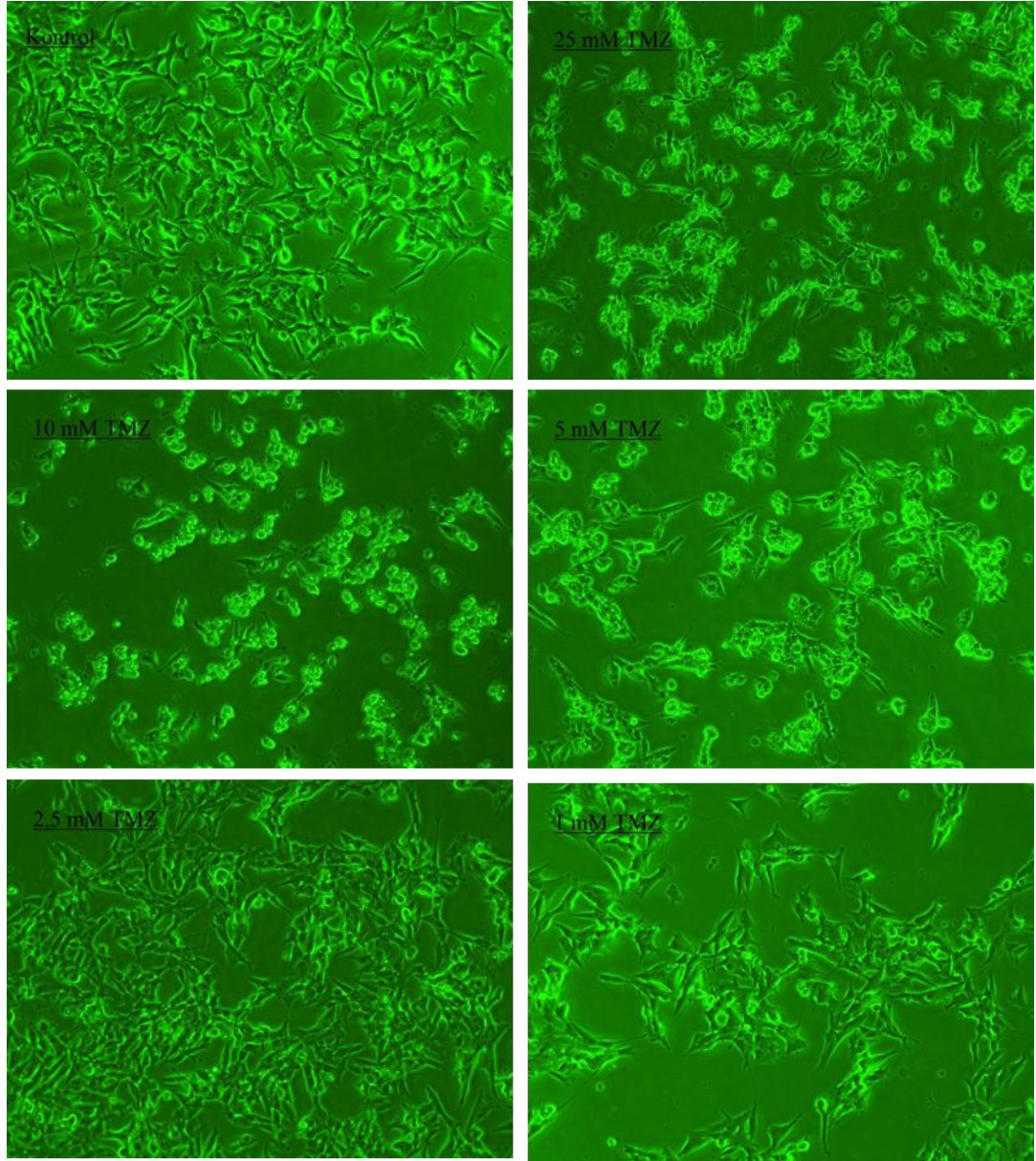
Faz kontrast invert mikroskop altında yapılan bu çalışma deneyin ileriki aşamaları için çok önem arz etmektedir. Buradan alınacak sonuçlar doğrultusunda diğer aşamalara geçilmiştir. Bu aşama da diğer aşamalar gibi 3 kez tekrarlanmıştır. Her iki hücre tipinde TMZ, H₂O₂ ve MSG’nin farklı dozlarının hücre morfolojileri ve sayıları üzerindeki etkileri görsel olarak incelenerek toksik etkiyi başlatan doz aralığı belirlenmiştir.

4.1.1. SH-SY5Y ve T98G Hücre Serileri İçin TMZ’nin Toksik Doz Aralığı

Nöron kaynaklı SH-SY5Y hücre serisi incelendiğinde TMZ’nin hücresel morfolojiyi bozup, aynı zamanda hücresel tutunmayı da etkileyip hücrelerin tutundukları yerden kalkmasını sağlayan etkinin 5 mM doz seviyesinde başladığı ve yükselen dozlarda bu etkinin giderek arttığı görülmüştür. 25 mM dozu ve bu dozdan sonraki yüksek dozlarda ise çok az sayıda tutunan hücrenin görülmesine rağmen genel olarak hücre yapılarının tamamen bozulup, morfolojik yapılarını kaybedikleri ve düzensiz hücre membranına sahip yuvarlak bir hal aldıkları görülmüştür (Şekil 4.1).

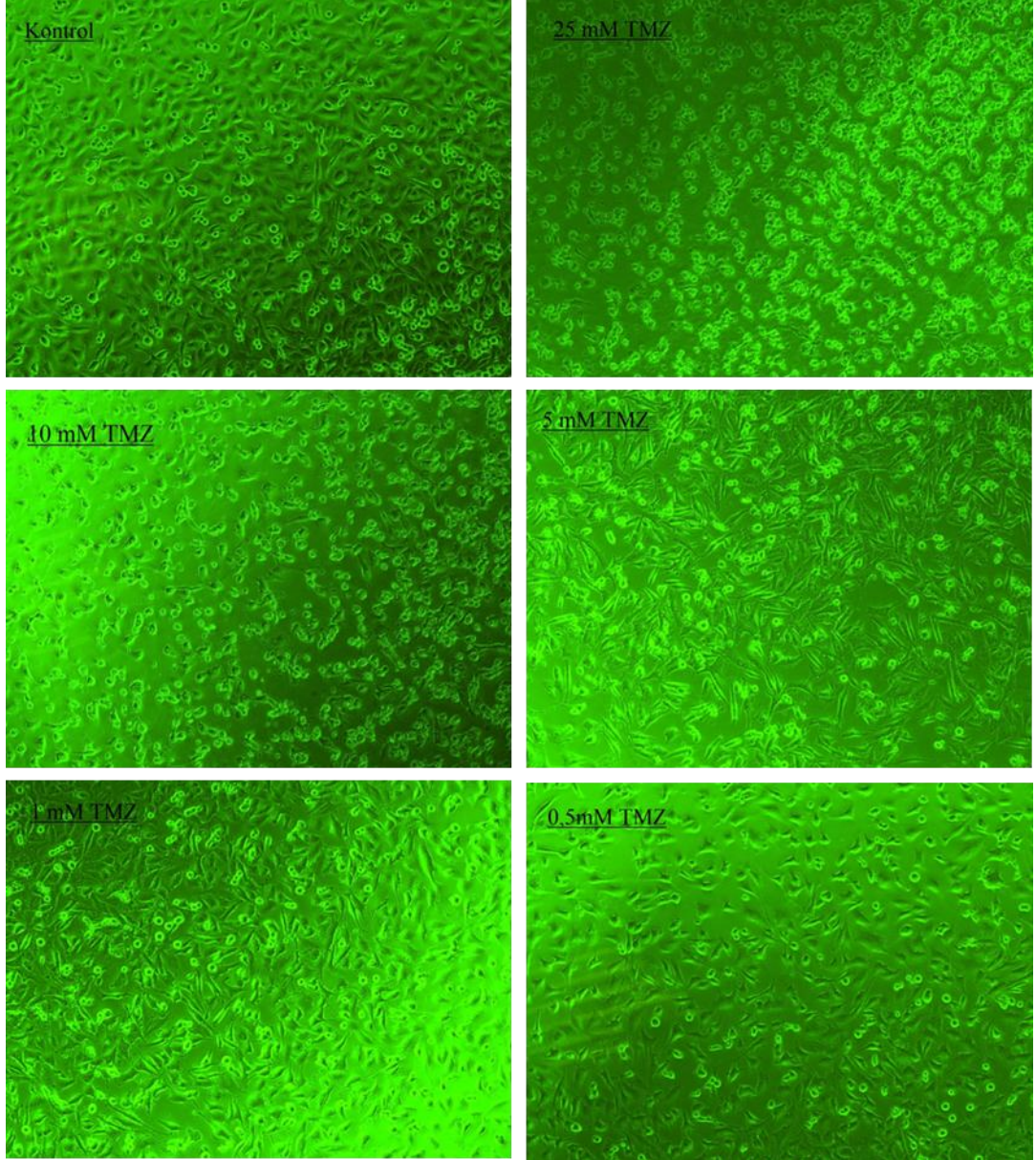
Glial kaynaklı T98G hücre serisi incelendiğinde ise TMZ’nin hücresel morfolojiyi bozup, aynı zamanda hücresel tutunmayı da etkileyip hücrelerin tutundukları yerden kalkmasını sağlayan etkinin 5 mM doz seviyesinde başladığı ve yükselen dozlarda bu etkinin giderek arttığı görülmüştür. 25 mM dozu ve bu dozdan sonraki yüksek dozlarda ise çok az sayıda tutunan hücrenin görülmesine rağmen genel olarak hücre yapılarının tamamen bozulup, morfolojik yapılarını kaybedikleri ve düzensiz hücre membranına sahip yuvarlak bir hal aldıkları görülmüştür (Şekil 4.2).

TMZ'nin her iki hücre tipinde de yaklaşık olarak aynı dozlarda etki yaptığı görülmüştür. TMZ'nin toksik doz sınırının altındaki dozlarda ise hücre proliferasyonuna etkisi görülmemiştir. Hücreler daha çok bulundukların kabın orta kısmında çoğalıp, kolonileşmiştir. TMZ'nin 10 mM dozunda her iki hücre serisinde de orta kısımda yoğunlaşan hücrelerin dahi tamamen etkilendiği gözlenmiştir.



Şekil 4.1. Nöron hücreleri üzerinde TMZ'nin etkilerinin gösterilmesi

Bu çalışmanın sonucunu doğrulamak için yapılacak olan MTT testi için TMZ'nin 25 - 10 - 5 - 1 - 0,1 - 0,01 - 0,001 mM'lık dozlarının her iki hücre tipinde de uygulanmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.2. Glioma hücreleri üzerinde TMZ'nin etkilerinin gösterilmesi

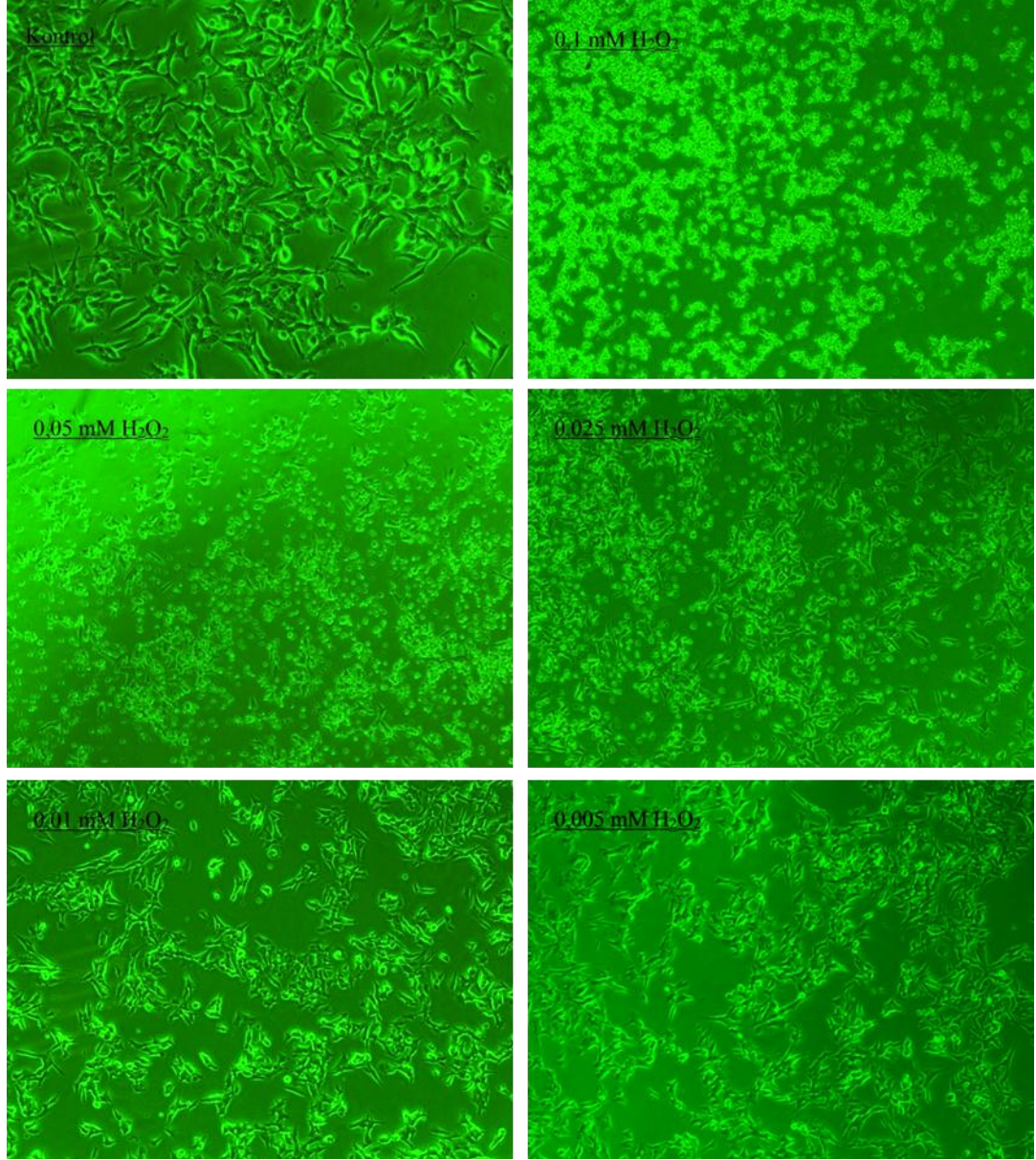
4.1.2. SH-SY5Y ve T98G Hücre Serileri İçin H₂O₂'nin Toksik Doz Aralığı

Daha önceki çalışmalar incelendiğinde H₂O₂ ile yapılan toksik modellemenin her iki hücre serisinde de yapıldığı görülmektedir. Ancak toksik doz sınırının çalışmadan çalışmaya farklılık göstermesi nedeniyle çalışmalardaki toksik doz seviyeleri göz önüne alınarak H₂O₂'nin toksik dozunun belirlenmesi için her iki hücre serisinde de geniş bir doz aralığı uygulaması yapılmıştır.

