

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DUYGUDURUM DENGELİYİCİ İLAÇLARDAN
LİTYUM VE VALPROİK ASİT'İN SH-SY5Y
HÜCRELERİ ÜZERİNE KORUYUCULUĞU**

BEGÜM ALURAL

**TEMEL SİNİRBİLİMLER
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

İZMİR-2012

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2010970082

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DUYGUDURUM DENGLEYİCİ İLAÇLARDAN
LİTYUM VE VALPROİK ASİT'İN SH-SY5Y
HÜCRELERİ ÜZERİNE KORUYUCULUĞU**

BEGÜM ALURAL

**TEMEL SİNİRBİLİMLER
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Ayşegül ÖZERDEM

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2012.KB.SAG.050 sayı ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2010970082

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sinirbilimler Anabilim Dalı, Temel Sinirbilimler Yüksek Lisans programı öğrencisi Begüm Alural **‘DUYGUDURUM DENGLEYİCİ İLAÇLARDAN LİTYUM VE VALPROİK ASİDİN SH-SY5Y HÜCRELERİ ÜZERİNE KORUYUCULUĞU’** konulu Yüksek Lisans tezini 30.07.2012 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.



BAŞKAN
Prof. Dr. Ayşegül Özerdem
Dokuz Eylül Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Sinirbilimler Anabilim Dalı



ÜYE
Prof. Dr. Şermin Genç
Dokuz Eylül Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Sinirbilimler Anabilim Dalı



ÜYE
Doç. Dr. Pınar Akan
Dokuz Eylül Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Biyokimya Anabilim Dalı

ÜYE (Yedek)
Prof. Dr. Görsev Yener
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Nöroloji Anabilim Dalı

ÜYE (Yedek)
Prof. Dr. Doç. Dr. Bekir Uğur
Ergür
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi Histoloji ve
Embriyoloji Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	i
TABLO LİSTESİ.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
KISALTMALAR.....	v
TEŞEKKÜR.....	vii
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	3
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Nörodejenerasyon	5
2.1.1. Nörodejeneratif Hastalıklar.....	5
2.1.2. Nörodejeneratif Hastalıklarda Tedavi.....	8
2.2. Nöroproteksiyon	9
2.2.1. Nöroprotektif Ajanlar.....	9
2.3. Duygudurum Bozuklukları.....	11
2.4. Nöroproteksiyonda Duygudurum Düzenleyici İlaçlar.....	12
2.4.1. Lityum.....	12
2.4.1.1. Lityumun Genel ve Nöroprotektif Etki Mekanizmaları.....	13
2.4.1.2. Lityumun <i>in vitro</i> ve <i>in vivo</i> Nöroprotektif Etkisi.....	13
2.4.2 Valproik Asit.....	17
2.4.2.1. Valproik Asidin Genel ve Nöroprotektif Etki Mekanizmaları.....	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
3.1. Araştırmanın Tipi	19
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	19
3.3. Çalışma Materyali	19
3.4. Çalışmanın Değişkenleri.....	19
3.5. Veri toplama Araçları.....	19
3.5.1. Hücre Kültürü.....	19
3.5.2. <i>In vitro</i> deneyler.....	20

3.5.2.1. Laktat Dehidrogenaz Testi deneyleri için <i>in vitro</i> deney.....	20
3.5.2.2. Cell Death ELISA deneyleri için <i>in vitro</i> deney.....	20
3.5.2.3. PCR deneyleri için <i>in vitro</i> deney.....	21
3.5.3. Laktat Dehidrogenaz Testi.....	21
3.5.4. Cell Death ELISA Yöntemi ile Apoptotik Hücre Analizi.....	22
3.5.5. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi.....	23
3.5.6. PCR.....	24
3.6. Araştırma Planı ve Takvimi.....	25
3.7. İstatistiksel Değerlendirme.....	25
3.8. Araştırmanın Sınırlılıkları.....	25
3.9. Etik Kurul Onayı.....	25
4. BULGULAR.....	26
4.1. Paraquat Uygulanması ile Toksisite Doz Eğrisinin LDH Yöntemiyle Belirlenmesi....	26
4.2. Lityumun SH-SY5Y hücrelerine etkisinin LDH Yöntemiyle Belirlenmesi	27
4.3. Lityumun Paraquat Toksisitesine Karşı Etkisinin LDH Yöntemiyle Belirlenmesi.....	28
4.4. Valproik Asidin SH-SY5Y hücrelerinde Paraquat toksisitesine etkisinin LDH Yöntemiyle Belirlenmesi.....	29
4.5. Valproik Asidin Paraquat Toksisitesine Karşı Etkisinin LDH Yöntemiyle Belirlenmesi.....	29
4.6. Paraquatın Apoptoza olan etkisinin Cell Death ELISA Yöntemiyle Belirlenmesi.....	30
4.7. Lityum Preinkübasyonunun Paraquatla İndüklenen Apoptoza Etkisinin Cell Death ELISA Yöntemiyle Belirlenmesi.....	31
4.7. Paraquat Uygulamasının Bcl-2, Bcl-xl ve Bax mRNA Ekspresyonuna Etkisi.....	32
4.8. Lityum Preinkübasyonunun Paraquat ile değişen Bcl-2, Bcl-xl ve Bax mRNA Ekspresyonuna Etkisi.....	33
4.9. Bcl-2/ Bax Oranı ile Lityumun Antiapoptotik Etkisinin Analizi.....	36
5. TARTIŞMA.....	37
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	40
7. KAYNAKLAR.....	41

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1: Nöroprotektif Ajanlar.....	10
Tablo 2: Lityum'un Nöroprotektif Etkisi İle İlgili <i>In Vivo</i> Çalışmalar.....	15
Tablo 3: Lityum'un Nöroprotektif Etkisi İle İlgili <i>In Vitro</i> Çalışmalar.....	16
Tablo 4: cDNA sentezi için reaksiyon bileşenleri.....	23
Tablo 5: qPCR için reaksiyon bileşenleri.....	24
Tablo 6: Primer dizileri.....	24
Tablo 7: Paraquat Sitotoksitesitesi.....	26
Tablo 8. Lityum'un paraquat sitotoksitesine etkisi.....	28
Tablo 9: Bcl-2/Bax Oranları.....	36

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1. Lityumun hücre içi etki mekanizmaları.....	14
Şekil 2: Paraquat nörotoksitesitesi.....	26
Şekil 3. Maksimal kuyularına oranla göre hücre ölümü.....	27
Şekil 4. Lityum Sitotoksitesitesi.....	27
Şekil 5: Lityum'un paraquat sitotoksitesine etkisi.....	28
Şekil 6: Valproik Asit sitotoksitesitesi.....	29
Şekil 7: Valproik Asit preinkübasyonu sonrası paraquat toksisitesi.....	30
Şekil 8. Paraquatla indüklenen apoptoz (24 saat).....	30
Şekil 9. Paraquatla indüklenen apoptoz (48 saat).....	31
Şekil 10. Lityumun Paraquat ile indüklenen apoptoza etkisi.....	32
Şekil 11: Bcl-2 qPCR analizi.....	32
Şekil 12: Bax qPCR analizi.....	33
Şekil 13: Bcl-xl qPCR analizi.....	33
Şekil 14: Lityum preinkübasyonu sonrası Bcl-2 qPCR analizi.....	34
Şekil 15. Lityum preinkübasyonu sonrası Bax qPCR analizi.....	35
Şekil 16. Lityum preinkübasyonu sonrası Bcl-xl qPCR analizi.....	35
Şekil 17. Bcl-2/ Bax Oranları.....	36

KISALTMALAR

ATP: Adenozin Trifosfat

AH: Alzheimer Hastalığı

ALS: Amyotrofik Lateral Skleroz

APP: Amiloid Prekürsör Protein

A β : Amiloid Beta

Bax: (Bcl2-associated X protein)

Bcl-2: (B-cell lymphoma-2)

Bcl-xl: ; (Bcl-2-like protein)

BDNF: Beyin Kökenli Nörotrofik Faktör (Brain-derived neurotrophic factor)

cAMP: Siklik Adenozin-Tri-Fosfat

cDNA: Komplementer DNA (Complementary DNA)

DA: Dopamin

ERK: Ekstraselüler Sinyal ile düzenlenen kinaz (extracellular-signal-regulated kinases)

FDA: Food and Drug Administration

FGF: Fibroblast Büyüme Faktörü (Fibroblast growth factors)

FFI: Fatal Familyal İnsomnia

GABA: Gamma Amino Bütirik Asit

GAPDH: Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrogenaz

GSK-3: Glikojen Sentaz Kinaz-3

HH: Huntington Hastalığı

5-HT: Serotonin (5-Hidroksitriptamin)

IMPaz: İnositol Monofosfataz

IPPaz: İnositol Polifosfataz

LDH: Laktat Dehidrogenaz

LiCl: Lityum Klorür

mRNA: Messenger RNA

NGF: Sinir Büyüme Faktörü (Nerve growth factor)

NMDA: N-metil-D-aspartik asit

PARP: Poli-(ADP-riboz) polimeraz

PH: Parkinson Hastalığı

PKA: Protein Kinaz A

PKC: Protein Kinaz C

PPAR γ : Peroxisome Proliferatör-Aktive Reseptör

ROS: Reaktif Oksijen Türleri (Reactive oxygen species)

SOD-1: Süper Oksid Dismutaz-1

VPA: Valproik Asit

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimi süresince eğitimimde emeği geçen bütün hocalarıma ve danışmanım Prof Dr. Ayşegül ÖZERDEM'e,

Laboratuar çalışmalarımın tümünde yol gösterici olan ve tez çalışmam süresince hiçbir konuda desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Şermin GENÇ'e,

Bana, laboratuar çalışmalarımın ilk gününden beri büyük sabırla yardımcı olan ekip arkadaşım Uğur Tüfekci'ye, arkadaşlarım Duygu Harmancı ve Berrin Çavuşoğlu'na,

Benim ben olmamı sağlayan aileme ve bana her konuda destek olan sevgili eşime,

Yüksek lisans eğitimim süresince bana maddi destek olan TÜBİTAK'a teşekkürlerimi borç bilirim.

Begüm ALURAL

DUYGUDURUM DÜZENLEYİCİ İLAÇLARDAN LİTYUM VE VALPROİK ASİT'İN SH-SY5Y HÜCRE HATTI ÜZERİNDE KORUYUCULUĞU

Begüm Alural, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Sinirbilimler Anabilim Dalı, 35340, Inciraltı, İzmir

ÖZET

Günümüzde nörodejenerasyonun tedavisinde kesin bir çözüm bulunmamış olmakla birlikte çeşitli yaklaşımlar mevcuttur. Bu yaklaşımlardan biri olan nöroproteksiyon; oluşmuş nöronal hasarı geri döndürecek veya sonraki nöronal hasarlanmayı önleyecek bir ajanın uygulanmasıdır.

Bu çalışmada, insan nöroblastoma hücresinde, mitokondriyal inhibitör olan Paraquat (Methyl viologen dichloride) ile indüklenerek oluşturulacak olan toksisite modelinde, duygudurum düzenleyici ilaçlardan lityum ve valproik asidin nöroprotektif etkisinin olup olmadığı, koruyuculuk var ise bunun hangi yollar aracılığıyla gerçekleştiğinin araştırılması amaçlandı.

Çalışmanın ilk bölümünde, 2-10 mM Lityum ve 100- 1000 μ M Valproik Asidin 24 saat preinkübasyonunun, SH-SY5Y hücrelerini, 500-1000 μ M Paraquat ile oluşturulan hasara karşı koruyup korumadığı araştırıldı. Çalışmanın ikinci bölümünde ise Paraquatın SH-SY5Y hücreleri üzerinde apoptoz yolu ile ölüm oluşturduğu gösterilerek, lityumun apoptotik yolda sorumlu proteinlerden Bcl-2, Bax ve Bcl-xl'in mRNA'ları üzerinde olan etkisi qPCR yöntemiyle incelendi.