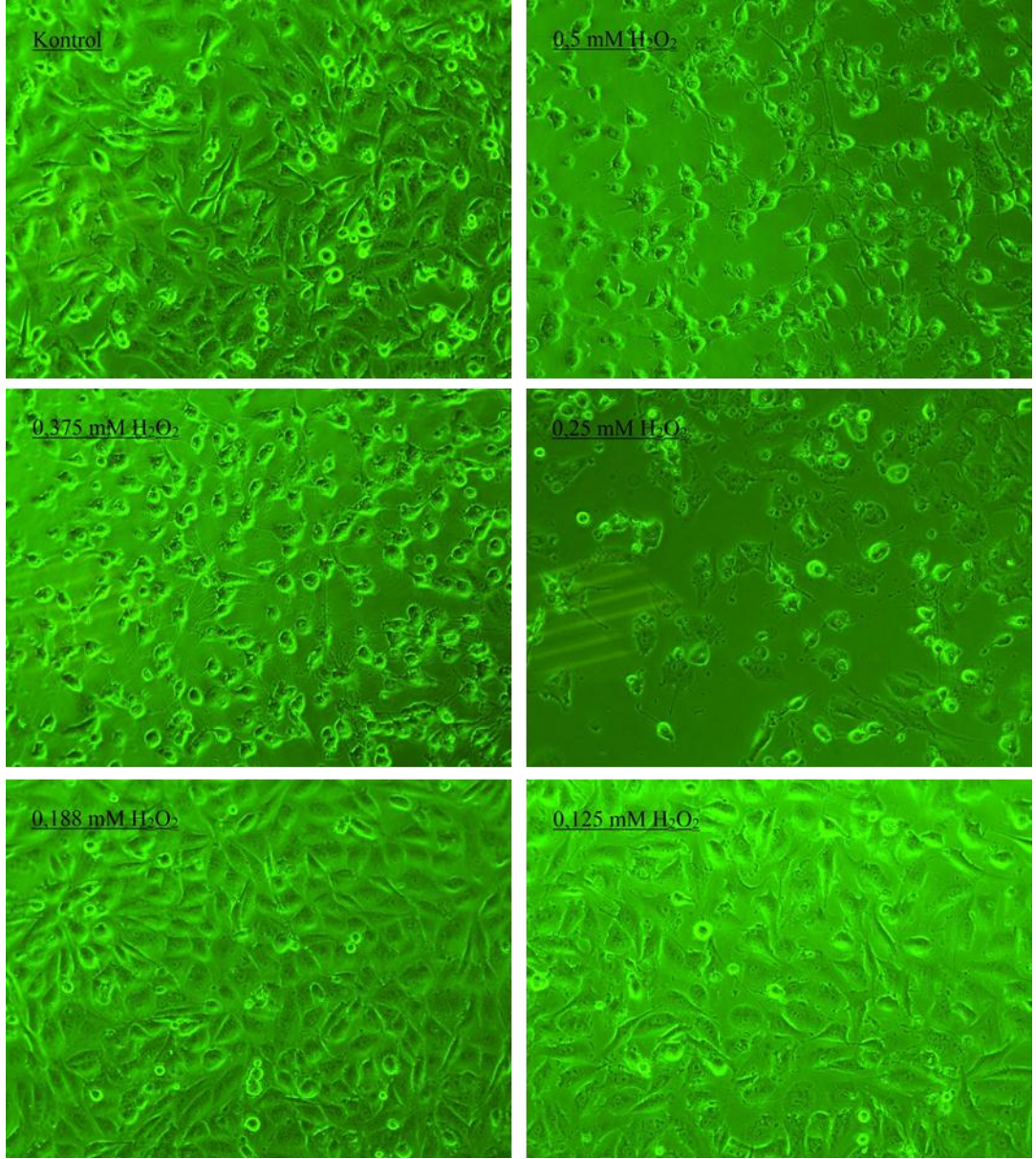
Bu çalışmada H₂O₂'nin nöron kaynaklı SH-SY5Y hücre serisi üzerindeki toksisitesinin 0,025 mM doz seviyesinde başladığı ve bu etkinin bütün hücreleri kapsadığı dozun ise 0,1 mM olduğu görülmüştür. H₂O₂'nin 0,01 mM'lık dozu ve bu seviyeden daha düşük dozlarında ise hücre canlılığı ve çoğalması üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.3).

H₂O₂'nin glial kökenli T98G hücre serisi üzerindeki toksisitesinin ise 0,25 mM doz seviyesinde başladığı ve bu etkinin bütün hücreleri kapsadığı dozun ise 0,375 mM olduğu görülmüştür. H₂O₂'nin 0,188 mM'lık dozu ve bu seviyeden daha düşük dozlarında ise hücre canlılığı ve çoğalması üzerindeki olumsuz etkilerinin giderek azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.4).

Bu deneyin sonucunda H₂O₂ toksisitesinin T98G hücrelerinde 0,25 mM'da, SH-SY5Y hücrelerinde ise 0,025 mM'da başladığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte glial hücrelerin nöronlara göre 10 kat daha yoğun H₂O₂ konsantrasyonuna dayanabildiğini gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Nöron hücreleri üzerinde H₂O₂ toksisitesi etkilerinin gösterilmesi



Şekil 4.4. Glial hücreler üzerinde H_2O_2 toksisitesi etkilerinin gösterilmesi

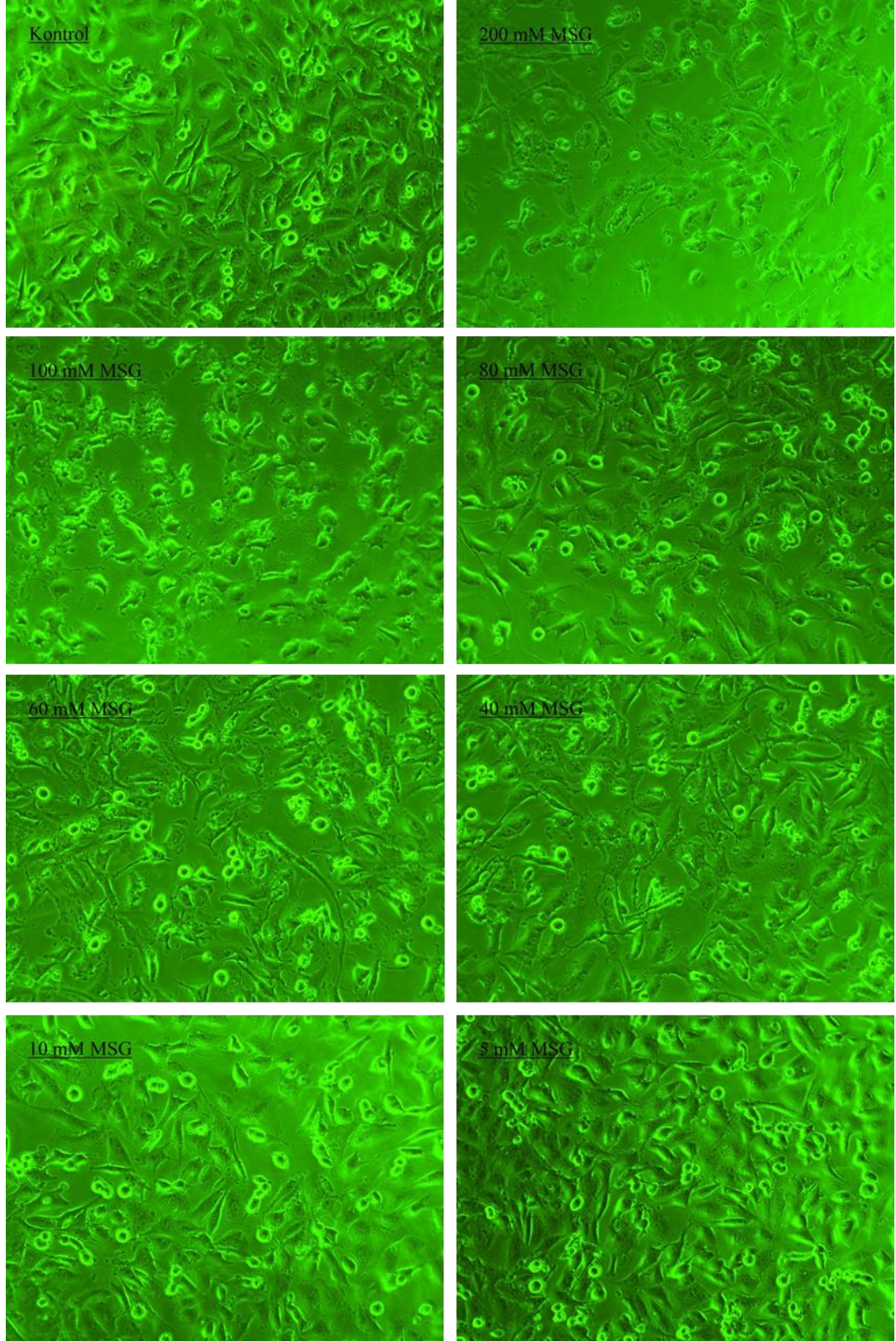
4.1.3. SH-SY5Y ve T98G Hücre Serileri İçin MSG'nin Toksik Doz Aralığı

Daha önceki çalışmalar incelendiğinde MSG ile yapılan toksik modellemenin de her iki hücre serisinde de yapıldığı görülmektedir. Ancak H_2O_2 toksik modellemesinde olduğu gibi MSG'nin de toksik doz sınırının çalışmadan çalışmaya farklılık göstermesi nedeniyle daha önceki yapılmış çalışmalardaki toksik doz seviyeleri göz önüne alınarak bu çalışmamızda MSG'nin toksik dozunun belirlenmesi için her iki hücre serisinde de geniş bir doz aralığı uygulaması yapılmıştır.

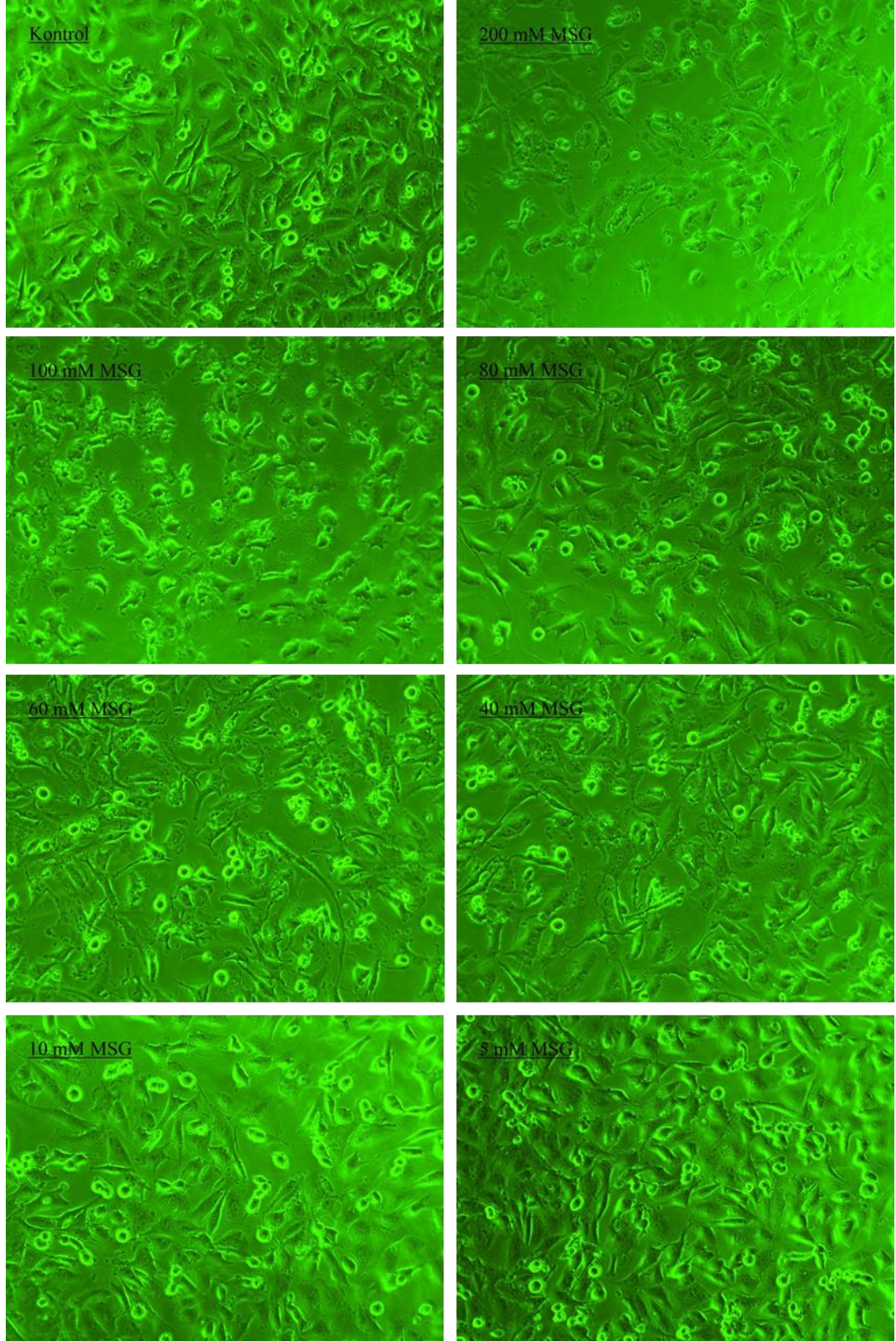
Bu çalışmada MSG'nin nöron kaynaklı SH-SY5Y hücre serisi üzerindeki toksisitesinin 60 mM doz seviyesinde başladığı ve bu etkinin bütün hücreleri kapsadığı dozun ise 100 mM olduğu görülmüştür. MSG'nin 40 mM'lık dozu ve bu seviyeden daha düşük dozlarında ise hücre canlılığı ve çoğalması üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.5).

MSG'nin glial kökenli T98G hücre serisi üzerindeki toksisitesinin ise 40 mM doz seviyesinde başladığı ve bu etkinin bütün hücreleri kapsadığı dozun ise 100 mM olduğu görülmüştür. H_2O_2 'nin 10 mM'lık dozu ve bu seviyeden daha düşük dozlarında ise hücre canlılığı ve çoğalması üzerindeki olumsuz etkilerinin olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.6).

Bu deneyin sonucunda T98G hücrelerinin MSG toksisitesine daha duyarlı olduğu görülmüştür. Aynı zamanda her iki hücre tipinde de 100 mM MSG'nin tüm hücreleri etkileyen doz olduğu görülmüştür (Şekil 4.6).



Şekil 4.5. Nöron hücreleri üzerinde MSG toksisitesi etkilerinin gösterilmesi



Şekil 4.6. Glial hücreler üzerinde MSG toksisitesi etkilerinin gösterilmesi

4.2. TMZ, H₂O₂ ve MSG’NİN TOKSİK DOZLARININ MTT TESTİ İLE BELİRLENMESİ

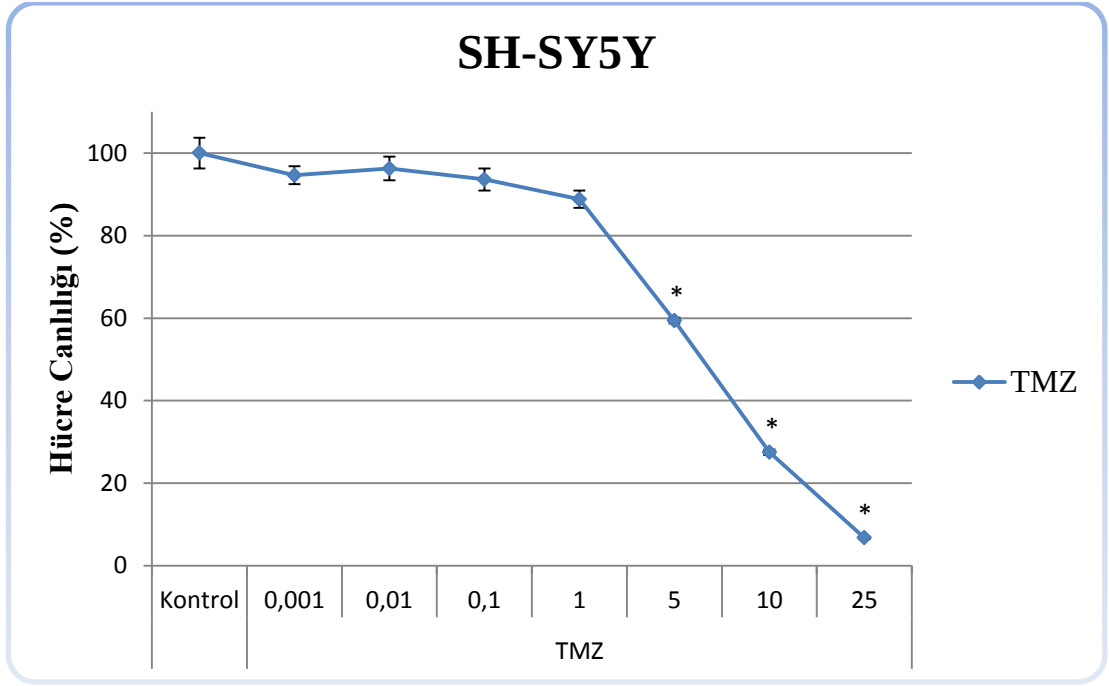
TMZ, H₂O₂ ve MSG’nin toksik doz sınırlarının gözlemsel inceleme ile belirlenmesi sonucunda, bu dozların hücre yaşayabilirliği üzerindeki etkilerinin kantitatif olarak belirlenmesi amacıyla MTT testi yapıldı. Çıkan sonuçlar kontrol grubuna göre kıyaslanarak yüzde değerleri hesaplanmıştır.

4.2.1. TMZ’nin Toksik Dozunun MTT Testi İle Belirlenmesi

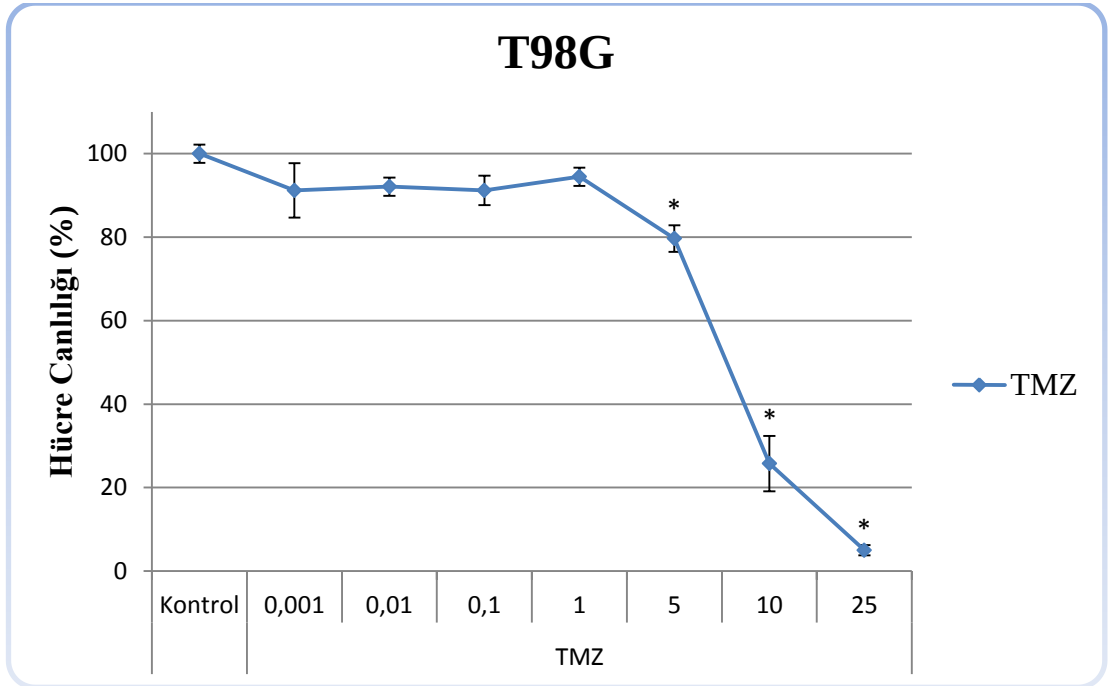
TMZ’nin nöron hücrelerinde 1 mM’a kadar hücre yaşayabilirliği açısından olumsuz bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. 5 mM’da ise hücre yaşayabilirliği %41 oranında azalmış ve istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$) bulunmuştur (Grafik 4.1).