Çalışmanın sonucunda; Lityumun 2mM ve 5mM dozlarında 24 saatlik preinkübasyonunun, paraquat toksisitesine karşı hücreleri anlamlı düzeyde koruduğu, Valproik Asidin ise uygulanan dozlarının hücreler üzerinde koruyucu etkisi bulunmadığı görüldü. Ayrıca Lityum preinkübasyonunun, paraquat ile oluşturulan modelde, antiapoptotik etkili Bcl-2 ve Bcl-xl mRNA miktarını arttırırken, proapoptotik etkiye sahip olan Bax mRNA'sını azalttığı belirlendi.

Bu çalışma ile Lityumun, paraquat modeli üzerinde anti-apoptotik etkisi bulunduğu ilk kez gösterilmiş oldu.

Anahtar Sözcükler: Nörodejenerasyon, Nöroproteksiyon, Lityum, Valproik Asit, Paraquat

THE NEUROPROTECTİVE EFFECTS OF LITHIUM AND VALPROIC ACID ON SH-SY5Y CELL LINE

Begüm Alural, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Sinirbilimler Anabilim Dalı, 35340, Inciraltı, İzmir

ABSTRACT

Nowadays, there is not any definite treatment method for neurodegenerative diseases; however, some approaches may be useful for neuroprotection by application of an agent, which may serve for the reversal of neuronal damage or prevention from further neuronal damage.

In this study, it was aimed to analyze whether lithium and valproic acid, which are mood stabilizers, have neuroprotective effects on human neuroblastoma cell line treated with mitochondrial inhibitor paraquat (methylviologen dichloride). Furthermore, the mechanism of protection was further analyzed.

In the first part of the study, the protecting effects of 24 hours pre-incubation of 2-10 mM Lithium and 100-1000 μ M valproic acid followed by the damage caused by 500-1000 μ M paraquat was assessed. In the second part of the experiment, it was shown that paraquat causes apoptotic cell death in SH-SY5Y cells. Then, the impact of lithium on Bcl-2, Bax and Bcl-xl, which are responsible for promotion of apoptosis pathway, was analyzed using qPCR.

As a result of this study, lithium showed protective effects at doses of 2mM and 5mM in 24 hours pre-incubation. On the other hand, Valproic acid did not show any protecting affects. Furthermore, lithium pre-incubation caused up-regulation of anti-apoptotic Bcl-2 and Bcl-xl mRNAs, while pro-apoptotic Bax was decreased.

In this study, the anti-apoptotic effect of lithium on the paraquat-induced neurotoxicity model is shown for the first time.

Keywords: Neurodegeneration, neuroprotection, lithium, valproic acid, paraquat

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nörodejenerasyon, nöronlarda çeşitli nedenlerle meydana gelen hasar sonucunda sinir hücrelerinin yapı ve fonksiyonlarını kaybetmesiyle sonuçlanan bir süreçtir. Nörodejeneratif hastalıklar, ilerleyici nöron hasarı ve ölümü ile ortaya çıkmaktadır. Bu hasarlar , nöron kaybının gerçekleştiği bölgeye özgü kayıplarla (hafıza, hareket, kognisyon) kendini göstermektedir.

Bugün en iyi bilinen nörodejeneratif hastalıklar Alzheimer Hastalığı, Parkinson Hastalığı, Huntington Hastalığı, Amiyotrofik Lateral Skleroz ve Prion Hastalığı olarak sıralanabilir.

Nörodejeneratif hastalıkların ortaya çıkması ve ilerlemesinde; genetik, çevresel ve endojen faktörler rol oynar, ancak bu faktörlerin patolojideki temel moleküler mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak bu hastalıklar incelendiğinde, eksitotoksisite, oksidatif stres, yanlış katlanmış protein birikimi sebepli nöroinflamasyon, mitokondriyal ve proteozomal disfonksiyon, sinapsların bozulması gibi bazı ortak noktalarının bulunduğu gösterilmiştir (Farooqui and Horrocks, 2007; Farooqui, 2009a).

Günümüzde nörodejenerasyonun tedavisinde kesin bir çözüm bulunmamış olmakla birlikte çeşitli yaklaşımlar mevcuttur. Bu yaklaşımlardan biri olan nöroproteksiyon; oluşmuş nöronal hasarı geri döndürecek veya sonraki nöronal hasarlanmayı önleyecek bir ajanın uygulanmasıdır. Bu amaçla kullanılan ajanlar arasında antioksidanlar, antiapoptotik ajanlar, trofik faktörler, antiinflamatuvar ajanlar, protein birikimini engelleyici ajanlar ve psikotropik ajanlar sayılabilir. Bunun yanı sıra diyetin düzenlenmesi, vitamin takviyesi, östrojen uygulanması gibi çeşitli yaklaşımlar da araştırılmaktadır (Djaldetti, 2003).

Psikotropik ilaçlar apati, agresyon, ajitasyon, disinhibisyon, anksiyete, uyku ve iştah düzensizlikleri gibi davranım ve duygulanım bozukluklarının eşlik ettiği psikoz, anksiyete bozukluğu, depresyon, bipolar bozukluk, demans gibi nöropsikiyatrik hastalıkların semptomatik ve koruyucu tedavisinde kullanılan ilaçlardır. Bu ilaçlar, nörodejeneratif hastalıklarda görülen nöropsikolojik belirtilerin tedavisinde de sıklıkla kullanılmaktadır. Bu ilaçların nöroprotektif etkileri yakın tarihlerde gösterilmiş olup, son dönemde yapılan çalışmalar, psikotropaların çeşitli hücre içi mekanizmalar sayesinde nöroproteksiyonda rol oynadığına dair bulgular sunmuştur.

Bu çalışmalarda kullanılan psikotrop ilaçlar; antipsikotikler (haloperidol, chlorpromazine, risperidone, olanzapine vb.), duygudurum dengeleyiciler (lityum, valproik asit, karbamazepine vb.), antidepresanlar (desipramine, nortriptyline, maprotiline vb.), apati tedavisinde kullanılan dopamin agonistleri (ropinirole, amantadine,) şeklinde gruplandırılabilirler.

Biz de bu çalışmada, insan nöroblastoma hücresinde, mitokondriyal inhibitör olan Paraquat (Methyl viologen dichloride) ile indüklenerek oluşturulacak olan toksisite modelinde, duygudurum düzenleyici ilaçlardan lityum ve valproik asidin nöroprotektif etkisinin olup olmadığını, koruyuculuk var ise bunun hangi yollar aracılığıyla gerçekleştiğini araştırmayı amaçladık.

H1: Lityum ve Valproik Asit, SH-SY5Y hücrelerini paraquat toksisitesine karşı korur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nörodejenerasyon

Nörodejenerasyon terimi, nöronlarda çeşitli çeşitli nedenlere bağlı olarak ortaya çıkan hasarı ifade eder. Nörodejenerasyon sinir hücrelerinin yapı ve fonksiyonlarını kaybetmesiyle sonuçlanan bir süreçtir (Jellinger, 2007). Nörodejeneratif hastalıklar ilerleyici nöron hasarı ve ölümü ile tanımlanır. Bu hastalıkların en belirgin özelliklerinden biri özel nöron tiplerinde birtakım proteinlerin yanlış katlanması ve birikimidir. Söz konusu hastalıklar, belli bir düzeyde protein birikimi gerçekleştikten sonra ortaya çıkar ve ilerleyen yıllarla birlikte birçok belirtiyi beraberinde getirir (Jellinger, 2007). Bu yüzden nörodejeneratif bir hastalığın gelişmesinde bilinen en önemli risk faktörü yaştır. Bir çok nörodejeneratif bozukluk sporadik olarak ortaya çıkmasına rağmen, nadiren genetik değişikliklerin de nörodejenerasyona sebep olduğu saptanmıştır.

2.1.1. Nörodejeneratif Hastalıklar

Nörodejeneratif hastalıklar, etiyojisi tam olarak bilinmeyen, multifaktoriyel nedenlerle ortaya çıkan hastalıkları tanımlamaktadır. Bugün en iyi bilinen nörodejeneratif hastalıklar Alzheimer Hastalığı, Parkinson Hastalığı, Huntington Hastalığı, amiyotrofik lateral skleroz (ALS) ve Prion Hastalığı olarak sıralanabilir (Jellinger, 2007).

Nörodejeneratif hastalıkların ortaya çıkışını tetikleyen faktörler veya süreçler birbirinden farklı olsa da, bu hastalıkları tetikleyen ortak patolojik mekanizmaların olduğu bilinmektedir. Bu mekanizmalar;

1. Yanlış protein katlanmaları ve oluşan anormal proteinlerin yıkılmasındaki kusurlara bağlı protein birikimleri
2. Mitokondrilerde fonksiyon bozuklukları, biyoenerjik sistemin hasarı ve DNA hasarı,
3. Oksidatif strese bağlı olarak serbest radikallerin ve reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) oluşumu
4. Hücrel ve aksonal transportun bozulması
5. Nöronal golgi aygıtında fragmentasyon

6. Moleküler şaperonlarda mutasyonların ve fonksiyon bozukluklarının ortaya çıkması ,
7. Nörotrofinlerde disfonksiyon,
8. Nöroinflamatuvar ve nöroimmün işlemlerin başlaması

Bu mekanizmaların birbirleriyle olan kompleks ilişkisi sonucunda nöronun, fonksiyonunu kaybederek ölüme gittiği, ancak bu olayların hangi sırayla meydana geldiği halen bilinmemektedir (Jellinger, 2007).

Alzheimer Hastalığı

Alzheimer Hastalığı nörodejeneratif hastalıkların en sık rastlanan şeklidir, AH ilerleyen hafıza kaybı, insan ve objeleri tanıma kaybı, zihinsel ve sosyal yeteneklerin kişinin günlük yaşam faaliyetlerini etkileyecek derecede bozulması ile tanımlanan ve genellikle geç başlangıçlı olan bir hastalıktır. Ön beyin bazalinde ve hipokampüste görülen nöron dejenerasyonu kadar sinaptik patoloji ve nöron iletişim sistemindeki bozukluklar da hastalığın patogenezinde oldukça önemlidir. AH iki farklı protein birikimi ile birlikte görülür: nöritik (senil) plaklar ve nörofibriller yumaklar. Nöritik plaklar hücre dışı birikimlerdir ve esas bileşeni amiloid öncül proteininin (APP) proteolitik olarak işlenmesi sonucu ortaya çıkan amiloid beta ($A\beta$) peptididir. Mikrotubul ilişkili bir protein olan tau tarafından oluşturulan nörofibriller yumaklar ise hücre içi birikimlerdir (Guo, 1996).

Alzheimer hastalığında kalsiyum homeostazının bozulmasının sonucu, β -amiloid protein sentezini anormal olarak arttıran presenilin-1 geninin mutasyonunun, nöronları amiloid ile oluşan apoptozise karşı duyarlı hale getirdiği belirlenmiştir (Higuchi, 2004).

Parkinson Hastalığı

Parkinson Hastalığı (PH), Alzheimer hastalığından sonra görülen ikinci en yaygın nörodejeneratif hastalıktır. PH'nın görülme sıklığı 65 yaş üzeri toplum kesiminde %2'dir ve yaş ile birlikte artış göstermektedir; bu özelliği de PH'nın yaşlanma ile doğrudan ilintili bir hastalık olduğu gerçeğini ortaya koymaktadır. İlerleyici bir hastalık olan PH, semptomatik açıdan istirahat tremoru, bradikinezi, kaslarda sertlik ve duruşsal dengesizlik ile karakterize edilebilir (Ahlskog JE, 2001). Parkinson Hastalığının patolojik açıdan ayırıcı özelliği, beyin substansiya nigra pars kompakta bölgesinde bulunan dopaminerjik nöronların kaybı ve henüz

işlevini kaybetmemiş olan hücrelerin sitoplazmalarında içinde protein agregatlarını barındıran Lewy cisimleri varlığıdır (Lansbury Jr PT, 2002).