TMZ’nin glial hücrelerin yaşayabilirliği üzerindeki etkileri de nöronlara benzer şekilde bulunmuştur. 1 mM’a kadar hücre canlılığına olumsuz etkileri görülmemiştir. 5 mM’da %20, 10 mM da ise %74 oranında hücre canlılığına olumsuz etkileri gözlenmiştir (Grafik 4.2). İstatistiksel olarak anlamlılık ($p<0,001$) nöron ve glial hücrelerde 5 mM’da başlamıştır.

MTT testi sonuçları da bir önceki yapılan gözlemsel inceleme sonuçları ile uyum göstermiştir. İstatistiksel anlamlılık 5 mM’da başlamasına rağmen SH-SY5Y hücrelerinin T98G hücrelerine kıyasla TMZ toksisitesine biraz daha dirençli olduğu görülmüştür.



Grafik 4.1. TMZ'nin nöronal hücrelerdeki etkilerinin MTT testi ile gösterilmesi. Gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldı. *; $p < 0,001$.



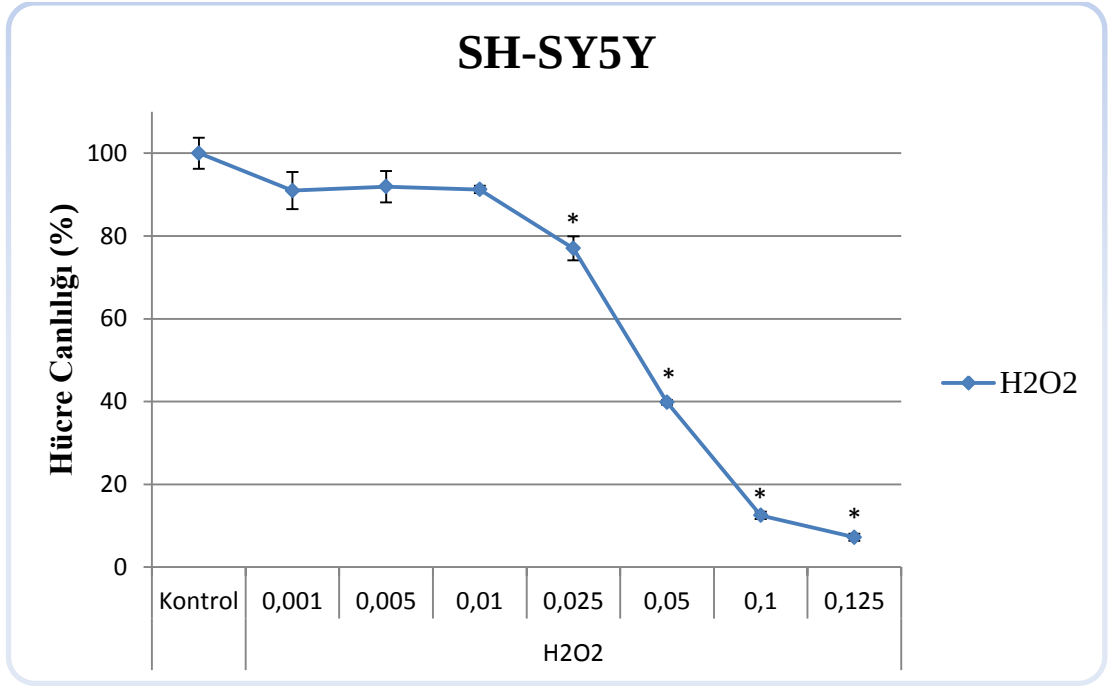
Grafik 4.2. TMZ'nin glial hücrelerdeki etkilerinin MTT testi ile gösterilmesi. Gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldı. *; $p < 0,001$.

4.2.2. H₂O₂'nin Toksik Dozunun MTT Testi İle Belirlenmesi

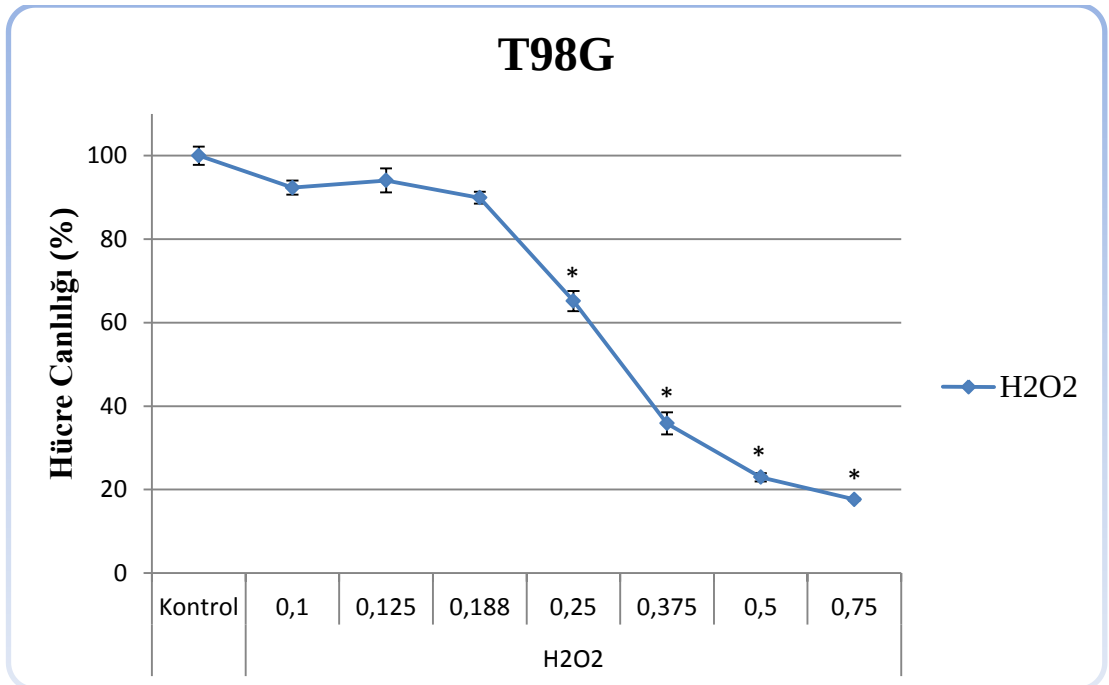
H₂O₂'nin nöronal kaynaklı SH-SY5Y hücre serisi üzerindeki toksik etkileri 25 µM seviyesinde başlamıştır. Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, bu dozun hücre canlılığında %23 oranında bir azalma yaptığı kaydedilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılık (p<0,001) 25 µM dozundan sonra başlamıştır. 100 µM seviyesinde ise hücre canlılığında %87 oranında bir azalma görülmüştür (Grafik 4.3).

H₂O₂'nin glial kaynaklı T98G hücre serisi üzerindeki toksik etkileri 250 µM seviyesinde başlamıştır. Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, bu dozun hücre canlılığında %35 oranında bir azalma yaptığı kaydedilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılık (p<0,001) 250 µM dozundan sonra başlamıştır. 500 µM seviyesinde ise hücre canlılığında %77 oranında bir azalma görülmüştür (Grafik 4.4).

Nöronal hücrelerin H₂O₂ ile oluşturulan toksisite modelinde glial hücrelere kıyasla H₂O₂'ye daha duyarlı olduğu görülmüştür. Glial hücrelerin yaklaşık 10 kat daha yoğun H₂O₂ konsantrasyonuna dayanabildiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar görsel olarak tespit edilen bulgular ile uyumluluk göstermiştir.



Grafik 4.3. H_2O_2 'nin nöronal hücrelerdeki toksisitesinin MTT testi ile gösterilmesi. Gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldı. *; $p < 0,001$.



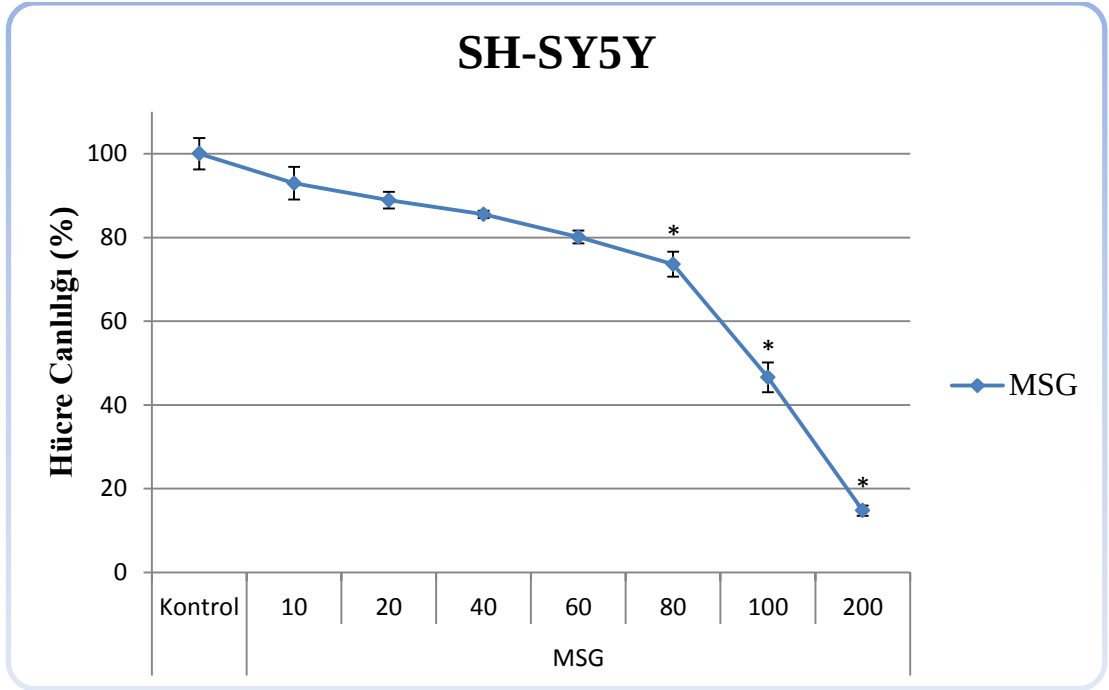
Grafik 4.4. H_2O_2 'nin glial hücrelerdeki toksisitesinin MTT testi ile gösterilmesi. Gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldı. *; $p < 0,001$.

4.2.3. MSG'nin Toksik Dozunun MTT Testi İle Belirlenmesi

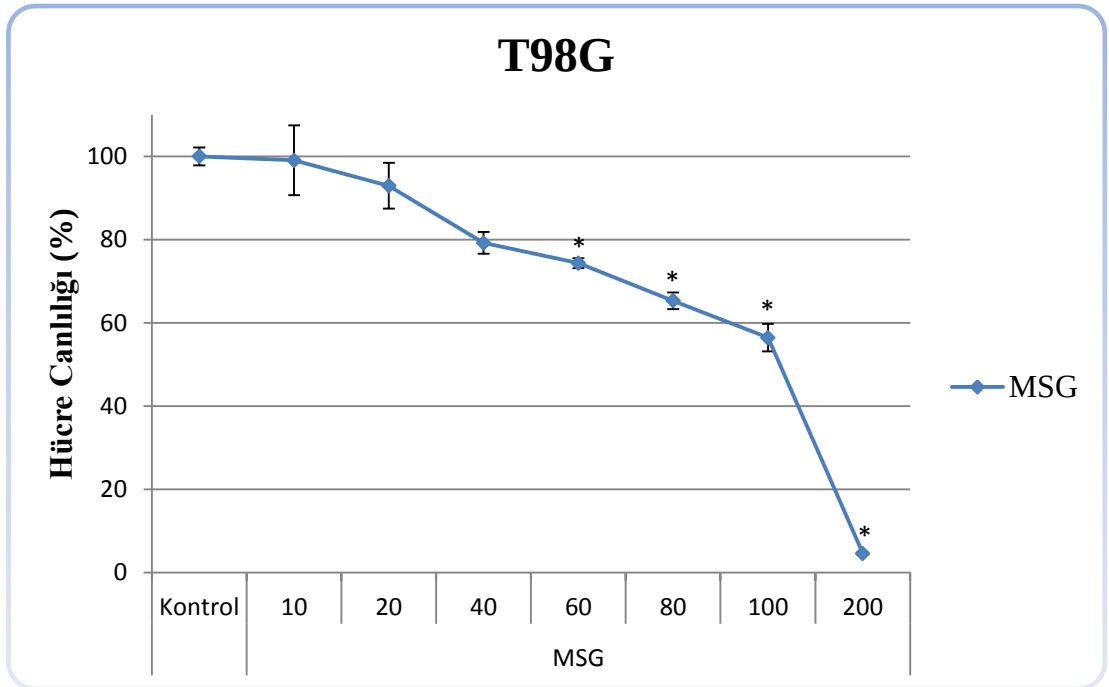
MSG'nin nöronal kaynaklı SH-SY5Y hücre serisi üzerindeki toksik etkileri 80 mM seviyesinde başlamıştır. Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, bu dozun hücre canlılığında %26 oranında bir azalma yaptığı kaydedilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılık ($p<0,001$) 80 mM dozundan sonra başlamıştır. 200 mM seviyesinde ise hücre canlılığında %85 oranında bir azalma görülmüştür (Grafik 4.5).

MSG'nin glial kaynaklı T98G hücre serisi üzerindeki toksik etkileri 60 mM seviyesinde başlamıştır. Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, bu dozun hücre canlılığında %26 oranında bir azalma yaptığı kaydedilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılık ($p<0,001$) 60 mM dozundan sonra başlamıştır. 200 mM seviyesinde ise hücre canlılığında %95 oranında bir azalma görülmüştür (Grafik 4.6).

MSG'nin toksik etkilerinin başladığı doz seviyesi her iki hücre tipinde de birbirine yakın aralıkta olduğu görülmüştür. Glial hücrelerin nöronlara kıyasla biraz daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir. 100 mM düzeyinde her iki hücre tipinde de kontrole göre yaklaşık %50 oranında bir azalma tespit edilmiştir. Bu sonuçlar görsel olarak tespit edilen bulgular ile uyumluluk göstermiştir.



Grafik 4.5. MSG'nin nöronal hücrelerdeki toksisitesinin MTT testi ile gösterilmesi. Gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldı. *; $p < 0,001$.



Grafik 4.6. MSG'nin glial hücrelerdeki toksisitesinin MTT testi ile gösterilmesi. Gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldı. *; $p < 0,001$.

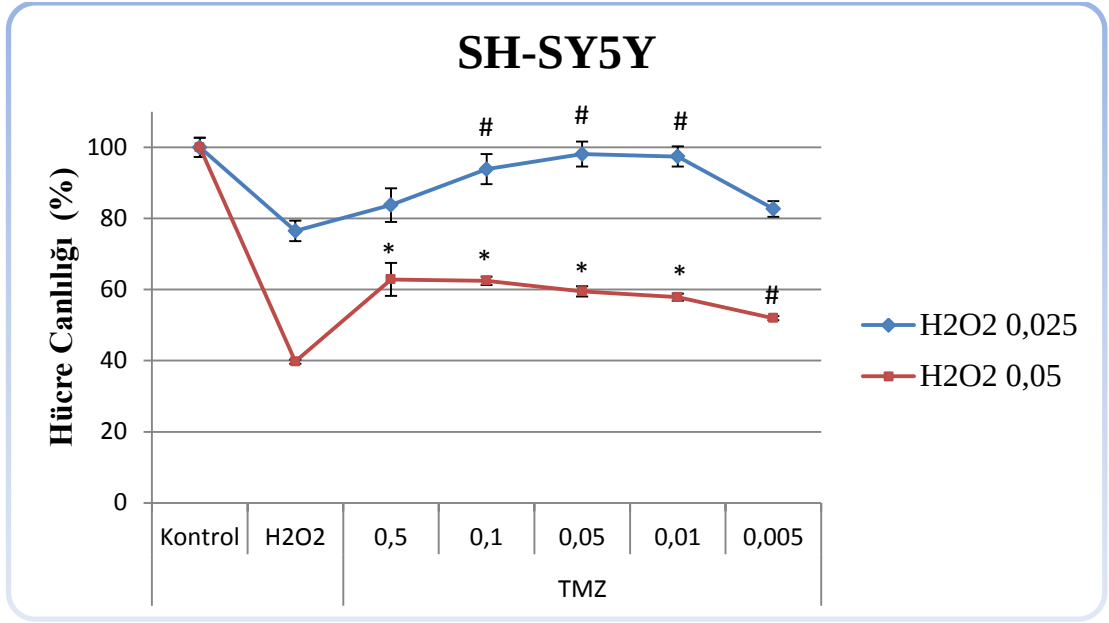
4.3. H₂O₂ ve MSG’NİN TOKSİSİTELERİNE KARŞI TMZ’NİN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİLERİ

Bu çalışmada H₂O₂ ve MSG’nin toksik dozları belirlendikten sonra TMZ’nin hücreler üzerinde toksik etkisi olmayan beş farklı dozunun H₂O₂ ve MSG toksisitesine karşı koruyuculuğunun olup olmadığı araştırılmıştır.

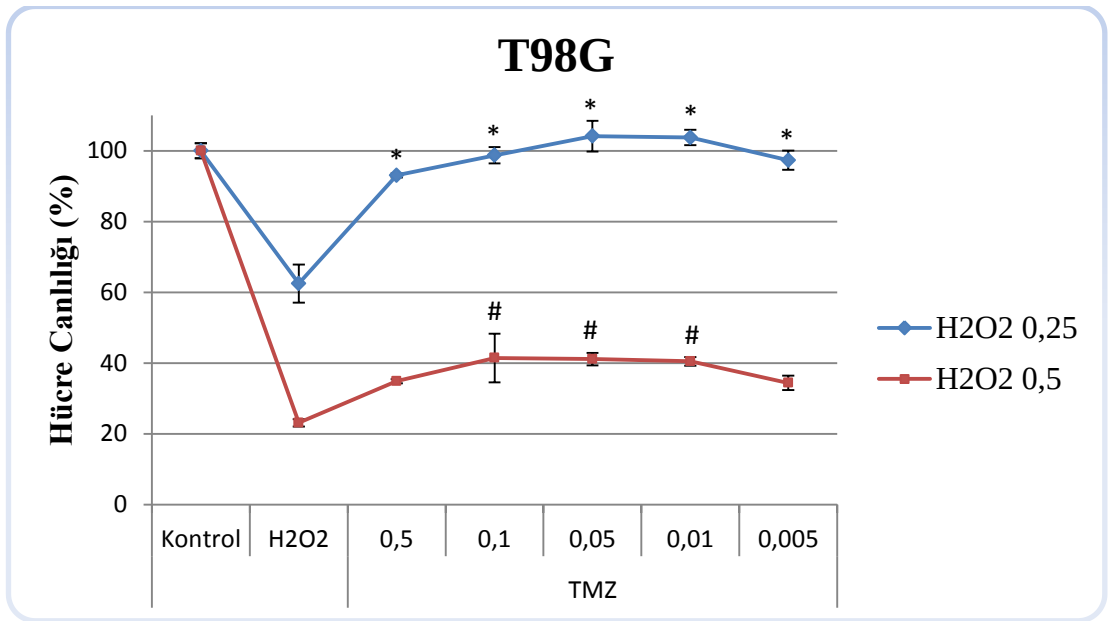
4.3.1. H₂O₂ Toksisitesine Karşı TMZ’nin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Nöronal hücreler incelendiğinde düşük doz H₂O₂ toksisitesine karşı 0,01 ve 0,05 mM TMZ’nin hücre canlılığını %22 oranında (p<0,05) artırdığı, yüksek doz H₂O₂ toksisitesine karşı ise 0,1 ve 0,5 mM TMZ’nin %23 oranında (p<0,001) artırdığı tespit edilmiştir (Grafik 4.7). Yani düşük doz H₂O₂ toksisitesine karşı düşük doz TMZ, yüksek doz toksisitesine karşı da yüksek doz TMZ etkili bulunmuştur.

H₂O₂ toksisitesine karşı TMZ’nin etkinliği glial hücrelerde incelendiğinde, TMZ’nin düşük dozlarının daha etkili olduğu tespit edilmiştir. 0,01 ve 0,05 mM TMZ, düşük doz H₂O₂ toksisitesinde hücre canlılığında %40 oranında (p<0,001) bir artışa neden olmuştur ve nöronal hücrelerde de olduğu gibi hücre canlılık oranlarını kontrol grubu düzeylerine kadar çıkarmıştır. Yüksek doz H₂O₂ toksisitesinde ise 0,01, 0,05 ve 0,1 mM TMZ hücre canlılık oranlarını %20 oranında (p<0,05) artırmıştır (Grafik 4.8).



Grafik 4.7. H_2O_2 'nin nöronal hücrelerdeki toksistesine karşı TMZ'nin hücre canlılığı üzerine etkilerinin gösterilmesi. TMZ+ H_2O_2 verilen gruplar tek başına H_2O_2 verilen grup ile karşılaştırıldı. *, $p < 0,001$, #; $p < 0,05$.



Grafik 4.8. H_2O_2 'nin glial hücrelerdeki toksistesine karşı TMZ'nin hücre canlılığı üzerine etkilerinin gösterilmesi. TMZ+ H_2O_2 verilen gruplar tek başına H_2O_2 verilen grup ile karşılaştırıldı. *, $p < 0,001$, #; $p < 0,05$.

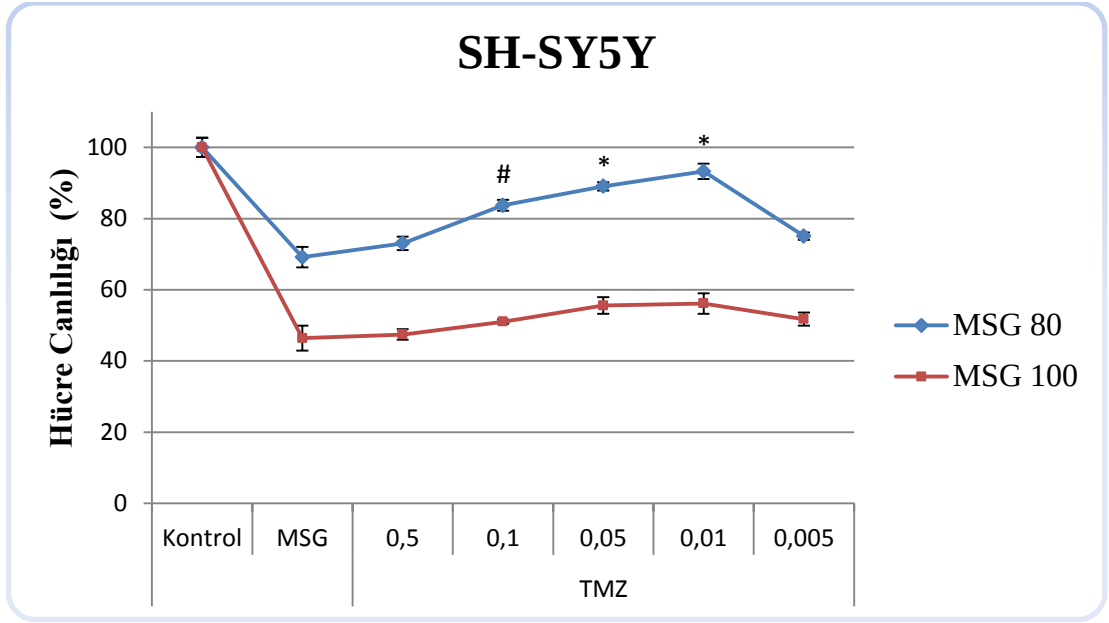
4.3.2. MSG Toksisitesine Karşı TMZ'nin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Nöroanl hücrelerdeki MSG toksistesine karşı TMZ'nin etkileri incelendiğinde, TMZ'nin 100 mM MSG toksisitesine karşı anlamlı bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (Grafik 4.9).

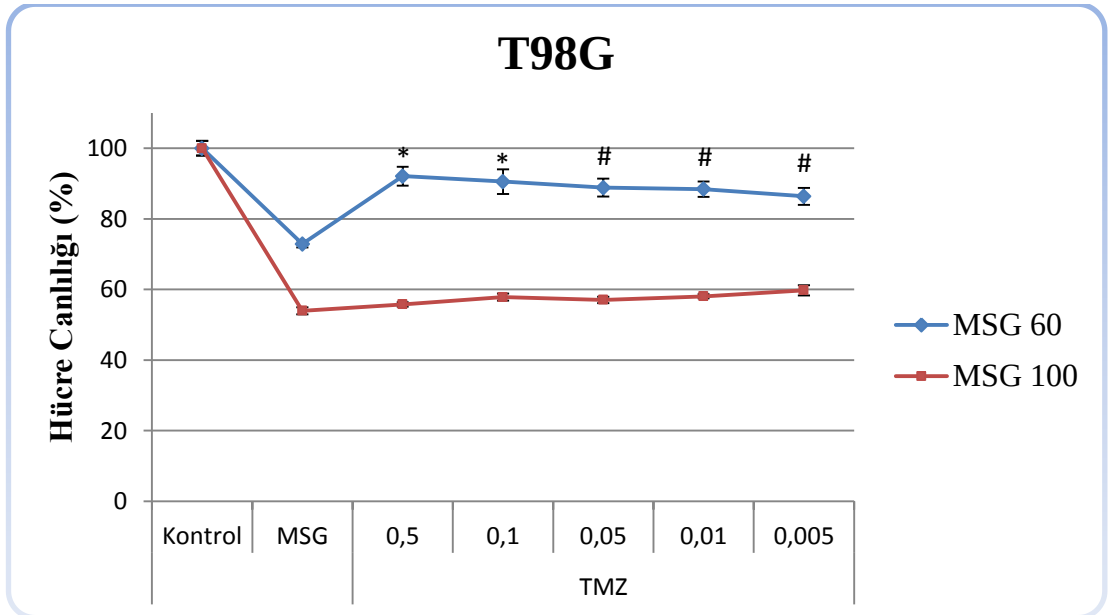
80 mM MSG toksisitesine karşı 0,01 mM TMZ hücre canlılığını %24 oranında artırarak ($p<0,001$) kontrole göre %93 oranına çıkarmıştır. 80 mM MSG toksisitesinde 0,005 mM TMZ'nin ise hücre canlılığı üzerine hiçbir etkisi görülmemiştir (Grafik 4.9).

Glial hücrelerdeki MSG toksisitesinde de nöronal hücrelerdeki gibi 100 mM yüksek doz MSG toksisitesine karşı TMZ'nin hücre canlılığına hiçbir etkisi görülmemiştir (Grafik 4.10).

60 mM MSG toksisitesinde ise TMZ'nin dozu ile orantılı olarak hücre canlılığında anlamlı derecede artışlar olduğu tespit edilmiştir. 0,5 mM TMZ hücre canlılığında %19 oranında ($p<0,001$) arttırmıştır (Grafik 4.10).



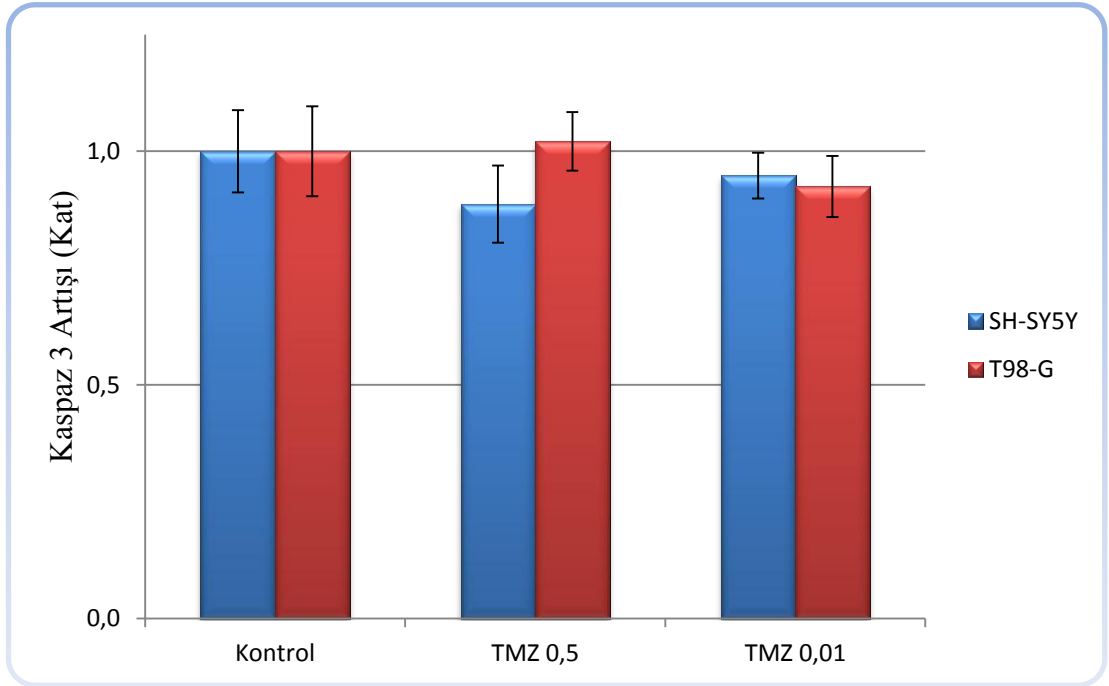
Grafik 4.9. MSG'nin nöronal hücrelerdeki toksistesine karşı TMZ'nin hücre canlılığı üzerine etkilerinin gösterilmesi. TMZ+H₂O₂ verilen gruplar tek başına MSG verilen grup ile karşılaştırıldı. *, p<0,001, #; p<0,05.



Grafik 4.10. MSG'nin glial hücrelerdeki toksistesine karşı TMZ'nin hücre canlılığı üzerine etkilerinin gösterilmesi. TMZ+MSG verilen gruplar tek başına MSG verilen grup ile karşılaştırıldı. *, p<0,001, #; p<0,05.

4.4. TMZ’NİN HÜCRE İÇİ KASPAZ-3 SEVİYELERİNE ETKİLERİ

TMZ’nin hücreler üzerinde H₂O₂ ve MSG toksisitesine karşı koruyucu olduğu görülen dozlarda tek başına kullanıldığında, hem nöronal hem de glial hücrelerde hücre içi kaspaz-3 seviyelerinde bir değişiklik olmamıştır. TMZ’nin 0,5 mM dozu nöronal hücrelerdeki kaspaz-3 miktarında az bir düşüşe neden olsa da bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır (Grafik 4.11).



Grafik 4.11. TMZ’nin nöronal ve glial hücrelerdeki hücre içi kaspaz-3 seviyelerine etkilerinin gösterilmesi. TMZ verilen gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

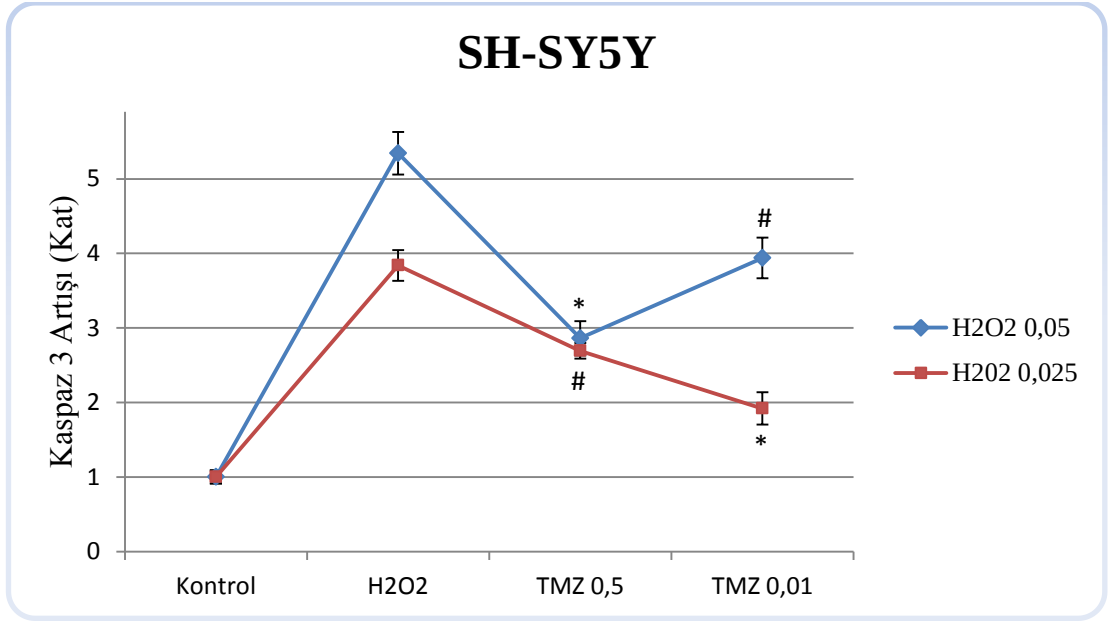
4.4.1. H₂O₂ Toksisitesine Karşı TMZ'nin Kaspaz-3 Seviyelerine Etkileri

Hücre içi kaspaz-3 seviyeleri incelendiğinde nöronal hücrelerde 0,05 mM H₂O₂'nin hücre içi kaspaz-3 miktarı 5,3 kat artırdığı, 0,025 mM H₂O₂'nin de 3,8 kat artırdığı tespit edilmiştir (Grafik 4.12).