PH'da görülen nöron ölümü mekanizmasının, bir etiyolojik faktör tarafından tetiklendiği yönünde görüşler olup, ailesel olgulardan yola çıkılarak bulunan altı gen ve bunların kodladıkları proteinlerin hücredeki görevleri, PH'ya yol açan hücresel değişimlerin daha çok ubikütin/proteozom sistemini etkilediğini göstermektedir. Bunun yanı sıra serbest radikal oluşumu, mitokondriyal bozukluklar, eksitotoksisite, nöroinflamasyon ve apoptoz gibi faktörlerin PH'da görülen hücre ölümünde rol oynamakta olduklarını da göstermektedir.

Hücre ve hayvan modelleri kullanılarak yürütülen araştırmalar apoptotik proteinlerin PH'da görülen hücre ölümünde rol oynamakta olduğunu göstermektedir (Przedborski, 2005).

Huntington Hastalığı

Huntington Hastalığı (HH) otozomal dominant genetik geçiş özelliği gösteren, motor, psikiyatrik ve bilişsel içerikli klinik bulgularla karakterize ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır. İlk kez 1872 yılında George Sumner Huntington tarafından tanımlanmıştır. İlerleyen yıllarda hastalık ile ilgili ayrıntılı çalışmalar yapılmış ve 1993'de kromozom 4'ün kısa bacağına HH ile ilgili *huntingtin* geni (Htt) bulunmuştur. *huntingtin* geni huntington proteinini kodlamaktadır. Bu genin birinci ekzonundaki, N-terminalindeki poliglutamini kodlayan CAG tekrarlarının sayısının artmasıyla normalden fazla CAG (sitozin-adenin-guanin) trinükleotid tekrarı meydana gelmektedir. ≥ 36 'dan uzun tekrarlar hastalığın erken yaşlarda başlamasına sebep olur (Sava, 2003)

Mutant Htt geninin over-ekspresyonu sonucunda oluşan sitotoksitenin, pek çok hücre hattında hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, Htt fragmentlerinin apoptozu indüklediği, nüklear değişikliklere ve kaspaz-3 aktivasyonuna neden olduğu bulunmuştur (Saudou, 1998; Sawa, 2001).

Amiyotrofik Lateral Skleroz

Amiyotrofik Lateral Skleroz (ALS) merkezi sinir sisteminde, omurilik ve beyin sapında motor nöronların dejenerasyonuna bağlı olarak ortaya çıkan, ilerleyici ve ölümcül bir hastalıktır.

ALS'nin ilk klinik ve patolojik tanımlanması Jean Martin Charcot tarafından 1874 yılında yapılmış, 25 olguyu içeren çalışmasında, göz bulguları ve mesane disfonksiyonu olmaksızın, progresif asimetrik güçsüzlük, kaslarda erime, derin tendon reflekslerinde artma ve patolojik refleksler gibi klinik bulgularla birlikte otopsi verilerine de dayanarak ALS'yi tanımlamıştır.

Hastalığın % 90-95'ı sporadik, % 3-10'u ailesel olarak ortaya çıkar. Ailesel ALS ile ilişkilendirilmiş altı gen ve sekiz farklı lokus bulunmuştur (Coppede F, 2006). Ailesel olguların % 20'sinde, sporadik olguların ise % 1-5'inde 21 kromozom üzerindeki Cu-Zn, Superoksid Dismutaz (SOD1) enziminin kodlandığı gen üzerinde mutasyon bulunmaktadır (Andersen PM, 2006). Bu gendeki bir mutasyonun ise, motor nöron patolojisine neden olduğu ve hücrelerin oksidatif strese karşı daha hassas olmalarına yol açtığı gösterilmiştir (Bocci, 2011). Hastalığın ortaya çıkmasında genetik etmenlerin, glutamat eksitotoksitesisi, viral enfeksiyonlar, otoimmünite, kurşun, civa ve alüminyum gibi ağır metal zehirlenmelerinin rol oynadığı düşünülmektedir.

Prion Hastalığı

Prion hastalığı tek bir hastalık olmayıp, prion adı verilen bulaşıcı bir ajanın neden olduğu bir grup ölümcül nörodejeneratif hastalıktan oluşur. İnsanlarda görülen prion hastalıkları; Creutzfeldt-Jakob Hastalığı (CJH), Gerstmann-Straussler-Scheinker Sendromu (GSS), Fatal Familial İnsomnia (FFI) ve Kuru' dur (Ozen, 2007). Olguların çoğu sporadik iken, %10'u ailesel geçiş gösterir, prion protein geninde doğal olarak ortaya çıkan bir polimorfizmin, ailesel, sporadik ve kazanılmış prion hastalıklarının fenotipinin ortaya çıkmasındaki etkisi büyüktür. Hastalığın morfolojik bulguları, mikrogliyal aktivasyonu takiben nöronal kaybın oluşması, spongiform değişiklik, gliosis, sinapsların kaybı ve prion proteinlerinin birikimi şeklindedir (Kretschmar, 1999).

2.1.2. Nörodejeneratif Hastalıklarda Tedavi

Nörodejeneratif hastalıkların çoğuna, oksidatif stres ve eksitotoksik nöronal hasar ve nöroinflamasyon, mitokondriyal disfonksiyon ve protein birikimi eşlik eder. Hastalıkların başlaması ve ilerlemesinin önlenmesi amacıyla sinyal yollarıyla ilişkili enzim inhibitörleri, anti-inflamatuar ilaçlar, antioksidanlar gibi çeşitli ilaçlar denenmektedir. Ayrıca

hastalığın patogeneğinde var olan protein birikiminin, nöroprotektif ve immun modölatörlerin kombine kullanımıyla temizlenmesi de tedavi hedeflerinden biridir.

Nörodejeneratif hastalıklarda var olan belirtileri hafifletmek amacıyla, kolinerjik ve dopaminerjik ilaçlar, nörotrofinler, enzim inhibitörleri, antibiyotikler (memantin), statinler, PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptors) inhibitörleri, non-steroid antienflamatuar ilaçlar ve anti-apoptotik ajanlar araştırılmış, bazılarının yararlı etkileri olduğu gösterilmiştir (Farooqui A, 2010).

2.2. Nöroproteksiyon

Tanım olarak nöroproteksiyon, beklenen veya oluşmuş nöronal hasarın, kimyasal, biyolojik bir ajan kullanılarak önlenmesi ve geri çevrilmesidir. Nöron korumadaki amaç beyinde oluşan zarar verici etkileri en kısa sürede engelleyerek nöronların en az hasara uğramasını sağlamaktır. Bu amaçla günümüzde çok çeşitli ajanlar araştırılmakta ve daha birçoğu üzerinde çalışılmaktadır.

2.2.1. Nöroprotektif Ajanlar

Günümüzde nöron hasarını tamamen engelleyecek etkisi kanıtlanmış bir ajan gösterilememiş olsa da nöron koruyucu olarak pek çok ajan denenmiştir. Araştırılan ajanların bazıları Tablo 1’de verilmiştir (Jain KK, 2011).

Tablo 1: Nöroprotektif Ajanlar

Nöroprotektif Ajan Kategorisi	Örnek
Anti apoptotik ajanlar	Aktive protein C Kalpain inhibitörleri Kaspaz inhibitörleri Sikloheksimid DNA'ya bağlanan ilaçlar (mithtamycin A, chromomycin A3) Dopamin, noradrenalin ve yumurtalık steroid reseptörlerinin agonistleri GAPDH ligandları JNK inhibitörleri L- Asetilsistein p53 inhibitörleri PARP (poli-(ADP-ribozil) polimeraz) inhibitörleri
Anti-inflamatuvar ajanlar	COX-2 İnhibitörleri İnterlökin-1 antagonistleri Asetilsalisilik Asit Proteozom inhibitör (MLN519) Metilprednisolone
Antioksidantlar	a-Tocopherol (vitamin E) Ascorbic acid (vitamin C) Beta karoten Kanabidiol
Sitokinler	Eritropoetin Darbepoetin alfa Granulosit-koloni-stimüle edici faktör Monosit kemoatraktan protein-1
Trofik Faktörler	Brain derived neurotrophic factor (BDNF) Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF) İnsülin-Like Büyüme Faktörü Nörotrofin 4/5 Sinir Büyüme Faktörü (NGF) Anjiyogenez Büyüme Faktörü
Psikotropikler	Pramipexole Haloperidol Fluphenazine Chlorpromazine Melotanin Thioridazine Olanzapine Clozapine Lityum Valproik Asit Carbamazepin Diazepam

Psikotropik ilaçlar, ilk olarak merkezi sinir sistemi üzerine etki eden ve psikiyatrik bozuklukları tedavi amacıyla kullanılan kimyasal bileşenlerdir. Bu ilaçlar; duygudurum dengeleyiciler , antidepresanlar ve antipsikotik ilaçlar olarak gruplandırılabilir.

2.3. Duygudurum Bozuklukları

Duygudurum bozuklukları (DDB) hasta yaşamını kısıtlayan, psikososyal işlevselliği ve kişilerarası ilişkileri bozan, ve oldukça yaygın görülen önemli bir ruhsal bozukluk grubudur (Abood , 2002).

Mental Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabına (DSM-IV-TR, 2001) göre duygudurum bozuklukları üç alt gruba ayrılmıştır:

1. Depresif Bozukluklar
2. Bipolar Bozukluklar
3. Diğer Duygudurum Bozuklukları

Duygudurum bozuklukları, klasik nörodejeneratif bozukluk tanımına tam olarak uymasa da, postmortem çalışmalar sonucunda bildirilen nöronal ve glial yapıdaki bölgeye özgü ve hücre tipine spesifik değişiklikler, bu hastalıkların bozulmuş hücresel nöroplastisite ve esneklik (resilience) ile ilişkili olduğunu ileri sürmektedir (Manji, 2000). Ayrıca, majör depresif bozukluk ve bipolar bozukluk tanısı almış hastaların çoğunda, volümetrik beyin görüntüleme çalışmaları sonucunda nöron ölümü ve atrofi gözlenmiş (Manji, 2000), her iki hasta grubunda da bağımsız çalışmalar neticesinde tutarlı biçimde anterior singulat korteks, dorsolateral prefrontal korteks ve orbitofrontal kortekste glial hücre azalması bildirilmiştir (Rajkowska, 2002).

Bipolar bozukluk; tekrarlayan yükselmiş (mani) ve depresif dönemler, göreceli olarak da iyilik (ötimi) dönemleri ile karakterize bir duygudurum bozukluğudur (Langan, 2009). Hastalığın ortaya çıkışında genetik, psikosoyal ve nörokimyasal etmenler söz konusudur.

Bipolar bozuklukta, hücresel enerji metabolizmasında bozulmalar olduğu ve bu bozulmaların mitokondri disfonksiyonu ile ilişkili olduğuna dair bulgular mevcuttur. Mitokondri sadece ATP sentezinde değil, Ca^{2+} homeostazisinde, apoptozda, beyin gelişiminde ve fonksiyonlarında iş görmektedir (Clay, 2011).

Duygudurum bozuklarındaki hücrel değişikliklerin ve mitokondriyal disfonksiyonun, mevcut psikofarmakolojik ajanlarla (antidepresanlar, duygudurum dengeleyiciler) geri döndürölüp döndürölemeyeceği, bu ilaçların mitokondriyal oksidatif stresi önlemesi, nörotrofik ve nöroprotektif etkilerinin bulunduğunun keşfedilmesiyle merak konusu olmuştur.