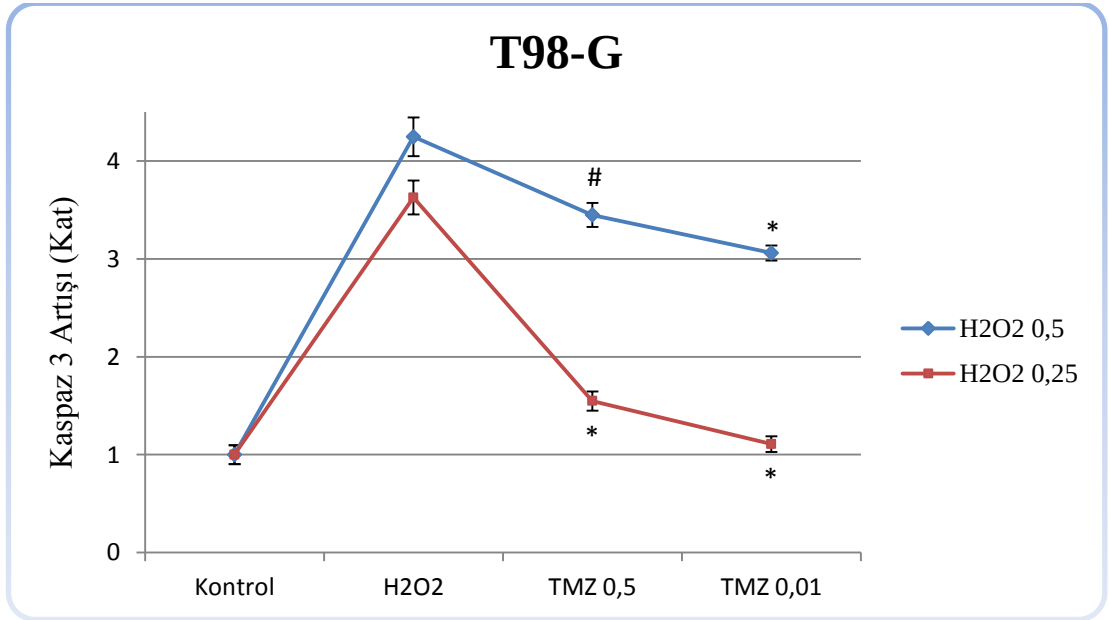
TMZ'nin ise yükselen kaspaz-3 seviyelerini önemli derecede azalttığı tespit edilmiştir. Nöronlardaki kaspaz-3 seviyelerini azaltmada yüksek doz H₂O₂ toksistesine karşı yüksek doz TMZ'nin, düşük doz H₂O₂ toksistesine karşı da düşük doz TMZ'nin daha etkili olduğu görülmüştür (Grafik 4.12).

Glial hücrelerdeki kaspaz-3 miktarları ölçüldüğünde ise 0,05 mM H₂O₂'nin hücre içi kaspaz-3 miktarını 4,2 kat artırdığı, 0,025 mM H₂O₂'nin de 3,6 kat artırdığı tespit edilmiştir. Bu hücrelerde de TMZ kaspaz-3 seviyelerini önemli derecede azaltmıştır (Grafik 4.13).

Glial hücrelerde her H₂O₂ toksisitesine karşı TMZ'nin 0,01 mM olan düşük dozunun daha etkili bir şekilde hücre içi kaspaz-3 miktarını azalttığı görülmüş olup 0,01 mM TMZ'nin 0,025 mM H₂O₂ toksisitesindeki kaspaz-3 seviyesini kontrol grubu seviyesine kadar indirdiği tespit edilmiştir (Grafik 4.13).



Grafik 4.12. H_2O_2 'nin nöronal hücrelerdeki toksisitesine karşı TMZ'nin hücre içi kaspaz-3 seviyelerine etkilerinin gösterilmesi. TMZ+ H_2O_2 verilen gruplar tek başına H_2O_2 verilen grup ile karşılaştırıldı. *; $p<0,001$, #; $p<0,05$.



Grafik 4.13. H_2O_2 'nin glial hücrelerdeki toksisitesine karşı TMZ'nin hücre içi kaspaz-3 seviyelerine etkilerinin gösterilmesi. TMZ+ H_2O_2 verilen gruplar tek başına H_2O_2 verilen grup ile karşılaştırıldı. *; $p<0,001$, #; $p<0,05$.

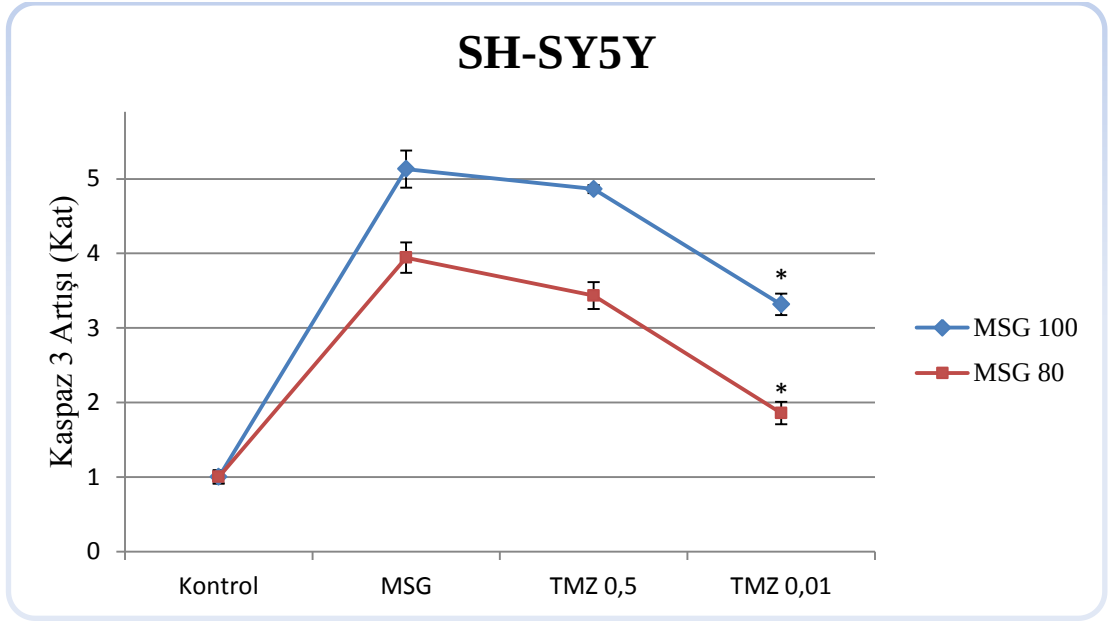
4.4.2. MSG Toksisitesine Karşı TMZ'nin Kaspaz-3 Seviyelerine Etkileri

MSG toksisitesinde hücre içi kaspaz-3 seviyeleri incelendiğinde nöronal hücrelerde 100 mM MSG'nin kaspaz-3 miktarını 5,1 kat artırdığı, 80 mM MSG'nin de 3,9 kat artırdığı tespit edilmiştir (Grafik 4.14).

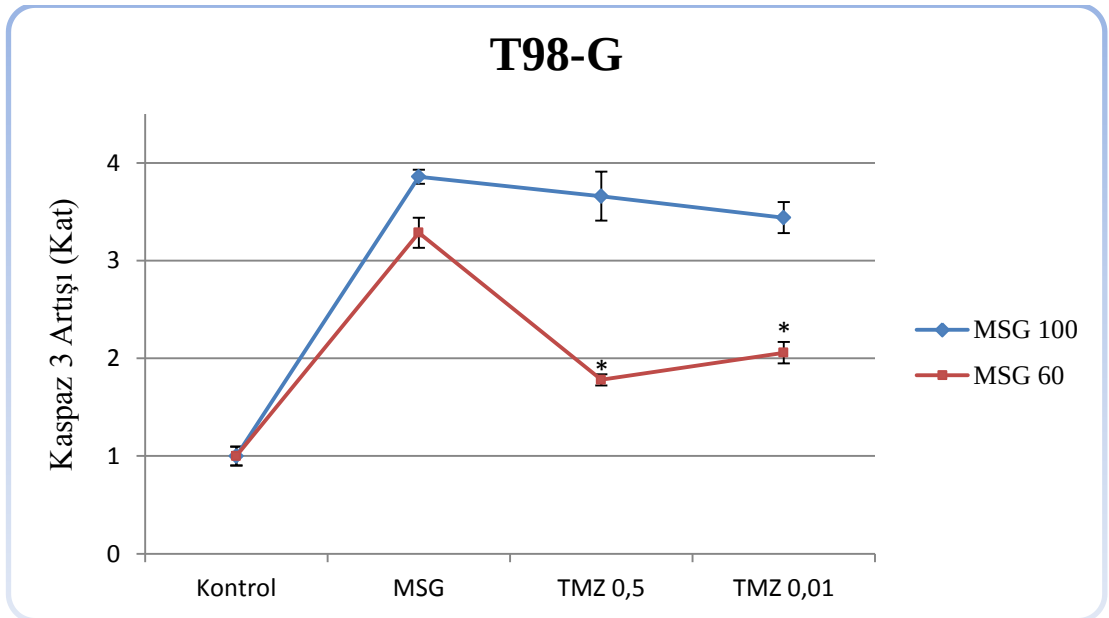
MSG toksisitesinin neden olduğu nöronal kaspaz-3 seviyelerindeki bu yükselişi TMZ'nin sadece düşük dozu anlamlı derecede ($p<0,001$) azaltabilmiştir. TMZ'nin yüksek dozu olan 0,5 mM dozu, MSG toksisitesindeki kaspaz-3 seviyelerinde bir düşüşe neden olsa da bu düşüş çok fazla olmayıp, istatistiksel olarak da anlamlı çıkmamıştır (Grafik 4.14).

Glial hücrelerdeki MSG toksisitesinde kaspaz-3 seviyeleri ölçüldüğünde ise 100 mM MSG'nin hücre içi kaspaz-3 miktarını 3,9 kat artırdığı, 60 mM MSG'nin de 3,3 kat artırdığı tespit edilmiştir (Grafik 4.15).

Glial hücrelerde 100 mM MSG'nin neden olduğu kaspaz-3 seviyesindeki yükselişe karşı TMZ'nin herhangi bir azaltıcı etkisi görülmemiştir. 60 mM MSG'nin neden olduğu yüksek kaspaz-3 seviyesini ise TMZ her iki dozunda da önemli derecede ($p<0,001$) azaltmıştır (Grafik 4.15).



Grafik 4.14. MSG'nin nöronal hücrelerdeki toksistesine karşı TMZ'nin hücre içi kaspaz-3 seviyelerine etkilerinin gösterilmesi. TMZ+ MSG verilen gruplar tek başına MSG verilen grup ile karşılaştırıldı. *; $p < 0,001$.



Grafik 4.15. MSG'nin glial hücrelerdeki toksistesine karşı TMZ'nin hücre içi kaspaz-3 seviyelerine etkilerinin gösterilmesi. TMZ+ MSG verilen gruplar tek başına MSG verilen grup ile karşılaştırıldı. *; $p < 0,001$, #; $p < 0,05$.

4.5. FLORESAN BOYAMA İLE APOPİTOZİS ORANININ KALİTATİF OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Akridin orange boyası hücrelerdeki nükleik asitlere bağlanarak yeşil ve turuncu floresan ışık yaymaktadır. Böylelikle apoptotik hücrelerdeki kromatin yoğunlaşmasını daha yoğun bir ışık vererek belirlemektedir. Küçülen hücreler içindeki nükleusların yoğunlaşarak birden fazla kümelenmesi de görülebilmektedir. Normal gruplardaki hücrelerin nükleusları tek parça ve sınırı düzgün olarak seçilmektedir. Apoptotik gruplarda ise apoptozis sürecindeki hücrelerin nükleuslarının sınırları düzensiz veya boğumlu hal almıştır.

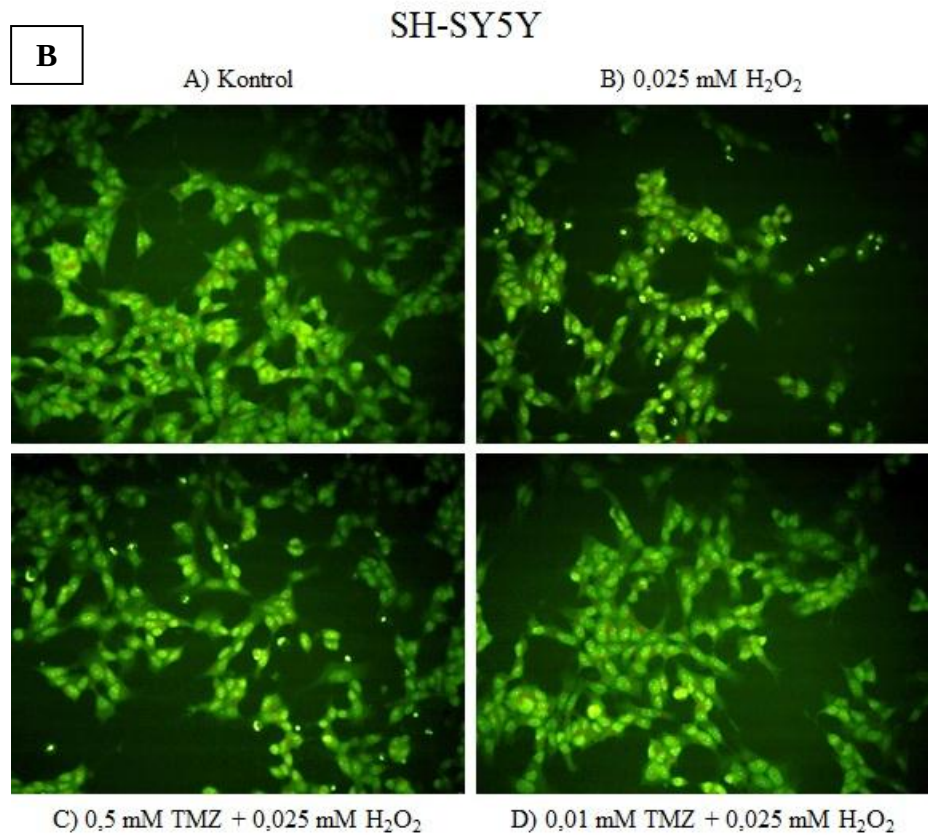
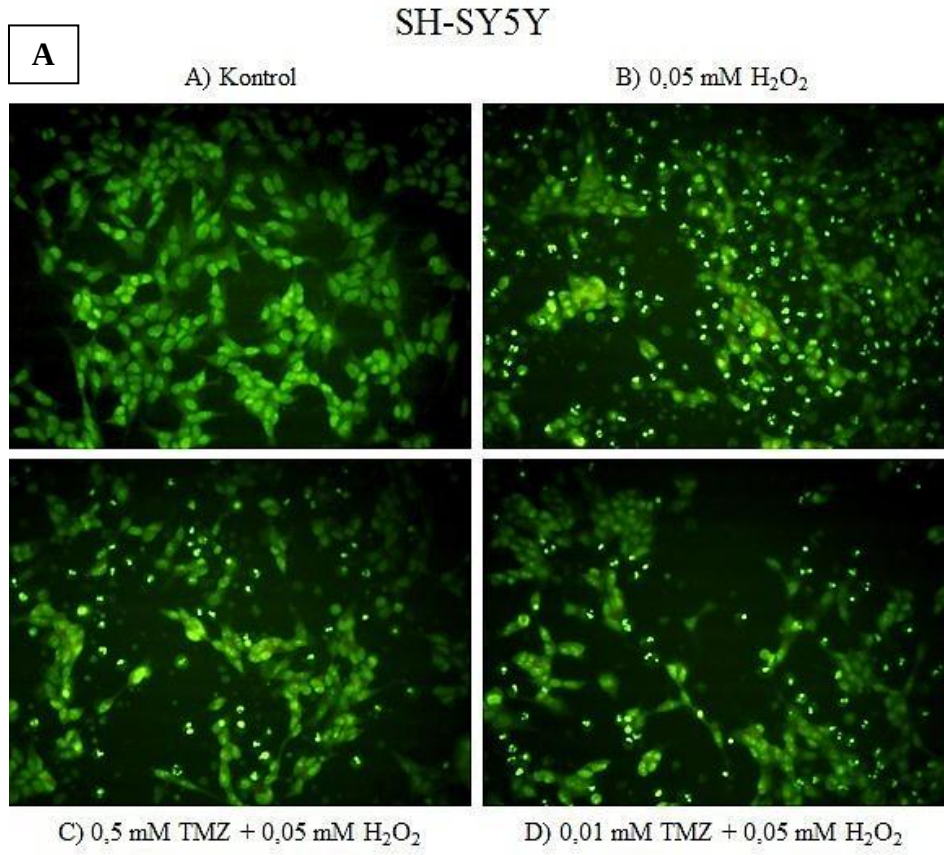
4.5.1. SH-SY5Y Hücre Serisinde H₂O₂ İle İndüklenen Apoptoz Üzerine TMZ'nin Etkisi

0,05 mM H₂O₂ ile apoptozis indüklenen nöronal hücrelerin bulunduğu grup incelendiğinde, kontrol grubuna göre hücrelerin yarısının etkilendiği görülmektedir. Hücreler küçülmüş, içlerinde birkaç odaklı kromatin yoğunlaşması olan parlak alanlar görülmektedir. Hücre çeperleri sağlam olarak görülmektedir (Şekil 4.7).

TMZ'nin 0,05 mM H₂O₂ verilen gruptaki apoptozis oranını kısmen azaltabildiği görülmüştür (Şekil 4.7, A).

0,025 mM H₂O₂ ile indüklenen grupta ise kontrol grubuna göre apoptotik hücre sayısının kısmen arttığı, bu etkinin ise 0,01 mM TMZ ile tamamen ortadan kalktığı görülmektedir (Şekil 4.7, B).

Nöronal hücrelerde H₂O₂ toksisitesinde 0,01 mM TMZ'nin 0,5 mM dozuna göre daha anlaşılır bir şekilde koruma sağladığı görülmüştür.



Şekil 4.7. Nöronal hücrelerde H₂O₂ ile indüklenen apoptoz üzerine TMZ'nin etkisi

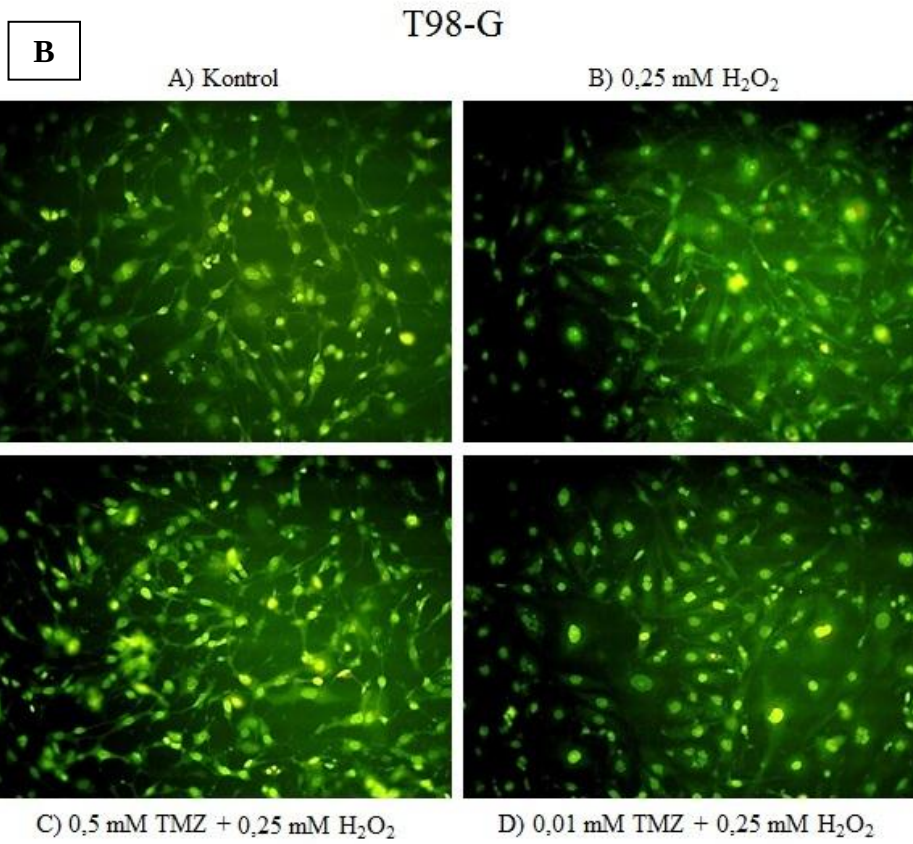
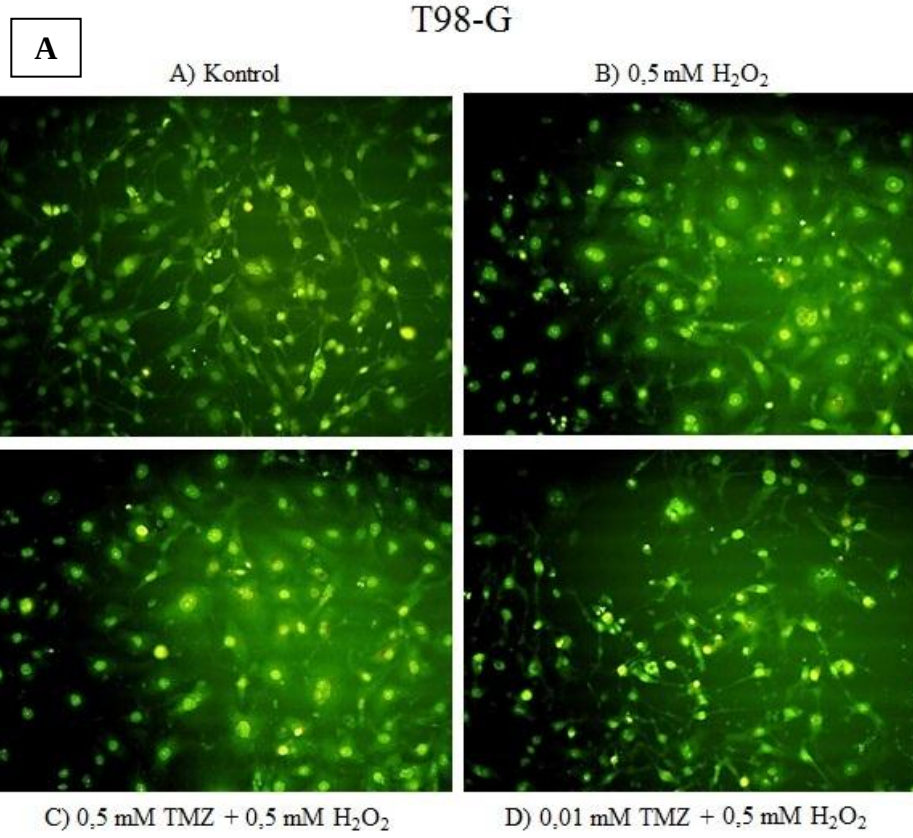
4.5.2. T98-G Hücre Serisinde H₂O₂ İle İndüklenen Apoptoz Üzerine TMZ'nin Etkisi

Glia hücrelerdeki apoptotik hücre görüntüsü nöronal hücrelerdeki gibi kromatin yoğunlaşmasının sebep olduğu parlamalar, normal gruplara göre apoptotik gruplarda daha fazla görülmüştür. Glia hücreler nöronal hücrelere göre zemine daha fazla yayılarak, zeminde daha fazla alan kaplamaktadır. Apoptoz sonucu hücreler çevresel bağlantılarını koparak yuvarlak hal almışlardır (Şekil 4.8).

H₂O₂ ile indüklenen grupta apoptotik cisimler kontrol grubuna göre artmıştır. 0,5 mM H₂O₂ toksisitene karşı 0,5 mM TMZ'nin bir etkisi görülmez iken 0,01 mM TMZ'nin kısmen hücreleri koruduğu ve apoptozisi önlediği görülmüştür (Şekil 4.8, A).

0,25 mM H₂O₂ ile indüklenen apoptozise karşı ise her iki TMZ dozunda da anlaşılır bir koruyucu etki olduğu görülmüştür. Hücrelerin çevresel bağlantıları devam ettirdiği ve kontrol grubundaki hücresel yapıya çok yakın görünümde oldukları görülmüştür (Şekil 4.8, B).

Her iki hücre tipinde de H₂O₂ ile oluşturulan düşük apoptotik uyarımlara karşı TMZ'nin hücreleri koruduğu açıkça görülmüştür (Şekil 4.7 ve 4.8).



Şekil 4.8. Glial hücrelerde H₂O₂ ile indüklenen apoptoz üzerine TMZ'nin etkisi

4.5.3. SH-SY5Y Hücre Serisinde MSG İle İndüklenen Apoptoz Üzerine TMZ'nin Etkisi

MSG toksistesinde de H₂O₂ toksisitesinde olduğu gibi indüklenen gruplarda apoptotik hücrelerin artışı görülmüştür (Şekil 4.9).

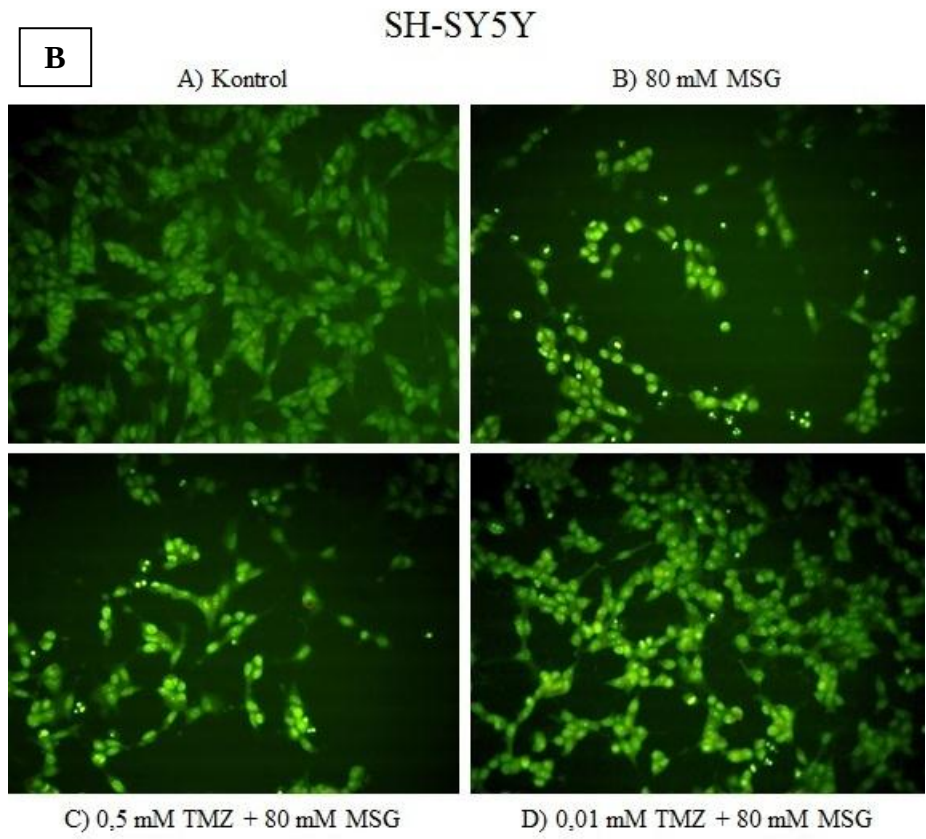
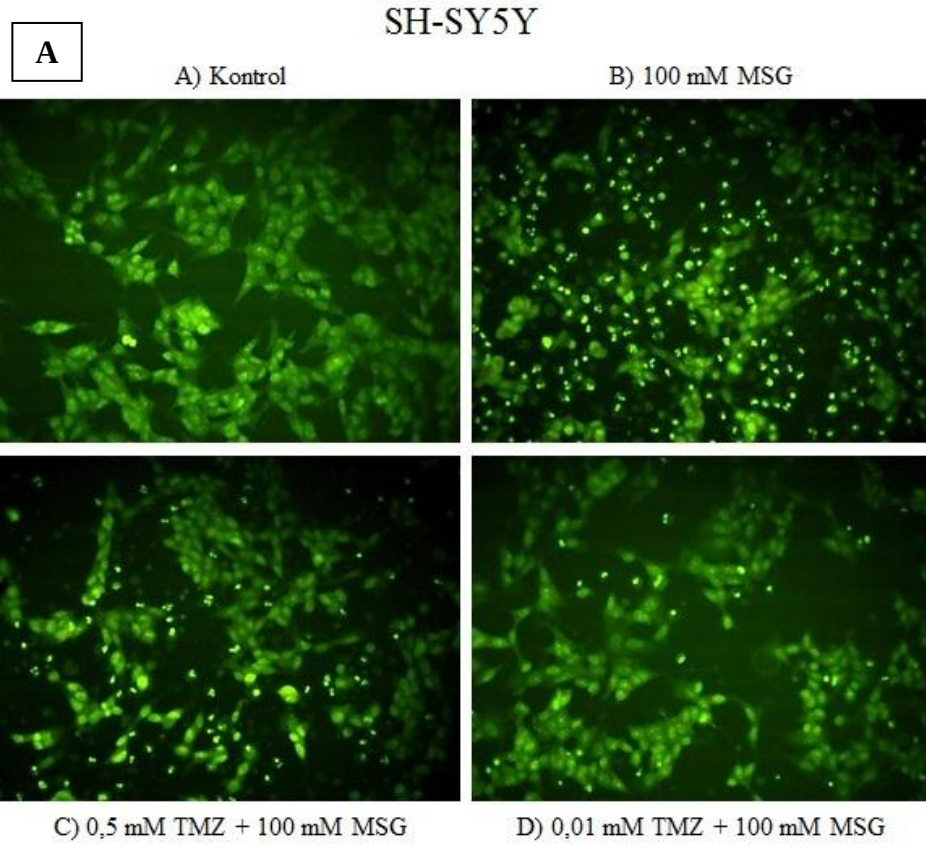
100 mM MSG ile indüklenen apoptoziste 0,5 mM TMZ kısmen etkili olmuşken, 0,01 mM TMZ'nin apoptozisi önlediği görülmüştür (Şekil 4.9, A).

80 mM MSG ile indüklenen grupta kontrol grubuna göre apoptotik hücreler kısmen artmıştır. 0,01 mM TMZ hücreleri toksisteye karşı korumuş olup bu gruptan alınan görüntü kontrol grubunun görüntüsüne çok yakındır (Şekil 4.9, B).

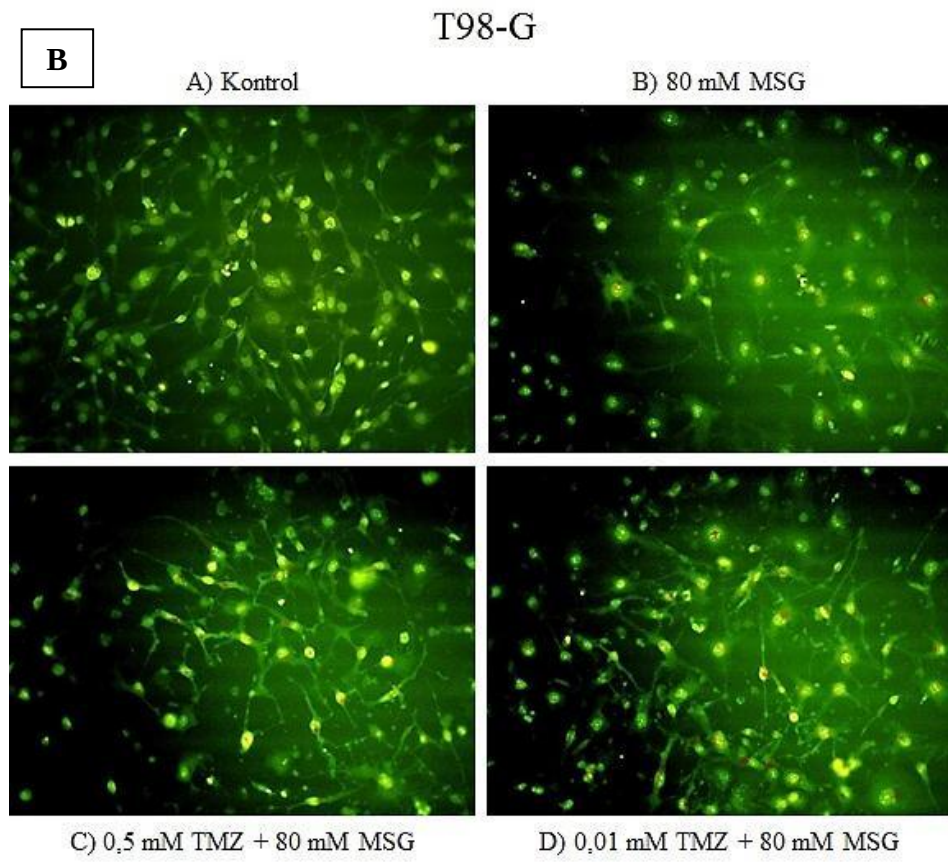
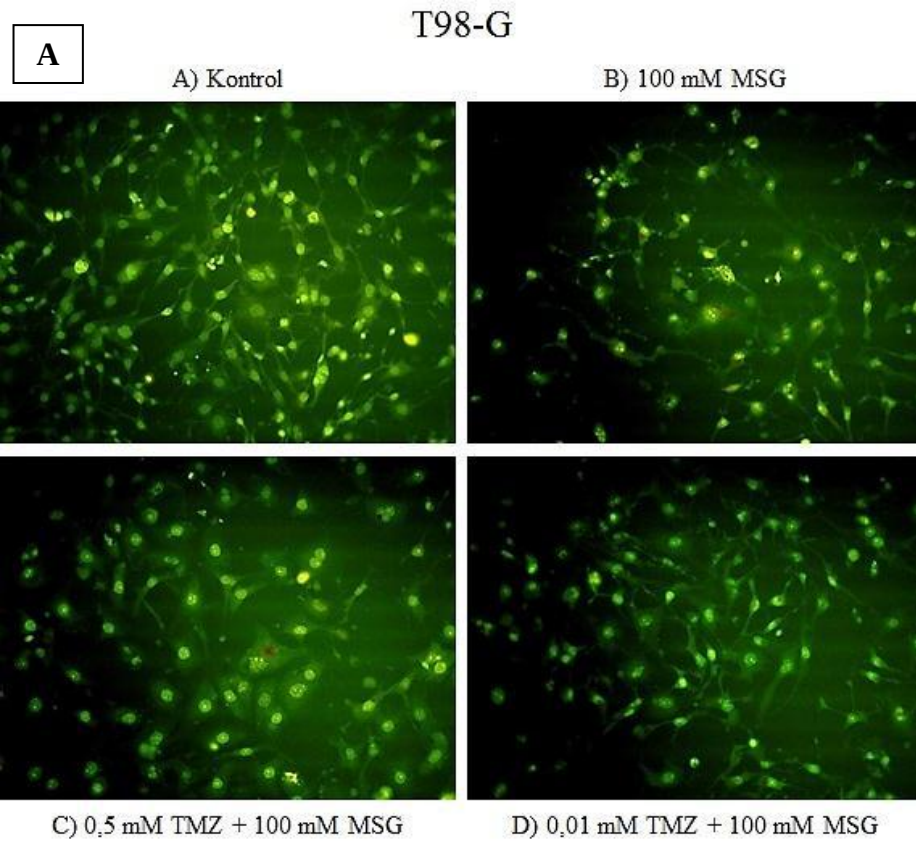
4.5.4. T98-G Hücre Serisinde MSG İle İndüklenen Apoptoz Üzerine TMZ'nin Etkisi

Glial hücrelerde 100 mM MSG ile indüklenen gruplarda TMZ'nin 0,5 mM dozunda bir etki görülmemişken 0,01 mM TMZ'nin ise kısmen etkilediği görülmüştür (Şekil 4.10, A).