2.4. Nöroproteksiyonda Duygudurum Dengeleyici İlaçlar

Duygudurum dengeleyicileri, mani/hipomani, karma ya da depresyon dönemlerinin sağaltımında kullanılan, yaşam boyu yineleme riskini azaltarak bozulmuş olan işlevselliğin ve biyo-psiko-sosyal dengelerin korunmasını sağlayan ilaçlardır. Günümüzde bipolar bozukluğın sağaltımında kullanılmakta olan farklı gruplardan ilaçların hangilerinin duygudurum dengeleyici olarak nitelendirileceği henüz netleşmemiştir. Tarihsel açıdan lityum bu sıfatı alan ilk ilaç olmakla birlikte, yıllar içerisinde antikonvülsan ilaçlardan bazıları da (valproat, karbamazepin, lamotrijin) duygudurumu dengelemede etkili oldukları bulunmuştur (Tunca, 2010).

2.4.1. Lityum

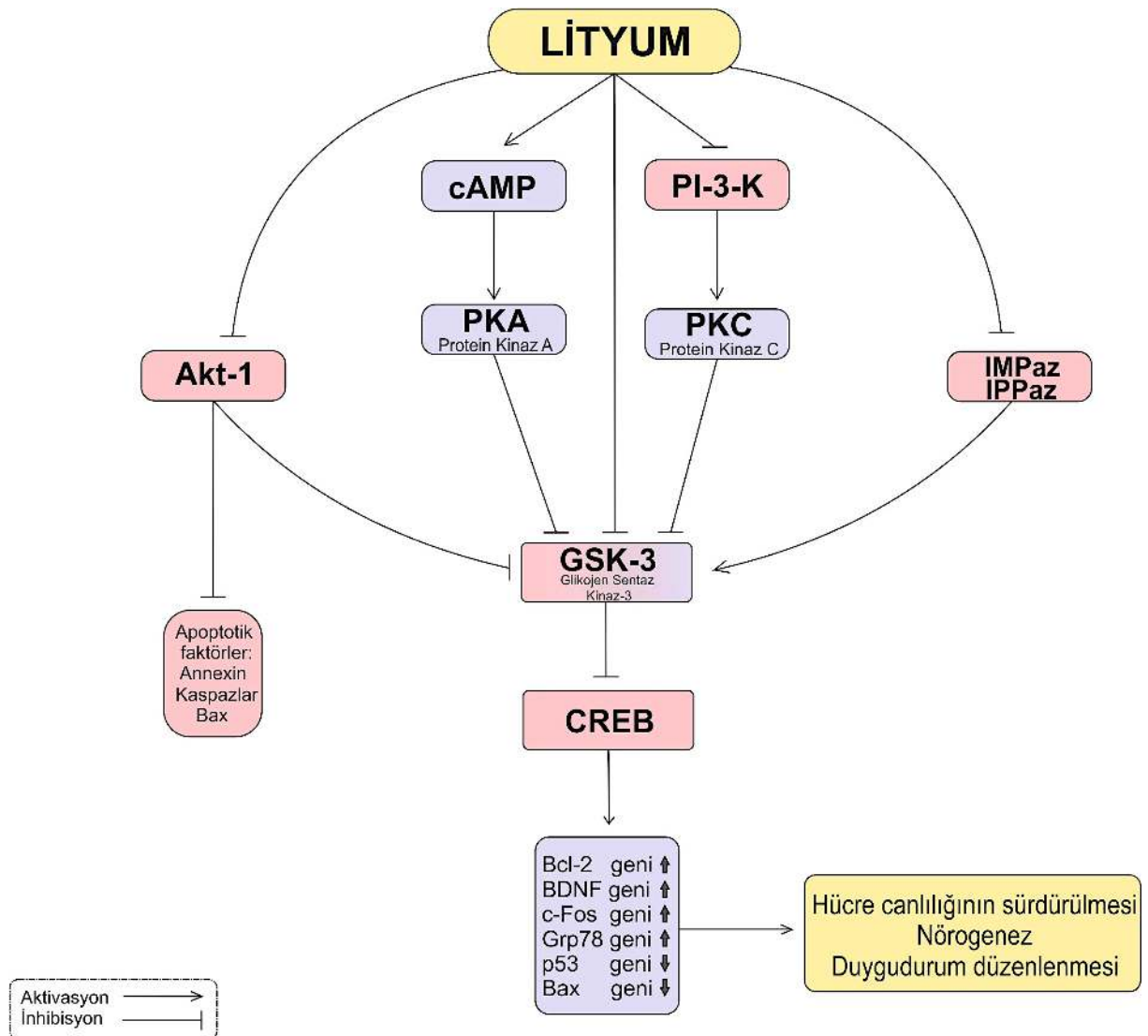
Lityum, bipolar bozukluğın akut fazında tedavi edici ve bipolar bozukluğın sürdürüm tedavisinde koruyucu olarak uzun süreli kullanımında FDA (Amerikan Federal İlaç ve Gıda Dairesi) onaylı ilk ilaçtır (Tunca, 2010). Bunun yanı sıra bipolar depresyon, siklotimi, antidepresanlarla yanıt alınamamış akut depresyonda etkiyi güçlendirme amacıyla, yineleyici depresyon profilaksisinde, şizoaffektif bozukluk gibi duygudurum bozukluklarında ve yineleyici özellikteki paranoid bozukluk, impulsif agresif davranış, alkol kötüye kullanımı /bağımlılığı, obsesif-kompulsif bozukluk, travma sonrası stres bozukluğu, kişilik bozuklukları ve dikkat eksikliği, hiperaktivite bozukluğu gibi diğer ruhsal hastalıklarda kullanılmaktadır (Jefferson, 2007).

Lityum periyodik cetvelin alkali metaller (IA) grubunda bulunan atom numarası 3, atom ağırlığı 7 olan bir elementtir. Günümüzde lityum, pillerde, ısı transfer protokollerinde, özel üretim cam ve seramiklerde, laparoskopide, havalandırma sistemlerinde, nükleer tepkimelerde ve daha bir çok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Lityum tıp alanında ise ilk kez, lityum karbonat haliyle 1859 yılında gut hastalığının tedavisinde kullanılmıştır (Şengöl C, 2004). 1949 yılında Avustralya'da John Cade'in, lityum karbonat ile 10 manik

hastanın 8'inde iyileşme gözlemlendiği makalesi Avustralya Tıp Dergisi'nde yayınlanmış, lityumun mani üzerine özgül bir etkisi olduğunu, bu nedenle de bu ruhsal hastalıkların tedavisinde kullanılabileceğini belirtmiştir (Cade, 1989).

2.4.1.1. Lityumun Genel ve Nöroprotektif Etki Mekanizmaları

Lityum tuzlarının etki düzeneği tam olarak bilinmemektedir. Ancak son 50 yılda yapılan çalışmalarda, hücre içi inositol, enzimler ve ikinci habercilere olan etkileri üzerine yoğunlaşmış, serotonin (5-HT), dopamin (DA), glutamat, gama-amino-bütirik asit (GABA)'e olan etkisi, nörotransmitter salınımı ve aksonal morfolojide değişiklik yaparak nöroplastisiteyi etkilemesi gibi birçok veri bulunmuştur (Kanai, 2004).



Şekil 1. Lityumun hücre içi etki mekanizmaları

2.4.1.2. Lityumun *in vitro* ve *in vivo* Nöroprotektif Etkisi

Lityum, psikiyatrik hastalıklardaki tedavi edici etkisinden başka pek çok nörodejeneratif hastalıkta kullanımı söz konusu olan bir maddedir. *In vivo* yapılan hayvan çalışmalarında Alzheimer, Huntington ve beyin iskemisi gibi pek çok nörodejeneratif hastalık hayvan modelinde (Tablo 2.) ve *in vitro* nörotoksisite modellerinde (Tablo 3.) Lityum'un nöron koruyucu etkisi gösterilmiştir.

Tablo 2: Lityum'un Nöroprotektif Etkisi İle İlgili *In Vivo* Çalışmalar

Model	Sonuç	Kaynak
Alzheimer (Transgenik fare modeli)	Nörofibriler yumaklar azalma, amiloid birikiminde azalma, inflamatuvar yanıtta azalma	Sudduth 2012; Leroy 2010; Zhang 2011; Toledo 2010; Caccamo 2007; Rockenstein 2007; Engel 2006; Nakashima 2005
Alzheimer (Erişkin yaş başlangıçlı Drosophila modeli)	Abeta birikimini azaltıyor	Sofola 2010
Huntington (quinolinic acid)	Apoptozu önleyerek ve nöroglial progenitor hücre proliferasyonunu sağlayarak etki gösteriyor.	Senatorov 2004; Wei H 2001
Huntington (3-NP)	Calpain/cdk5 yolağını etkileyerek	Crespo-Biel 2009
Huntington (Drosophila modeli)	Nöroprotektif	Sarkar 2008
ALS (SOD1 geninde G93A mutasyonu taşıyan fareler)	Apoptozu önüyor. 2 çalışma lityumu bu modelde etkisiz bulmuş.	Shin 2007; Fornai 2008; Feng 2008; Ferrucci 2010; Pizzasegola 2009; Gill 2009
Beyin kanaması	Hücre ölümünü azaltıyor, COX2 ekspresyonunu azaltıyor	Kang 2012
Beyin iskemisi	İskemik alanı azaltıyor, apoptozu ve AP-1 protein ekspresyonunu azaltıyor, Isı şok protein ekspresyonunu artırıyor, NMDA aktivitesini azaltıyor, Akt and CaMKII aktivitesini artırıyor, ERK1/2 aktivitesini artırıyor, p53 azaltıyor ve Bcl2 artırıyor	Nonaka 1998; Xu J 2003; Ren M 2003; Ma J 2004; Sasaki 2006; Yan XB 2007; Bian 2007
Yenidoğan beyin iskemisi	Apoptozu önüyor, inflamasyonu azaltıp, nöral öncü hücre çoğalmasını artırıyor	Li Q 2010; Li H 2011
Multiple sklerozis	İnflamatuvar yanıtları baskılıyor	De Sarno 2008
Etanol toksisitesi	Apoptozu önüyor, Akt, GSK3, AMPK fosforilasyonunu azaltıyor, ERK fosforilasyonunu artırıyor	Zhng J 2006; Saito 2010; Chakraborty 2008; Young 2008; Liu Y 2009
Parkinson (6-OHDA)	etkisiz	Yong Y 2011
Parkinson (MTPT)	Bcl2 artırıyor ve bax azaltıyor, dopamine azalışını önüyor, Trozin hidroksilaz aktivitesini artırıyor	Youdim MB 2004; Castro 2012; Arraf 2012
Parkinson (Paraquat +MANEB)	nöroprotektif	Kim YH 2011

Tablo 3: Lityum'un Nöroprotektif Etkisi İle İlgili *In Vitro* Çalışmalar

Hücre tipi	Toksik ajan	Lityum dozu	Mekanizma	Kaynak
PC 12	beta-amyloid peptide-(1-42)	2 mM LiCl ,7 gün	Bcl-2 ekspresyon artışı	Wei, 2000
Hipokampal slide kültürü	3-NP	0.5 or 1 mM, 4 gün	calpain/cdk5/p-MEF2 yolu inhibisyonu	Crespo-Biel 2009
PC12	L-DOPA	0-10mM, 24 saat	Apoptozu önleme	Koh SH 2008
Hipokampal slide kültürü	Oksijen-glikoz yokluğu	0.2-1.2 mM	HSP27'yi azaltma	Cimarosti 2001
PC12 SH-SY5Y	Staurosporine	10 mM	Apoptozu önleme	Bhat 2000
Serebellar granül nöron	Glutamat	3 mM, 7gün	Akt aktivitesini etkileme	Chalecka-Franaszek 1999
HT-22 nöronal hücre	glutamat	belirtilmemiş	GSK inhibisyonu ve (Lityum) hücrelerin direncini arttırma	Schäfer 2004
HT-22 nöronal hücre	H2O2	belirtilmemiş	GSK inhibisyonu (Lityum) hücrelerin direncini arttırma	Schäfer 2004
SH-SY5Y	H ₂ O ₂	2-4 mM, 7 gün	Apoptozu önleme,	Arraf 2012
N27 (Synuclein A53T mutant)	H ₂ O ₂	0.5- 4 mM	Belirtilmemiş	Kim YH 2011
Serebellar granül nöron	etanol	2 mM	Kaspaz 3 ve 9 aktivasyonunu baskılama	Zhang J 2006
SK-N-MC	etanol	20 mM, 30 dakika	Bax aktivasyonunu azaltma	Liu Y, 2009
SH-SY5Y	MPP Rotenone	5-20 mM	Kaspaz kesimini azaltma	King TD 2001
SH-SY5Y	Rotenone	10 mM, 24 saat	Otofaji yoluyla	Xiong 2011
PC12	MPP	10 mM, 24 saat	GSK3B aracılığı ile apoptozu önleme	Sun X 2010
SH-SY5Y	6-OHDA	20mM, 1 saat	Apoptozu önleme, Siklin D1'i azaltma	Chen 2004

2.4.2 Valproik Asit

Valproik asit, epilepsi ve bipolar bozukluk tedavisinde yaygın olarak kullanılan antikonvülsan bir ajandır. Akut mani sağaltımında FDA ve T.C. Sağlık Bakanlığı, maninin önlenmesinde T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından onaylanmış, antikonvülzan bir duygudurum dengeleyicidir. Sekiz karbon, dallanmış zincirli bir karboksilik asit olan valproat ilk kez Amerikalı kimyacı Burton tarafından 1881’de organik bir çözücü olarak sentezlenmiş, antikonvülzan etkisi 1962’de Meunier ve arkadaşları tarafından rastlantısal olarak bulunmuştur. Bipolar bozukluktaki etkisi ilk kez 1966 yılında açık uçlu bir çalışma ile 141 hasta üzerinde gösterilmiştir (Bowden, 2003).

2.4.2.1. Valproik Asidin Genel ve Nöroprotektif Etki Mekanizmaları

Valproik asidin etki mekanizması hakkında kesin bilgiler olmamakla beraber, GABA/glutamat sistemi, ERK yolağı , glikojen sentaz kinaz-3 ve Wnt/ β katenin yolağı, fosfoinositid döngüsü ve fosfokinaz C ailesi üzerine etkileri ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır.

- Valproik Asidin GABA/glutamat sistemi üzerine etkisi: Hayvan modellerinde VPA ve lityumun, limbik bölgede GABA β reseptörlerinin artışına yol açtığı gösterilmiştir. VPA, glutamaterjik nörotransmisyonu yavaşlatır, N-metil-D-aspartat (NMDA) akımını ve aspartat salınımını azaltır. Ek olarak GABA yıkımını azaltarak GABA salınımını arttırmaktadır (Ketter, 2003).

- Valproik Asidin Hücre dışı sinyal ile düzenlenen kinaz (ERK) yolağı üzerine etkisi: ERK yolağı memeli beyinde nörogenez, nöral sağkalım ve sinaptik plastisiteyi artırıcı özellik gösterir. Valproik asidin klinik olarak anlamlı serum düzeylerinde, ERK yolağını aktive ettiği gösterilmiştir (Rosenberg, 2007).

- Valproik Asidin Fosfoinositid döngüsü ve Fosfokinaz C ailesi üzerine etkisi: Valproik asit beyinde miyo-inositol-1 fosfat sentaz aktivitesini baskılayarak miyo-inositol düzeylerinde azalmaya neden olmaktadır. Ayrıca valproik asit Protein Kinaz C (PKC)’nin protein içeriğinde ve aktivitesinde azalmaya yol açar (Rosenberg, 2007).

- Valproik Asidin Glikojen Sentaz Kinaz-3 (GSK-3ve Wnt/ β Katenin yolağı üzerine etkisi: Valproik asit histon deasetilazı baskılar ve bu yolla GSK-3’ün fosforilasyonla indüklenen inaktivasyonunu gerçekleştirir (Kanai, 2004).

Valproik asidin GSK-3, ERK ve PKC üzerine olan etkilerinin, hücre içi sinyal sisteminin düzenlenmesi ve nöron koruyucu etkisini sağlayan unsurlar olduğu düşünülmektedir (Bielecka, 2008).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi:

Çalışma deneysel (*in vitro*) bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı:

Çalışmamız Ocak 2012 ile Haziran 2012 tarihleri arasında 9 Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğrenme Kaynakları Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda (ARLAB) gerçekleştirilmiştir.

3.3. Çalışma Materyali:

Araştırmada SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattı kullanılmıştır.

3.4. Çalışmanın Değişkenleri

Çalışmanın bağımsız değişkeni: Lityum, Valproik Asit ve Paraquat uygulaması

Çalışmanın bağımlı değişkeni: Hücresel canlılık oranları

3.5. Veri toplama Araçları:

3.5.1. Hücre Kültürü

Bu çalışmada 1970'de Biedler ve arkadaşları tarafından oluşturulan SK-N-SH hattından köken alan SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattı kullanılmıştır.

Hücre kültürü için 10% fetal sığır serumu (Fetal Bovine Serum; FBS) (Biochrom AG, Almanya), 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin ile desteklenen DMEM:F/12 kültür ortamı kullanıldı. Hücreler 75 cm²'lik kültür flasklarına ekildi ve haftada 2 kez % 0.05 konsantrasyonda Tripsin/EDTA (Biochrom AG, Almanya) ile pasajlanarak çoğaltıldıktan sonra, deney için uygun kültür kaplarına ekildi. Hücre kültürü işlemleri Laminar akımlı kabinet (Heraeus, Almanya) içinde gerçekleştirildi ve hücreler %5 CO₂ içeren inkübatörde (Thermo Scientific, ABD) 37°C'de kültüre edildi.

3.5.2. *In vitro* deneyler

3.5.2.1. Laktat Dehidrogenaz Testi deneyleri için *in vitro* deney

Hücreler pasajlanmadan önce inverted ışık mikroskopunda (Olympus, Japonya) gözlemlendi ve pasajlama işlemine başlandı. Öncelikle hücrelerin içinde bulunduğu ortam pipetle uzaklaştırıldı ve flaska 10 ml Fosfat tamponlu fizyolojik solüsyon (Phosphate buffered saline; PBS) eklendi. PBS ile hücreler yıkandı ve PBS pipetle uzaklaştırıldı. Daha sonra hücrelere 5 ml Tripsin/EDTA (%0,05/%0,02) solüsyonu eklendi ve hücreler inkübatörde 2 dk bekletilerek hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlandı. Flasklara 5 ml hacimde kültür ortamı eklenerek flask yıkandı ve flask içeriği santrifüj tüpüne alındı. Hücreler 1500 rpm hızda 5 dk santrifüj edildi (Hettich, Almanya) ve hücrelerin çökmesi sağlandı. Çöken hücrelerin üzerindeki süpernatant atıldı ve hücreler 1 ml ortam ile süspanse edildi. Oluşan süspansiyondaki hücre yoğunluğu Thoma lamı (Marienfeld, Almanya) kullanılarak sayıldı ve kuyu başına 2×10^4 /200 µl olacak şekilde ELISA plağına ekim yapıldı. Son olarak, ekilen hücrelerin üzerine 200 µl ortam eklendi ve hücreler inkübatöre kaldırıldı.

İkinci gün kültür ortamları, serum deprivasyonu yaratmak amacı ile %1 FBS içeren DMEM:F12) ile değiştirildi. Kontrol grubu kuyularına, herhangi bir madde eklenmemiş 200µl %1 FBS içeren DMEM:F12, koruyuculuk incelenen gruplara ise lityum klorür (1-10 mM) ve Valproik Asit (100-500 µM) içeren 200 µl/kuyu %1 FBS içeren DMEM:F12 eklendi ve inkübatörde 24-48 saat süre ile bekletildi.

İnkübasyon süresi sonunda hücrelerin ortamları (kontrol hariç), son konsantrasyonu 500 µg/ml olacak şekilde paraquat içeren %1 FBS içeren DMEM:F12 ile değiştirildi 24 saat süre ile inkübatörde bekletildi.

Daha sonra örnekler hücre ölümü açısından değerlendirildi.

3.5.2.2. Cell Death ELISA deneyleri için *in vitro* deney

Hücreler 3.5.2.1. de belirtilen şekilde, kuyu başına 2×10^4 /200 µl olacak şekilde ELISA plağına ekildi ve inkübatöre kaldırıldı.

İkinci gün kontrol grubu kuyularına, herhangi bir madde eklenmemiş 200 µl %1 FBS içeren DMEM:F12, apoptozun incelendiği gruplara ise 500 µM paraquat %1 FBS'li DMEM:F12 eklendi.

Lityumun apoptoza olan etkisinin incelendiği deneylerde ise hücreler; 2 mM ve 5mM LiCl ile 24 saat preinkübe edildikten sonra, ortamları son konsantrasyonu 500 µM olacak şekilde paraquat içeren %1 FBS'li DMEM:F12 ile değiştirildi ve inkübatörde 48 saat süre ile inkübe edildi.

Daha sonra hücreler apoptoz açısından değerlendirildi.

3.5.2.3. PCR deneyleri için *in vitro* deney

SH-SY5Y hücreleri pasajlama işleminden sonra sayıldı ve 75 cm²'lik flasklara, flask başına 3x10⁶ hücre olacak şekilde ekildi ve inkübatöre kaldırıldı. Hücre yoğunluğu %70-80'e ulaştığında deney aşamasına geçildi.

Paraquat dozları için zamana bağlı mRNA ekspresyon değişiminin incelendiği deney için; kontrol grubu; deney ortamı kullanılacak olan %1 FBS içeren DMEM:F12 ile deney grupları ise 500 ve 1000 µM Paraquat dozlarında hazırlanan ortam değiştirildi ve %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırıldı. Deney süreleri olarak belirlenen 0., 6., 12., 18., ve 24. saatlerin sonunda hücreler toplandı ve RNA izolasyonu yapıldı.

Lityumun Paraquat ile ekspresyonu değişen mRNA'lar üzerine olan etkisinin incelendiği deney için; kontrol grubu; deney ortamı kullanılacak olan %1 FBS içeren DMEM:F12 ile, deney grupları ise 2 mM, 5mM LiCl, içeren %1 FBS'li DMEM:F12 ile değiştirildi. 24 saatlik preinkübasyon sonrası ortamlara 500 µM Paraquat eklenerek 12 saat süre ile inkübatöre kaldırıldı. Süre bitiminde hücreler toplandı ve RNA izolasyonu yapıldı.

3.5.3. Laktat Dehidrogenaz Testi

LDH yöntemi; ölü hücrelerden açığa çıkan LDH miktarının kolorimetrik saptanması esasına dayalıdır. Laktat Dehidrogenaz, tüm hücrelerde bulunan sitoplazmik bir enzimdir. Plazma membranının hasara uğradığı durumlarda, hızla süpernatant salınmaktadır. Salınan bu LDH miktarının ölçümünde Cytotoxicity Detection Kit'i (Roche Applied Science) kullanıldı.