60 mM MSG toksistesinde ise TMZ'nin etkisiyle TMZ verilmeyen gruba oranla hücresel uzantıların varlığı normal gözükmemekte ancak apoptotik hücre sayısında düşüş olmadığı anlaşılmaktadır. İndüklenen gruba göre TMZ verilen gruplardaki normal görünen hücre sayısının fazlalığı da TMZ'nin hücreleri anlaşılır derecede koruduğunu göstermektedir (Şekil 4.10, B).



Şekil 4.9. Nöronal hücrelerde MSG ile indüklenen apoptoz üzerine TMZ'nin etkisi



Şekil 4.10. Glial hücrelerde MSG ile indüklenen apoptoz üzerine TMZ'nin etkisi

5. TARTIŞMA

TMZ, genel olarak anjina pectoris tedavisinde kullanılmaktadır (103). Son zamanlarda damarsal tıkanıklar sonucu gelişen ani işitme ve görme kayıplarında da kullanılmaya başlanmıştır (104,105). Gürültüye bağlı işitme kayıplarında, işitme düzeyini artırdığına yönelik hayvan deneyi sonuçları da mevcut olup meniere sendromunda ve tinnitusta da etkili olduğu gösterilmiştir (106,107,108). Birçok organı, reperfüzyon hasarına karşı koruduğuna yönelik bilimsel çalışmalar da yapılmıştır (109,110,111).

Bu çalışmada TMZ'nin nöron ve glial hücreler açısından toksik doz sınırının hangi düzeyde olduğu araştırılmıştır. Bir günlük tedavi süresinde TMZ'nin 1 mM (340 µg/ml) dozuna kadar hem nöronlar hem de glial hücreler üzerinde toksisitetlerine rastlanılmamıştır.

TMZ, ilaç olarak tablet formunda 20 mg ve MR tablet formunda 35 mg olarak reçete edilmektedir. Günlük kullanılan dozu 20 mg tabletten iki veya üç adettir. 20 mg tablet alımı sonrası oluşan plazma doruk konsantrasyonu ise 55 ng/ml'dir. Bu doz, çalışmamızda güvenli çıkan en yüksek dozun yaklaşık olarak 1/6000'i kadardır. İlacın yan etkilerinden sorumlu tutulan içerdiği piperazin halkası, anti-helminetik bir ilaç olarak kullanılmaktadır. Askariasis tedavisinde günlük 75 mg/kg (maksimum 3,5 g) iki gün peş peşe, Enterebius tedavisinde ise 7 gün boyunca aralıksız her sabah 65 mg/kg (maksimum 2,5 g) olarak uygulanır. Bu da ilacın güvenlik doz sınırının çok yüksek olabileceğini göstermektedir.

TMZ suda çok iyi çözünbilmektedir ve plazmada proteinlere çok az miktarda bağlanmaktadır. Eliminasyonu değişmeden böbrekle atılma şeklinde olduğundan doz ayarlaması yapılmadığı zaman yaşlı ve böbrek yetmezliği olan hastalarda kan ilaç konsantrasyonu toksik dozlara ulaşabilmektedir.

TMZ’i uzun süreler kullananlarda veya aşırı miktarda alanlarda parkinsonizm bulguları ortaya çıktığı birkaç vakada bildirilmiştir (112,113). İlaç tedavisinin sonlandırılması ile bulguların düzeldiği görülmüştür (27). Bu yan etkilerin piperazin halkası içeren anti-psikotik ilaçlarda da görüldüğü ancak anti-psikotiklerde bu bulguların bazen kalıcı olabildiği ve koreiformik sekeller kaldığı vakalar gösterilmiş olup hatta yaşlı parkinson hastalarında ölümle bile sonuçlandığı bildirilmiştir (114,115).

Bu çalışmada ayrıca TMZ’nin koruyucu etkilerinin araştırılması için nöronal ve glial hücreler üzerine H₂O₂ verilerek hücre içi serbest oksijen radikallerinin artışı tetiklenmiş ve glutamat eksitotoksitesitesi ile de hücre içi Ca⁺² iyon artışı sağlanmıştır. Böylece hücrenin mitokondri ve ER stresi sonucu apoptozise gitmesi sağlanmıştır. Apoptozis ile hücre ölümü indüklenen gruplarda kaspaz-3 seviyeleri kontrol grubuna göre ciddi düzeyde artış göstermiştir. TMZ ile yapılan tedavi sonrasında apoptozis indükleyici ajan verilen gruplarda kaspaz-3 düzeylerinin yükselmediği görülmüştür. Bu sonuçlar bize, TMZ’nin apoptozis yolağının başlatıcı etkenleri olan mitokondri ve ER stresini azaltarak hücrenin ölümünü durdurduğu veya yavaşlattığını göstermiştir. Hücre canlılık oranlarına bakıldığında da TMZ’nin hücre yaşayabilirliğini artırdığı gösterilmiştir. Akridin boyaması sonucunda TMZ tedavisi ile apoptozis belirteçlerinden olan hücresel küçülme/büzüşmenin, hücre içi kromatin yoğunlaşmasının ve apoptotik cisimcik oluşumlarının azaldığı gösterilmiştir.

Daha önceki TMZ çalışmaları sonucunda TMZ’nin mitokondri membranını stabilize ederek koruduğu ve membranda PTP oluşumunu azalttığı gösterilmiştir (116). Ayrıca in-vivo çalışmalarda glutamat eksitotoksitesitesinde hücreleri koruduğu gösterilmiştir (104). Glutamat eksitotoksitesitesinde hücre içi kalsiyum düzeyi atmaktadır. Artan hücre içi Ca⁺², hücre içi Ca⁺² deposu olan ER üzerindeki ryanodin reseptörlerini uyararak (RyR3) Ca⁺² depolarını sitozole boşaltmaktadır (117). Bu reseptörü bloke eden maddeler; ryanodin, dantrolen, ruthenium red ve anestezik maddelerden olan prokain ile tetrakaindir (118). Bu maddeler Alzheimer hastalığı tedavisinde denenmektedir (119). Dantrolen, ryanodin reseptör (RyR1) mutasyonu

sonucu gelişen malign hipertermi ve konjenital miyopati olan santral kor hastalığı durumlarında tedavide kullanılmaktadır.

Hücre içi kalsiyum depolarının boşalması, hücre membranındaki depo-kontrollü kalsiyum kanallarının (store-operated calcium channels, SOCC) açılmasına ve ekstrasellüler ortamdan hücre içine kalsiyum girişine neden olmaktadır (120). Eğer hücre de bu ani sitozolik Ca^{+2} yüklenmesine engel olunamazsa, artan hücre içi Ca^{+2} mitokondrial kaspaz yolağını uyararak, proteazların ve endonükleazların aktifleşmesiyle hücreyi ölüme götürmektedir (121).

TMZ'nin son çalışmalarda SOCC'u inhibe ettiği gösterilmiştir (122). SOCC, hücre içindeki Ca^{+2} depolarının boşaldıktan sonra hücre içine dışarıdan Ca^{+2} girişini sağlayıp hücre içi kalsiyum düzeyinin artışına sebep olan kanallardır. Hücre içi Ca^{+2} kanallarını boşaltan herhangi bir süreç, SOCC'tan Ca^{+2} girişini uyarabilmektedir. Mekanizması halen aydınlatılamamıştır (123). SOCC'tan Ca^{+2} girişi yolağı Huntington hastalığı patogenezinde rolü olduğu görülmüş ve tedavi hedefleri arasına girmeye başlamıştır (124).

Bu çalışmanın sonucuna göre TMZ'nin MSG ile uyarılan hücre ölümünü ve hücrel kaspaz-3 seviyelerindeki yükselişi azaltması, SOCC'yi inhibe ederek, hücre içi Ca^{+2} iyonu artışını kısmen sınırlandırmış olabileceği düşünülmektedir. Bu süreçte SOCC'un inhibisyonuyla hücre içi Ca^{+2} homeostazisi sağlanmasının kolaylaştığı ve ayrıca mitokondrinin de, artan hücre içi Ca^{+2} 'yı alarak ER'ye yardımcı olduğu düşünülmektedir (125).

Bu çalışmada ayrıca glial hücrelere kıyasen sinir hücrelerinin H_2O_2 toksisitesine daha duyarlı olduğu, herhangi bir oksidatif stres durumunda nöronların daha çabuk etkilenebileceği bir kez daha gösterilmiştir.

Sonuç olarak, H_2O_2 ve MSG ile uyarılmış apoptotik hücre ölümünde TMZ'nin belirgin bir koruyucu etkisinin olduğunu ve TMZ'nin çok yüksek dozlarda dahi akut toksik etkisinin olmadığını bu çalışma açıkça ortaya koymuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırmada H_2O_2 ve MSG ile oluşturulan apoptotik hücre ölümü histopatolojik (faz kontrast mikroskopi), spektrofotometrik ölçüm (MTT testi ve Kaspaz-3 ELİSA yöntemi) ve histokimyasal boyama (akridin oranj) ile incelenmiştir. TMZ'nin bu toksisitelere karşı tedavideki yeri araştırılmıştır. Sonuçta;

1. Kontrol gruplarında olmayan apoptotik hücreler H_2O_2 ve MSG ile indüklenen gruplarda anlamlı düzeyde ortaya çıkmıştır.
2. Apoptozisin H_2O_2 ve MSG ile indüklenmesinden önce verilen TMZ'nin hücre canlılığını anlamlı düzeyde koruduğu anlaşılmıştır,
3. TMZ'nin koruyucu etkisinin MSG toksisitesine oranla H_2O_2 toksisitesinde daha etkili olduğu belirlenmiştir,
4. TMZ'nin toksik dozunun rutin tedavide kullanılan dozun 6000 katı kadar olduğu saptanmıştır,
5. TMZ'nin nörolojik hastalıklarda hücre yaşayabilirliğini belirgin düzeyde artırmasından ve toksik dozunun çok yüksek olmasından dolayı tedavi seçeneklerine eklenebileceği sonucu ortaya çıkmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. **Harpey C, Clauser P, Labrid C, Freyria JL, Poirier JP.** Trimetazidine, a cellular anti-ischemic agent. *Cardiovasc Drug Rev* **1989**;6:292-312.
2. **Honoré E, Adamantidis MM, Challice CE, Dupuis BA.** Cardioprotection by calcium antagonists, piridoxilate and trimetazidine. *IRCS Med Sci* **1986**;14:938-939.
3. **Maridonneau-Parini K, Harpey C.** Effects of trimetazidine on membrane damage induced by oxygen free radicals in human red cells. *Br J Clin Pharmacol* **1985**;20: 148-151.
4. **Takenaka F, Sakanashi M, Watanabe A, et al.** Effects of trimetazidine on the coronary circulation and myocardial metabolism in the dog *Pharmacometrics* **1976**; 1 1:429-435.
5. **Timour Q, Goupit P, Lang J, Durr F, Faucon G.** Anti-anginal effects of trimetazidine: Mechanisms. *Xth International Congress on Pharmacology*. Sydney, Australia, August 23-28, **1987**:648.
6. **Guarnieri C, Muscari C ;** Antioxy radical properties of trimetazidine. *Res. Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, **1989** 64(2): 215-225,
7. **McClellan K J, Plosker G L ;** Trimetazidine. A review of its use in stable angina pectoris and other coronary conditions. **1999** 58(1):143-157,
8. **Vinokurov MG, Astashkin EI, Yurinskaya MM, Glezer MG, Sobolev KE, Grachev SV.** Trimetazidine blocks store-operated Ca(2+) channels in HL-60 and THP-1 cell lines and inhibits the secretion of tumor necrosis factor. *Dokl Biol Sci.* **2011** Nov-Dec;441:417-20.
9. **Guarnieri C, Muscari C.** Beneficial effects of trimetazidine on mitochondrial function and superoxide production in the cardiac muscle of monocrotaline-treated rats. *Biochem Pharmacol.* 1988 Dec 15;37(24):4685-8.
10. **Roulet MJ, Gamier D.** The antianginal drug, trimetazidine, potentiates the tension on hypoxic ductus arteriosus. *Inserrn* **1984**;124:481-488
11. **Honoré E, Adamantidis MM, Challice CE, Dupuis BA.** Cardioprotection by calcium antagonists, piridoxilate and trimetazidine. *IRCS Med Sci* **1986**;14:938-939.
12. **J.F. Renaud,** Internal pH. Na and Ca regulation by Trimetazidine during cardiac cell acidosis, *Cardiovasc. Drugs Ther.* **1988**; 1:677–686.
13. **Şahin MA.** Akustik travmaya bağlı gelişen ani işitme kayıplarının önlenmesinde Trimetazidin'in rolü. Uzmanlık Tezi. Sağlık Bakanlığı Şişli Etfal Eğitim Ve Araştırma Hastanesi I.Kulak-Burun-Boğaz Ve Baş-Boyun Cerrahisi Kliniği. **2005**
14. **Dayanithi G, Desmadryl G, Travo C, Chabbert C, Sans A.** Trimetazidine modulates AMPA/kainate receptors in rat vestibular ganglion neurons. *European Journal of Pharmacology* **2007**; 574:8–14
15. **Haguenauer JP, Bebear JP, Bordes LR, Jacquot M, Mercier J, Morgon A, Pech A, Romanet P, Thomassin JM, Wayoff M.** Trimetazidine and degenerative deafness. Effects on hearing and integration, *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac.* 1990;107 Suppl 1:51-6.
16. **A. Martini, F. De Domenico,** Trimetazidine versus betahistine in Meniere's disease. Double blind study, *Drugs Today* 26 **1990**; 23–31, Suppl. 13.
17. **A. Pech,** A multicenter double blind versus placebo study of trimetazidine in tinnitus. A clinical approach to tinnitus, *Ann. Otolaryngol. Chir. Cervicofac.* 107 **1990**; 66–67.
18. **Delbarre, B., Delbarre, G., Calinon, F.** Action of trimetazidine on retina of gerbils after ischemia reperfusion insult: determination of OH, amino acids, and electroretinogram. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1994**;738, 334-340.
19. **Baltalarlı A, Coşkun E, Ortaç R, Onem G, Gökşin I, Sirin BH.** Protective effects of trimetazidine in transient spinal cord ischemia. *Res Exp Med* **2000**; 200:43–51
20. **Erdoğan H.** Bir Trimetazidine türevi olan s-15176'nın nöroprotektif etkilerinin deneysel spinal kord travması modelinde incelenmesi. Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Kliniği. Uzmanlık Tezi. **2009**
21. **Stacy M, Jankovic J.** Differential diagnosis of Parkinson's disease and the Parkinson's plus syndromes. *Neurologic Clinics. Parkinson's Disease*, vol. 10(2), W.B. Saunders, Philadelphia. **1992**; 341–349