LDH testinde kontrol olarak toksik ve koruyucu ajanların eklenmediği hücrelerin bulunduğu kuyular, maksimal LDH salınımının belirlenmesi için de kit içinden çıkan lizis tamponundan (5µl/kuyucuk) eklenerek ve 1 saat lizise uğratılan hücrelerin bulunduğu kuyular kullanıldı. Daha sonra tüm kuyulardan 50µl süpernatant örneği alınarak 96'lık ELISA plağına aktarıldı ve protokole uygun olarak taze hazırlanmış LDH reaksiyon karışımı eklenerek karanlık ortamda 20-30 dk bekletilerek renk değişimi gözlemlendi. Daha sonra ELISA

plak okuyucusuna (Biotek, Amerika) yerleştirilen plaktan 490 nm ve referans olarak da 600 nm dalga boyunda okutma yapıldı. Her bir kuyucuğa ait absorbans değerinden ortalama kör değeri çıkartılarak net absorbans değerleri elde edildi. Kör değeri sadece kültür ortam içeren kuyucukların absorbans değerlerinin ortalamasıdır. Her bir kültür koşulu için yüzde hücre ölümü aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

$$\% \text{ Sitotoksosite} = \frac{\text{Bulunan absorbans değeri} - \text{kontrol absorbans değeri}}{\text{Maksimal absorbans değeri} - \text{kontrol abrosbans değeri}} \times 100$$

3.5.4. Cell Death ELISA Yöntemi ile Apoptotik Hücre Analizi

Apoptozda görülen olaylardan ilki, sitoplazma içine nükleozomların salınımını takip eden DNA fragmentasyonudur. ELISA yöntemi, apoptotik hücre lizatlarındaki sitoplazmik fraksiyonlarda bulunan mono ve oligonükleozomları, DNA ve histonları tanıyan monoklonal antikorlar aracılığıyla ölçülmesine dayanmaktadır. Bu çalışmada da apoptoz, Cell Death Detection ELISA Plus Kit (Roche Applied Science, Almanya) kullanılarak üretici firma önerilerine uygun olarak değerlendirildi.

Bu amaçla, deney süresi bitiminde kontrol grubu ve deney gruplarına ait kuyulara lizis solüsyonu eklenerek 30 dakika bekletildi. Tüm gruplara ait hücre lizatları santifüjlendi (200xg de 10 dakika), elde edilen sitoplazmik fraksiyondan 20µl alınarak, streptavidin kaplanmış mikropate'e aktarıldı, üzerine peroksidaz-bağlı anti-DNA ve biyotin-işaretli anti-histon içeren karışımdan 80µl eklenerek 2 saat oda sıcaklığında bekletildi. Süre bitiminde yıkama solüsyonu ile kuyular yıkandı ve ABTS (2.29-Azino-di-[3-ethylbenzth iazoline sulfonate] diammonium salt) solüsyonu eklenerek 405 nm ve referans olarak da 490 nm dalga boyunda okutma yapıldı. Apoptotik hücre ölümü kitin önerdiği şekilde aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\% \text{ Enrichment Faktör} = \frac{\text{Örneğin absorbans değeri}}{\text{Kontrolün absorbans değeri}}$$

3.5.5. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

RNA izolasyonu öncesinde paraquat ile inkübasyonu biten hücreler hücre kazıyıcı (Greiner, Almanya) ile kazındı ve 15 ml'lik tüpte toplandı. Toplanan hücreler 1500 rpm'de

5dk santifüj edilerek çöktürüldü. Ortam uzaklaştırıldıktan sonra RNA izolasyon kiti (Nucleospin, Almanya) protokolüne uygun olarak total RNA izolasyonu yapıldı.

Bunun için hücre pelletinin üzerine izolasyon kitindeki 350 µl RA1 buffer (lizis tamponu) eklenerek hücreler lizise uğratıldı. Daha sonra 3,5 µl β – merkaptetanol eklenerek vortekslendi. Ardından örnekler 350 µl %70’lik etanol eklendi ve örnekler tekrar vortekslendi. Tüm karışım; kitin içinden çıkan kolonlara aktarıldı ve 8000g ‘de 30 saniye, oda sıcaklığında santrifüj edildi. Süpernatant atılarak kolona izolasyon kitinden çıkan MDB (Membrane Dissalting Buffer) solüsyonundan 350 µl eklendi ve 11000g’de 1 dakika santrifüj edildi. Diğer yanda steril bir ependorfa DNAaz Reaksiyon Karışımı (90 µl DNA reaction buffer ve 10 µl DNAaz) hazırlanarak karışımdan alınan 95 µl membranın ortasına eklendi ve oda sıcaklığında 15 dk bekletildi. Süre bitiminde izolasyon kitindeki RA2 tamponundan 200 µl örneğe eklendi ve 8000g 30 saniye santrifüj edildi. Süpernatant atılarak; kolon yeni bir toplama tüpüne kondu ve izolasyon kitindeki RA3 tamponundan 600 µl eklendi. 8000g de 30 saniye santrifüj edilerek süpernatant atıldı ve işlem tekrarlandı. Son olarak kolon temiz bir toplama tüpüne aktarıldı ve kitin içinden çıkan RNaz-free sudan 30 µl eklendi. Tüp 10000 rpm’de santrifüj edilerek RNA’lar elde edildi. Elde edilen RNA’ların konsantrasyon ve kalite ölçümleri spektrofotometre (Agilent, ABD) ile yapıldı. Kalite kontrolü A260/A280 oranına göre yapıldı. Oranın 1,8 ile 2,0 arasında olan örnekler kaliteli kabul edildi.

Kaliteli olarak kabul edilen RNA moleküllerinden, RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fermentas, ABD) kullanılarak, cDNA sentezi gerçekleştirildi. Bunun için tüm RNA molekülleri 5µg/11 µl olacak şekilde sulandırıldı. Üzerine 1 µl rrandom heksamer primer eklendi. Nükleaz-free ve steril bir PCR tüpüne her bir örnek için Tablo 4’teki malzemelerden sırasıyla eklendi.

Tablo 4: cDNA sentezi için reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
5X Reaksiyon Tamponu	4 µl
RiboLock RNaz İntibitörü	1 µl
10mM dNTP Mix	2 µl
RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/=1)	1 µl
RNA (5µg)	12µl
Toplam Hacim=	20 µl

Hazırlanan reaksiyon karışımı, PCR cihazında (BioRad, ABD) 25°C’de 5 dakika, 42°C’de 2 saat, 70°C’de 5 dakika şeklinde yazılmış bir programda inkübe edildi. Reaksiyon sonrası tüpe 20µl RNaz-free H₂O eklendi ve -20°C’de qPCR analizine kadar saklandı.

3.5.6. PCR

qPCR analizinde LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I Kiti (Roche, ABD) kullanıldı. Prosedüre uygun olarak master mix hazırlandı. Bu amaçla 14 µl enzim, reaksiyon karışımının içine eklenerek pipetlendi. Daha sonra nükleaz-free ve steril bir PCR tüpüne her bir örnek için Tablo 5’teki malzemelerden sırasıyla eklendi.

Tablo 5. qPCR için reaksiyon bileşenleri:

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
Nükleaz-free H ₂ O	10,5 µl
Reverse Primer	0,25 µl
Forward Primer	0,25 µl
Master Mix	4 µl
cDNA	5 µl
Toplam Hacim=	14 µl

Analiz Roche Lightcycler 1.5 cihazında gerçekleştirildi. Normalizasyon amacıyla housekeeping gen olarak GAPDH kullanıldı. qPCR analizinde 95°C 10 dk, (95°C’de 15 sn, 55°C’de 30 sn ve 72°C’de 30 sn) 45 siklus programı kullanıldı. Analizi yapılacak mRNA’ların primer dizileri tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 6: Primer dizileri:

PRİMER	DİZİSİ
G3PDH	Forward: 5’- ACC ACAGTCCATGCCATCAC -3’ Reverse: 5’- TCCACCACCCTGTTGCTGTA -3’
Bax	Forward: 5’- TGGTTGCCCTTTTCTACTTTG -3’ Reverse: 5’- GAAGTAGGAAAGGAGGCCATC -3’
Bcl-2	Forward: 5’- CTGGTGGACAACATCGCTCTG -3’ Reverse: 5’- GGTCTGCTGACCTCACTTGCTG -3’
Bcl-xl	Forward: 5’- AGGCTGGCGATGAGTTTGAA -3’ Reverse: 5’- CGGCTCTCGGCTGCTGCATT -3’

Erime eğrisi analiziyle de ürünlerin kalite kontrolü gerçekleştirildi. Her bir reaksiyondan elde edilen Ct değerleri $\Delta\Delta Ct$ yöntemine göre analiz edildi. Gruplar arası istatistiksel analiz için ΔCt değerleri arasında t-testi yapıldı. Ekspresyon değişimini belirlemek amacıyla da $\Delta Ct_{(deney)} - \Delta Ct_{(kontrol)}$ formülüne göre $\Delta\Delta Ct$ değerleri hesaplandı ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüyle de ekspresyon değişim miktarları hesaplandı.

3.6. Araştırma Planı ve Takvimi

Projelendirme	Aralık 2011 - Ocak 2012
LDH Deneyleri	Şubat-Nisan 2012
Apoptoz Analizleri	Nisan-Mayıs 2012
qPCR Analizleri	Mayıs-Haziran 2012
Tez Yazımı	Haziran-Temmuz 2012

3.7. İstatistiksel Değerlendirme

Araştırma sonuçlarının istatistik analizi SPSS 19.0 istatistik programı kullanılarak yapıldı. Gruplara ait ortalama hücre ölümü değerleri Mann Whitney U kullanılarak karşılaştırdı. $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma biçiminde verildi.

3.8. Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırmamızda kullanılan hücre hattı insan kökenli nöronal hücre hattıdır. Nöroblast özelliği taşımamaktadır. Bu nedenle diferansiye nöron özelliklerinden farklılık gösterebilir. Primer kültürün teknik güçlüğünden ve çok az ve saf olmayan hücre elde edilmesinden dolayı bu hücre hattı tercih edilmiştir.

Ayrıca *in vitro* olarak elde edilen sonuçların, *in vivo* olarak da doğrulanması gerekmektedir. Her ne kadar deney süresince kullanılan tüm dozlar terapötik dozlardan seçilmiş olsa da, *in vitro* veriler, *in vivo* verilerden farklılık gösterebilmektedir.

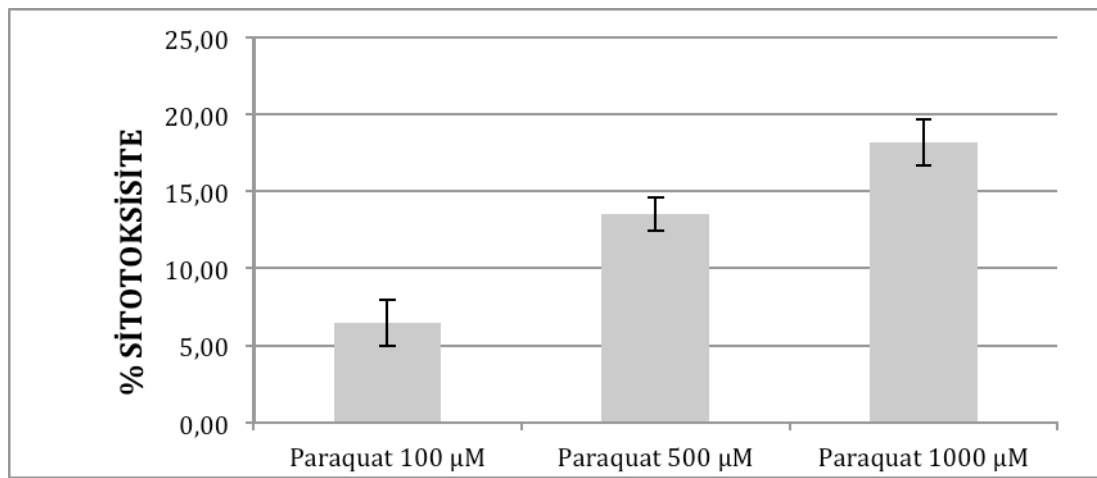
3.9. Etik Kurul Onayı

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu 22.09.2011 tarih ve 2011/31-08 no.lu kararında; 327-GOA protokol numaralı çalışmamızın etik açıdan sakıncalı olmadığına karar vermiştir.

4. BULGULAR

4.1. Paraquat Uygulanması ile Toksisite Doz Eğrisinin LDH Yöntemiyle Belirlenmesi

Uygun toksik dozun belirlenmesi amacıyla değişen konsantrasyonlarda (100µM, 500µM, 1000µM) 24 saat paraquat ile inkübe edilen SH-SY5Y hücrelerinde, LDH yöntemiyle belirlenen hücre ölüm oranları Şekil 2’de verildi.

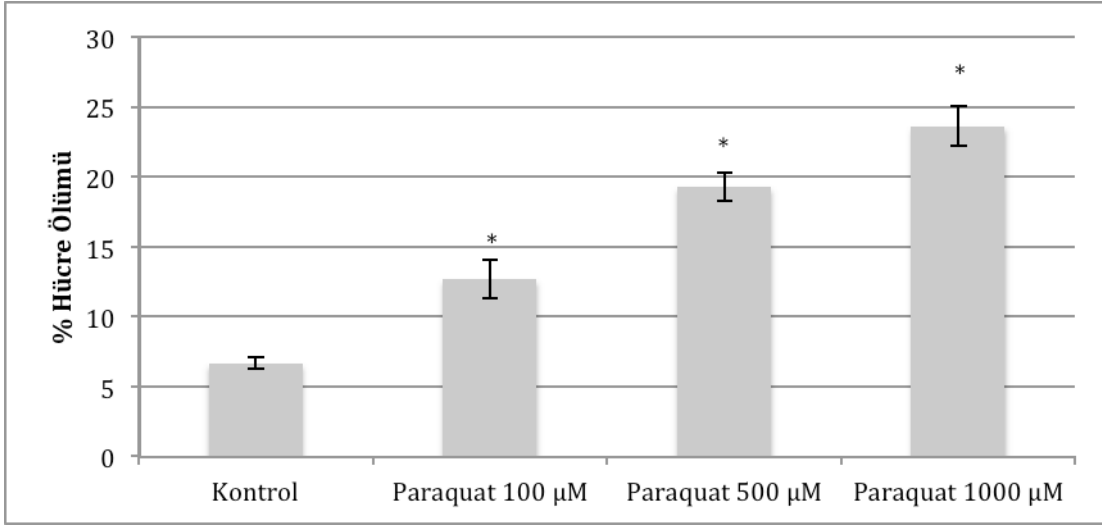


Şekil 2: Paraquat nörotoksitesi: SH-SY5Y hücreleri 24 saat, 100 µM, 500 µM ve 1000 µM Paraquat ile enkübe edildi. Hücre ölümü LDH testi ile değerlendirildi. Paraquat’ın doza bağımlı toksisite yarattığı gözlemlendi.

Bu deneyde kontrol grubu ile paraquat grubunu karşılaştırmak için LDH kitinin önerdiği toksisite değer hesaplaması ile birlikte ayrı bir hesap yapıldı. Bu hesapta, her bir grubun absorbans değerleri maksimal kuyularının absorbans değerlerine oranlandı. Sonuçlar Tablo 7 ve Şekil 3’te verildi.

Tablo 7: Paraquat Sitotoksitesi

Gruplar	Sitotoksosite (ortalama ± SD)
Kontrol	6.68±0.43
Paraquat 100 µM	12.69±1.39
Paraquat 500 µM	19.31±1.0
Paraquat 1000 µM	23.63±1.40

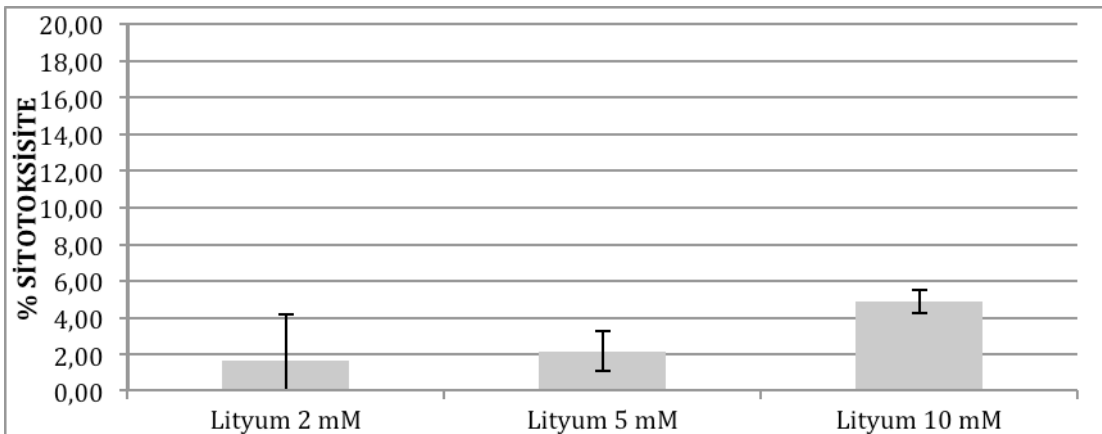


Şekil 3. Maksimal kuyularına oranla göre hücre ölümü: LDH testi uygulanan örneklerin absorbens değeri, kontrolün absorbens değeriyle oranlandı. Paraquat tüm dozlarda kontrole göre anlamlı hücre ölümü oluşturduğu gözlemlendi (*:p=0.009).

4.2. Lityumun SH-SY5Y hücrelerine etkisinin LDH Yöntemiyle Belirlenmesi

Lityumun herhangi bir toksik etkisinin bulunup bulunmadığının belirlenmesi amacıyla 1mM, 5mM ve 10 mM Lityum ile 24 saat preinkübe edilen hücrelerden elde edilen bulgular Şekil 4'te verildi.

Sadece lityum uygulamasının, SH-SY5Y hücreleri üzerinde herhangi bir toksik etkisi olmadığı görüldü.



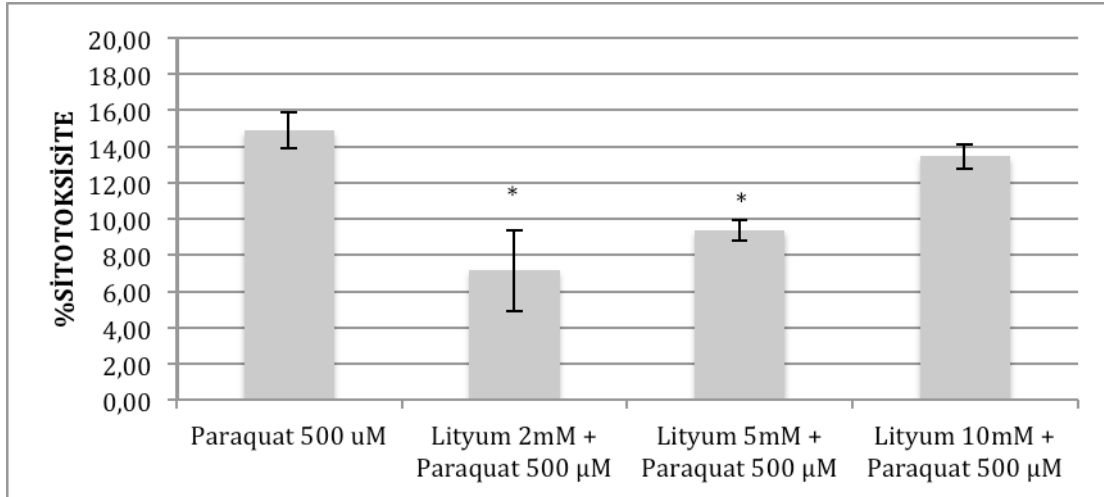
Şekil 4. Lityum SİTOTOKSİSİTESİ: 24 saat değişik dozlarda Lityum ile inkübe edilen hücrelerde oluşan sitotoksitesite LDH testi ile değerlendirilmiş, anlamlı bir ölüm ile karşılaşılma (Lityum 2mM için: p=0.09, Lityum 5 mM için p=0.085, Lityum 10mM için p=0.056).

4.3. Lityumun Paraquat Toksisitesine Karşı Etkisinin LDH Yöntemiyle Belirlenmesi

Hücreler, 1mM, 5mM ve 10 mM lityum ile 24 saat preinkübe edildikten sonra, kültür ortamına 500 µM paraquat eklendi. 24 saat sonunda elde edilen sitotoksosite bulguları Tablo 8 ve Şekil 5’te verildi. Lityumun hücre ölümünü 2 mM ve 5 mM dozlarında anlamlı bir şekilde azalttığı görülürken, 10 mM dozunda herhangi bir koruyuculuk gözlenmedi.

Tablo 8. Lityum’un paraquat sitotoksitesine etkisi:

Gruplar	Sitotoksosite (ortalama ± SD)
Paraquat 500 µM	14.88±1.01
Lityum 2mM + Paraquat 500 µM	7.17±2.23
Lityum 5mM + Paraquat 500 µM	9.39±0.50
Lityum 10mM + Paraquat 500 µM	13.46±0.67

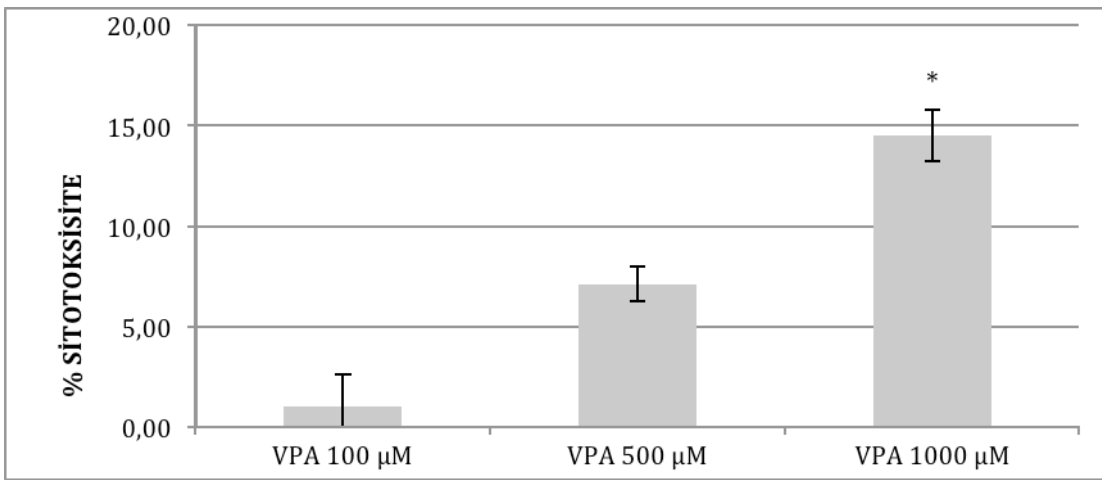


Şekil 5: Lityum’un paraquat sitotoksitesine etkisi: SH-SY5Y hücreleri 24 saat Lityum ile preinkübe edildikten sonra, 24 saat, 500 µM Paraquat ile enkübe edildi. Hücre ölümü LDH testi ile değerlendirildi. Lityumun 2mM (p=0.009) ve 5mM (p=0.009) dozlarında, paraquat toksisitesini anlamlı olarak azalttığı gözlemlendi.