22. **Errea-Abad JM, Ara-Callizo JR, Aibar-Remon C.** Drug-induced parkinsonism. Clinical aspects compared with Parkinson's disease. *Rev Neurol*, 27 **1998**; 35–39
23. **Llau ME, Nguyen L., Senard JM, Rascol O, Montastruc JL.** Drug-induced parkinsonian syndromes: a 10-year experience at a regional center of pharmaco-vigilance. *Rev Neurol*, 50 **1994**; 757–762
24. **Teive HA, Troiano AR, Germiniani FM, Werneck LC.** Flunarizine and cinnarizine-induced parkinsonism: a historical and clinical analysis. *Parkinsonism Relat Disord.* **2004**;10(4):243-5.
25. **Hoffman WF, Labs SM, Casey DE.** Neuroleptic-induced parkinsonism in older schizophrenics. *Biol Psychiatry.* **1987**;22(4):427-39.
26. **Casey DE.** Pathophysiology of antipsychotic drug-induced movement disorders. *J Clin Psychiatry.* **2004**;65 9:25-8.
27. **Sivet J, de la Gastine B, Mosquet B, Lescure P, Boutemy J, Le Boisselier R, Coquerel A.** Trimetazidine-induced encephalopathy with choreiform disorders: a case report. *Rev Med Interne.* **2008**;29(6):512-5.
28. **Martí Massó JF.** Trimetazidine-induced parkinsonism. *Neurologia.* **2004**;19(7):392-5.
29. **Acworth IN, Bailey B.** Reactive Oxygen Species. In: *The handbook of oxidative metabolism.* Massachusetts: ESA Inc., **1997**; 1-1 to 4-4
30. **Bert P.** Barometric pressure: researches in experimental physiology. Paris, **1878**.
31. **Weiss S.** Oxygen, ischemia and inflammation. *Acta Physiol Scand* **1986**;126 (suppl 548):9.
32. **Del Maestro RF.** An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Pyysiol Scand* **1980**; (suppl 492): 153.
33. **Reiter RJ.** Oxidative processes and antioxidant defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J*, **1995**; 9: 526-533.
34. **Baker GL, Corry RJ, Autor AP.** Oxygen free radical induced damage in kidneys subjected to warm ischemia and reperfusion. *Ann Surg* **1985**;202:628.
35. **Crapo JD, DeLong DM, Sjostrom K, Hasler GR, Drew RT.** The failure of aerosolized superoxide dismutase to modify pulmanary oxygen toxicity. *Am Rev Respir Dis* **1977**;115:1027.
36. **Weisiger RA.** Oxygen radicals and ischemic tissue injury. *Gastroenterology* **1986**;90:494.
37. **McCord JM.** Free radicals and inflamtion; protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science* **1974**;185:539.
38. **Fantone JC, Ward PA.** Oxygen-derived free radicals and their metabolites: relationship to tissue injury. *Curr Concepts Kalamazoo, Mich: The Upjohn Co.* **1985**;4
39. **Marklund SL.** Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. *J Clin Invest.* **1984**;74:1398.
40. **McCord JM, Roy RS.** The pathophysiology of süper-oxide: roles in inflammation and ischemia. *Can J Biochem Physiol Pharmacol* **1982**;60:1346.
41. **Parks D.** Oxygen radicals: mediators of gastrointestinal pathophysiology. *Gut* **1989**;30:293.
42. **Parks DA, Granger DN.** Xantine oxidase: biochemistry, distrubution and physiology. *Acta Physiol Scand* **1986**;126 (suppl 548):87.
43. **Jarasch ED, Bruder G, Heid HW.** Significance of xantine oxidase in capillary endothelial cells. *Acta Physiol Scand* **1986**;126 (suppl 548):39.
44. **Auscher C, Amory N, Pasquier C.** Localization of xantine oxidase activity in hepatic tissue: A new histochemical method. *Adv Exp Med Biol.* **1977**;76:605.
45. **Vicent MF, Van Den Bergehe G, Hers HG.** Metabolism of hypoxanthine in isolated hepatocytes. *Biochem J* **1983**;222:145.
46. **Arthur MJ, Bentley IS, Tanner AR, Saunders PK, Millward-Sadler GH, Wright R.** Oxygen-derived free radicals promote hepatic injury in the rat. *Gastroenterology* **1985**;89:1114.
47. **Petrone WF, English DK, Wong K, McCord JM.** Free radicals and inflammation: superoxide-dependent activation of neutrophil chemotactic factor in plasma. *Proc Nati Acad Sci usa* **1980**;77:1159.

48. **Davies SJ, Reichardt-Pascal SY, Vaughan D, Russel GI.** Differential effect of ischemia-reperfusion injury on anti-oxidant enzyme activity in the rat kidney. *Exp Nephrol* **1995**; 3: 348-354.
49. **Taguchi M, Kojima T.** Yield of OH radicals in water under high-density energy deposition by heavy-ion irradiation. *Radiat. Res.* **2005**;163, 455–461.
50. **Stadtman ER and Berlett BS.** Reactive Oxygen-Mediated Protein Oxidation in Aging and Disease. *Chem. Res. Toxicol.* **1997**;10 (5), pp 485–494.
51. **Kuraoka I, Robins P, Masutani C, Hanaoka F, Gasparutto D, Cadet J, Wood RD, Lindahl T.** Oxygen free radical damage to DNA. Translesion synthesis by human DNA polymerase eta and resistance to exonuclease action at cyclopurine deoxynucleoside residues. *J Biol Chem.* **2001**;28;276(52):49283-8.
52. **Saito Y, Nishio K, Ogawa Y, Kimata J, Kinumi T, Yoshida Y, Noguchi N, Niki E.** Turning point in apoptosis/necrosis induced by hydrogen peroxide. *Free Radic Res.* **2006**;40(6):619-30.
53. **Fonnum F.** Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem* **1984**; 42 : 1–11.
54. **Danbolt NC.** Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* **2001**; 65 : 1–105.
55. **Steinman L.** Multiple sclerosis: a two-stage disease. *Nat Immun* **2001**; 2: 762–764.
56. **Schwartz M, Shaked I, Fisher J, Mizrahi T, Schori H.** Protective autoimmunity against the enemy within: fighting glutamate toxicity. *Trends Neurosci.* **2003**; 26(6): 297-302.
57. **Hayashi, T.** Effects of sodium glutamate on the nervous system. *Keio J. Med.* **1954**; 3: 183-192.
58. **Lucas, DR; Newhouse, JP.** "The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina." *A.M.A. Archives of ophthalmology* **1957**; 58 (2): 193–201.
59. **Olney, JW.** "Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate." *Science* **1969**; 164 (3880): 719–21
60. **Lipton SA, Rosenberg PA.** Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Eng J Med* **1994**; 330: 613-622.
61. **Fields RD, Yu C, Nelson PG.** Calcium network activity, and the role of NMDA channels synaptic plasticity in vitro. *J Neurosci* **1991**; 11: 134-146.
62. **Young W, Koreh I.** Potassium and calcium changes in injured spinal cords. *Brain Res* **1986**; 365: 42-53.
63. **Choi DW.** Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture in calcium dependent. *Neurosci Lett* **1985**; 58: 293-297.
64. **Lysko PG, Lysko KA, Webb CL, Feuerstein G.** Neuroprotective effects of carvedilol, a new antihypertensive, at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Neurosci Lett.* **1992**; Dec 14;148(1-2):34-8.
65. **Malcolm CS, Ritchie L, Grieve A, Griffiths R.** A prototypic intracellular calcium antagonist, TMB-8, protects cultured cerebellar granule cells against the delayed, calcium-dependent component of glutamate neurotoxicity. *J Neurochem.* **1996**; Jun;66(6):2350-60.
66. **Düzenli S, Bakuridze K, Gepdiremen A.** The effects of ruthenium red, dantrolene and nimodipine, alone or in combination, in NMDA induced neurotoxicity of cerebellar granular cell culture of rats. *Toxicol In Vitro.* **2005**; Aug;19(5):589-94.
67. **Calabrese V, Bates TE, Stella AM.** NO synthase and Noddependent signal pathways in brain aging and neurodegenerative disorders: The role of oxidant/antioxidant balance. *Neurochem Res* **2000**; 25, 1315–1341.
68. **Back SA, Gan X, Li Y, Rosenberg PA, Volpe JJ.** Maturation-dependent vulnerability of oligodendrocytes to oxidative stress-induced death caused by glutathione depletion. *J Neurosci* **1998**; 18: 6241–6253.
69. **Milagros Bassani Molinas M.** Oligoclonal bands and antibody responses in multiple sclerosis. *J Neurol* **2002**; 249: 375–89.
70. **Zong WX, Thompson CB.** Necrotic death as a cell fate? *GenesDev* **2006**; 20: 1-15.
71. **Fauser BCJM, Rutherford AJ, Strauss JF, Van A.** Molecular biology in reproductive medicine; Parthenon Publishing Group Inc. New York. 1th Edition, **1999**; 80-87

72. **Thompson CB.** Apoptosis. In: Paul WE, ed. *Fundamental Immunology*. Lippincott-Raven Publishers, **1999**.
73. **Wyllie AH, Duvall E.** Cell death. *Oxford Textbook of Pathology*, vol 1. USA, Oxford University Press **1992**; 142-147.
74. **Cohen JJ.** Apoptosis: The physiological pathway of cell death. *Hosp Pract* **1993**; 15: 35-43.
75. **Cohen JJ.** Apoptosis. *Immunol Today* **1993**; 14: 126-130.
76. **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.
77. **Wyllie AH, Kerr J.F.R., Currie A.R.** Cell death: The significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* **1980**; 68: 251-306.
78. **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.
79. **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.
80. **Majno G, Torisl A.** Apoptosis oncosis and necrosis. *Am J Pathol*, **1995**; 146: 3-15.
81. **Cummings MC, Winterford CM, Walker NI.** Apoptosis. *Am J Surg Pathol.* **1997**; 21: 88-101.
82. **Levison DA, Hopwood D.** Atrophy and apoptosis in the cyclical human endometrium. *J Pathol.* **1976**; 119: 159-166.
83. **Schwartzman RA, Cidloski JA.** Apoptosis; the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Reviews*, **1993**; 14: 133-144.
84. **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.
85. **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.
86. **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.
87. **Pollack M, Leeuwenburgh C.** Apoptosis and aging: role of the mitochondria. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* **2001**; Nov;56(11):B475-82.
88. **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.
89. **Elizabeth C. Ledgerwood and Ian M. Morison.** Targeting the Apoptosome for Cancer Therapy. *Clin Cancer Res.* **2009**;15:420-424.
90. **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.
91. **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.
92. **Nakamura K, Bossy-Wetzel 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.
93. **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.
94. **Earnshaw WC.** Nuclear changes in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*, **1995**; 7: 337-43.
95. **Eastman A.** Survival factors, intranuclear signal transduction and the activation of endonucleases in apoptosis. *Cancer Biology*, **1995**; 6: 45-52.
96. **Balakumran A, Champbell GA, Maslen MT.** Calcium channel blockers induce thymic apoptosis in vivo in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, **1996**; 139: 122-127.
97. **Collins JA, Cyntia CA, Young KK, Vesely JM.** Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J Histochem Cytochem*, **1997**; 45: 923-934.

98. **Bortner CD, Odernburg NBE, Crdlowski JA.** The role of fragmentation in apoptosis. *Trends in Cell Biology*, **1995**; 5: 21-28.
99. **Wyllie AH.** Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, **1980**; 284: 555-556.
100. **Lu J, Ashwell K, Ken WS, Waite P.** Advances in spinal cord injury: Role of Apoptosis. *Spine*, **2000**; 25: 1859-1866.
101. **Spencer S, Cataldo NA, Jaffe RB.** Apoptosis in the human female reproductive tract. *Obstetrical and Gynecological Survey*, **1996**; 5: 314-323.
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
103. **Gayet JL, Paganelli F, Cohen-Solal A.** Update on the medical treatment of stable angina. *Arch Cardiovasc Dis*. **2011**; Oct;104(10):536-44.
104. **Payet O, D'Aldin C, Maurin L, Bonne C, Muller A.** Anti-excitotoxic activity of trimetazidine in the retina. *J Ocul Pharmacol Ther*. **2004**; Feb;20(1):85-92.
105. **Demir T, Turgut B, Ozercan I, Gul FC, Ilhan N, Celiker U.** Trimetazidine for prevention of induced ischemia and reperfusion of guinea pig retina. *Clin Ophthalmol*. **2010**; Feb 2;4:21-6.
106. **James AL, Thorp MA.** Menière's disease. *Clin Evid (Online)*. **2007**; Mar 1;2007. pii: 0505.
107. **Markou K, Nikolaou A, Petridis DG, Vlachtsis KC, Kouloulas A, Daniilidis IC.** Evaluation of various therapeutic schemes in the treatment of tinnitus due to acute acoustic trauma. *Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg*. **2004**; 12(5-6):107-14.
108. **Markou K, Lalaki P, Barbetakis N, Tsalighopoulos MG, Daniilidis I.** The efficacy of medication on tinnitus due to acute acoustic trauma. *Scand Audiol Suppl*. **2001**; (52):180-4.
109. **Abreu Lde A, Kawano PR, Yamamoto H, Damião R, Fugita OE.** Comparative study between trimetazidine and ice slush hypothermia in protection against renal ischemia/reperfusion injury in a porcine model. *Int Braz J Urol*. **2011**; Sep-Oct;37(5):649-56.
110. **Martins GF, Siqueira Filho AG, Santos JB, Assunção CR, Bottino F, Carvalho KG, Valência A. Arq Bras.** Trimetazidine on ischemic injury and reperfusion in coronary artery bypass grafting. *Cardiol*. **2011**; Sep;97(3):209-16.
111. **Pekcetin C, Ergur BU, Kiray M, Bagriyanik A, Tugyan K, Erbil G, Ozogul C.** The protective effects of trimetazidine on testicular ischemia and reperfusion injury in rats. . *Pediatr Surg Int*. **2007**; Nov;23(11):1113-8.
112. **Martí Massó JF.** [Trimetazidine-induced parkinsonism]. [Article in Spanish] *Neurologia*. **2004**; Sep;19(7):392-5
113. **Martí Massó JF, Martí I, Carrera N, Poza JJ, López de Munain A.** Trimetazidine induces parkinsonism, gait disorders and tremor. *Therapie*. **2005**; Jul-Aug;60(4):419-22.
114. **Avorn J, Bohn RL, Mogun H, Gurwitz JH, Monane M, Everitt D, Walker A.** Neuroleptic drug exposure and treatment of parkinsonism in the elderly: a case-control study. *Am J Med*. **1995**; Jul;99(1):48-54.
115. **Marras C, Gruneir A, Wang X, Fischer H, Gill SS, Herrmann N, Anderson GM, Hyson C, Rochon PA.** Antipsychotics and mortality in Parkinsonism. *Am J Geriatr Psychiatry*. **2012**; Feb;20(2):149-58.
116. ¹ **Settaf, A., Zahidy, M., Elimadi, A., Sapena, R., Alsamad, I.A., Tillement, J.P., Morin, D.** S-15176 reduces the hepatic injury in rats subjected to experimental ischemia and reperfusion. *Eur. J. Pharmacol*. **2000**; 406, 281– 292.
117. **Marks AR.** Intracellular calcium-release channels: regulators of cell life and death. *Am J Physiol*. **1997**; Feb;272(2 Pt 2):H597-605.
118. **Vites AM, Pappano AJ.** Distinct modes of inhibition by ruthenium red and ryanodine of calcium-induced calcium release in avian atrium. *J Pharmacol Exp Ther*. **1994**; Mar;268(3):1476-84.
119. **Berridge MJ.** Calcium signalling and Alzheimer's disease. *Neurochem Res*. **2011**; Jul;36(7):1149-56.
120. **Parekh AB, Penner R.** Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev*. **1997**; Oct;77(4):901-30.

- 121.Tripathi A, Chaube SK.** High cytosolic free calcium level signals apoptosis through mitochondria-caspase mediated pathway in rat eggs cultured in vitro. *Apoptosis*. **2012**; Feb 7. [Epub ahead of print]
- 122.Vinokurov MG, Astashkin EI, Yurinskaya MM, Glezer MG, Sobolev KE, Grachev SV.** Trimetazidine blocks store-operated Ca(2+) channels in HL-60 and THP-1 cell lines and inhibits the secretion of tumor necrosis factor. *Dokl Biol Sci*. **2011**; Nov-Dec;441:417-20.
- 123.Eraç Y, Selli Ç, Tosun M.** Kalsiyumun Çok Yönlü İşlevselliğinde TRPC İyon Kanallarının Rolü. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy* **2009**; Jan Vol 28; 2: 161-183.
- 124.Wu J, Shih HP, Vigont V, Hrdlicka L, Diggins L, Singh C, Mahoney M, Chesworth R, Shapiro G, Zimina O, Chen X, Wu Q, Glushankova L, Ahlijanian M, Koenig G, Mozhayeva GN, Kaznacheyeva E, Bezprozvanny I.** Neuronal store-operated calcium entry pathway as a novel therapeutic target for Huntington's disease treatment. *Chem Biol*. **2011** 24;18(6):777-93.
- 125.Parekh AB.** Mitochondrial regulation of store-operated CRAC channels. *Cell Calcium*. **2008**; Jul;44(1):6-13.