4.4. Valproik Asidin SH-SY5Y hücrelerinde Paraquat toksisitesine etkisinin LDH Yöntemiyle Belirlenmesi

Valproik asidin (VPA) SH-SY5Y hücreleri üzerinde herhangi bir toksik etkisinin bulunup bulunmadığının belirlenmesi amacıyla hücreler, 100 μ M, 500 μ M ve 1000 μ M VPA ile 24 saat inkübe edildi.

VPA'nın 24 saat inkübasyonunun, 100 μ M ve 500 μ M dozunda üzerinde herhangi bir toksik etkisi olmadığı ancak, 1000 μ M dozunda toksik etkisi bulunduğu görüldü (Şekil 6).

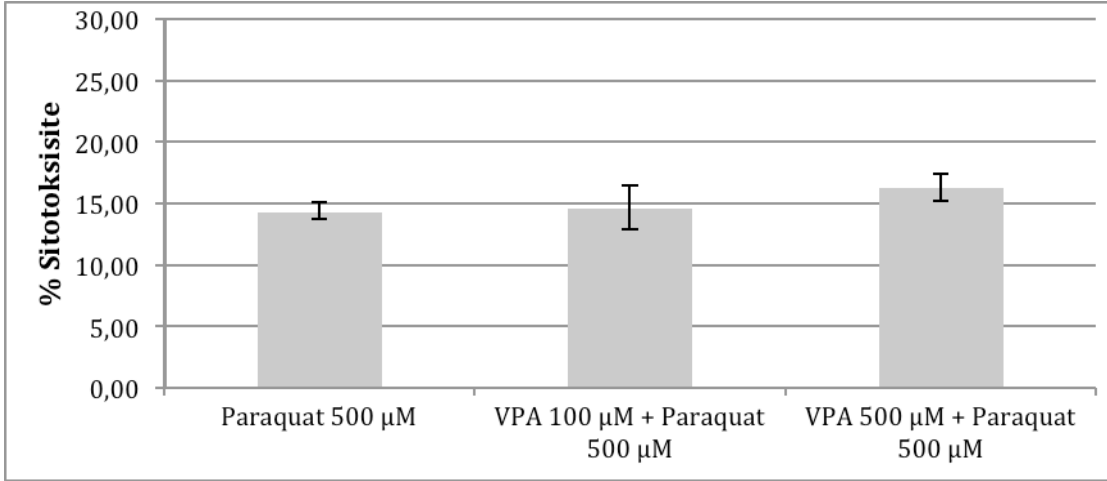


Şekil 6: Valproik Asit sitotoksitesi: VPA ile 24 saat inkübasyonun 100 μ M ve 500 μ M dozunda SH-SY5Y hücreleri üzerinde herhangi bir toksik etkisi olmadığı ancak, 1000 μ M dozunda toksik etkisi bulunduğu görüldü (p=0.0014).

4.5. Valproik Asidin Paraquat Toksisitesine Karşı Etkisinin LDH Yöntemiyle Belirlenmesi

Hücreler, 100 μ M ve 500 μ M VPA ile 24 saat preinkübe edildikten sonra, kültür ortamına 500 μ M paraquat eklendi. 24 saat sonunda elde edilen sitotoksosite bulguları Şekil 7'de verildi.

VPA'nın her iki dozda da paraquat toksisitesini azaltmadığı gözlemlendi. Valproik asidin 100 μ M ve 500 μ M dozlarında, paraquat toksisitesine karşı koruyucu etkisinin bulunmadığı görüldü.

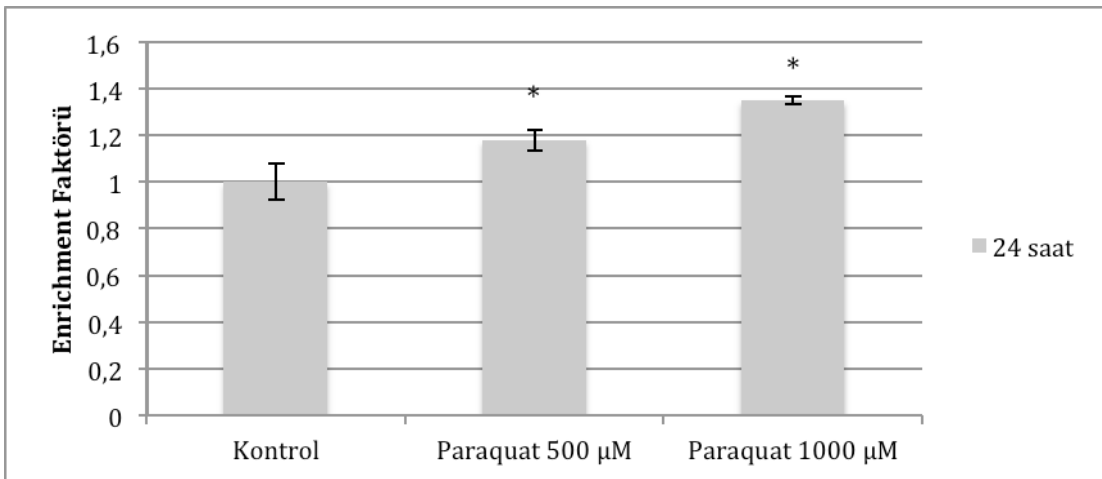


Şekil 7: Valproik Asit preinkübasyonu sonrası paraquat toksisitesi: SH-SY5Y hücreleri 24 saat süre ile 100 µM ve 500 µM VPA ile preinkübe edildikten sonra, 24 saat 500 µM Paraquat ile enkübe edildi. Hücre ölümü LDH testi ile değerlendirildi. VPA'nın her iki dozda da paraquat toksisitesini azaltmadığı gözlemlendi.

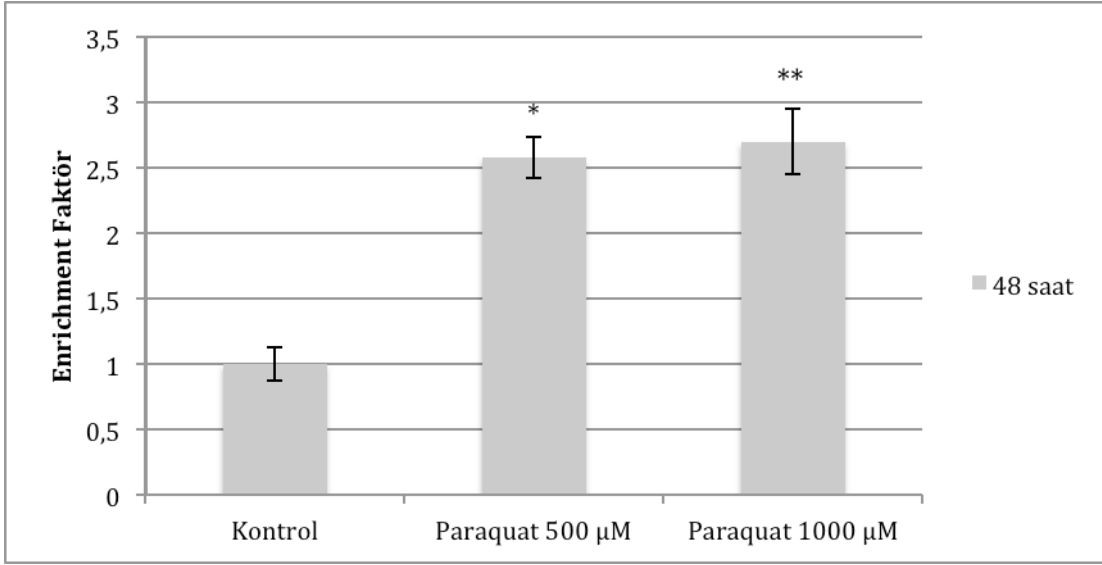
4.6. Paraquatın Apoptoza olan etkisinin Cell Death ELISA Yöntemiyle Belirlenmesi

Paraquatın 500µM ve 1000µM dozları ile 24 ve 48 saat inkübe edilen SH-SY5Y hücrelerinde, Cell Death ELISA yöntemi ile apoptotik ölüm oranı incelendi.

Paraquatın 500 µM ve 1000 µM dozlarında 24 saat inkübasyonun (Şekil 8). ve 48 saat inkübe edilen hücrelerde de apoptotik hücre ölümünün anlamlı olarak arttığı gözlemlendi (Şekil 9).



Şekil 8. Paraquatla indüklenen apoptoz (24 saat) : Paraquatın 500 µM ve 1000 µM dozlarıyla 24 saat inkübe edilen SH-SY5Y hücrelerinde oluşan apoptotik ölümün anlamlı olarak arttığı gözlemlendi (Paraquat 500 µM için: p=0.034, 1000 µM için p=0.034).

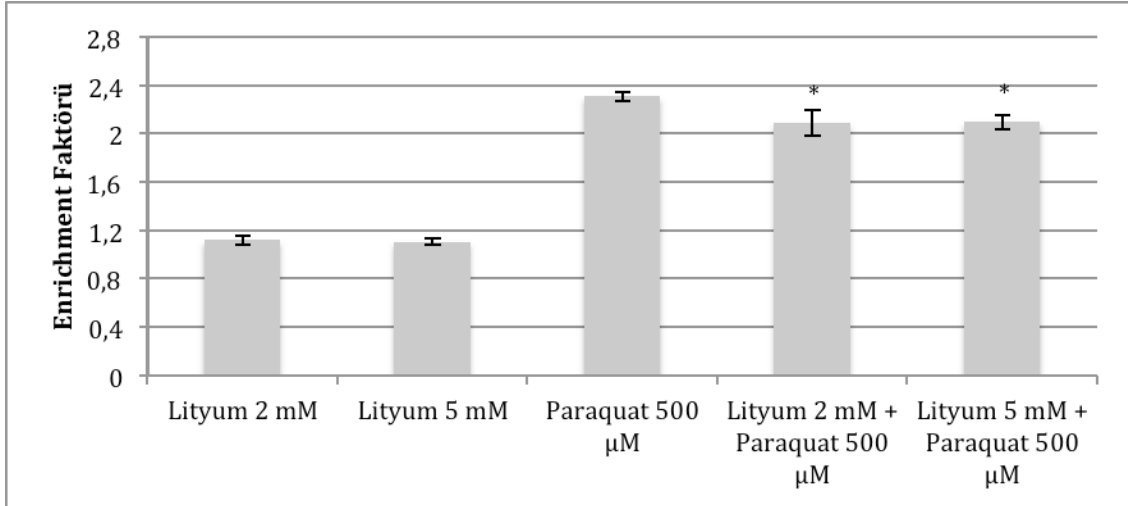


Şekil 9. Paraquatla indüklenen apoptoz (48 saat) : SH-SY5Y hücreleri 500 µM ve 1000 µM Paraquat dozlarıyla 48 saat inkübe edildi ve oluşan apoptotik ölüm Cell Death ELISA yöntemi ile değerlendirildi. Paraquat 500 µM (*: $p=0.009$) ve 1000 µM (**: $p=0.014$) dozlarında apoptotik hücre ölümünün anlamlı olarak arttığı gözlemlendi.

4.7. Lityum Preinkübasyonunun Paraquatla İndüklenen Apoptoza Etkisinin Cell Death ELISA Yöntemiyle Belirlenmesi

SH-SY5Y hücreleri, 1mM ve 5mM Lityum ile 24 saat preinkübe edildikten sonra, kültür ortamına 500 µM paraquat eklenerek 48 saat süre ile inkübe edildi. Apoptotik ölüm oranları Cell Death ELISA yöntemiyle incelendi.

Lityumun 2mM ve 5mM dozlarında, paraquat ile indüklenen apoptotik ölümün anlamlı olarak azalttığı gözlemlendi (Şekil 10).

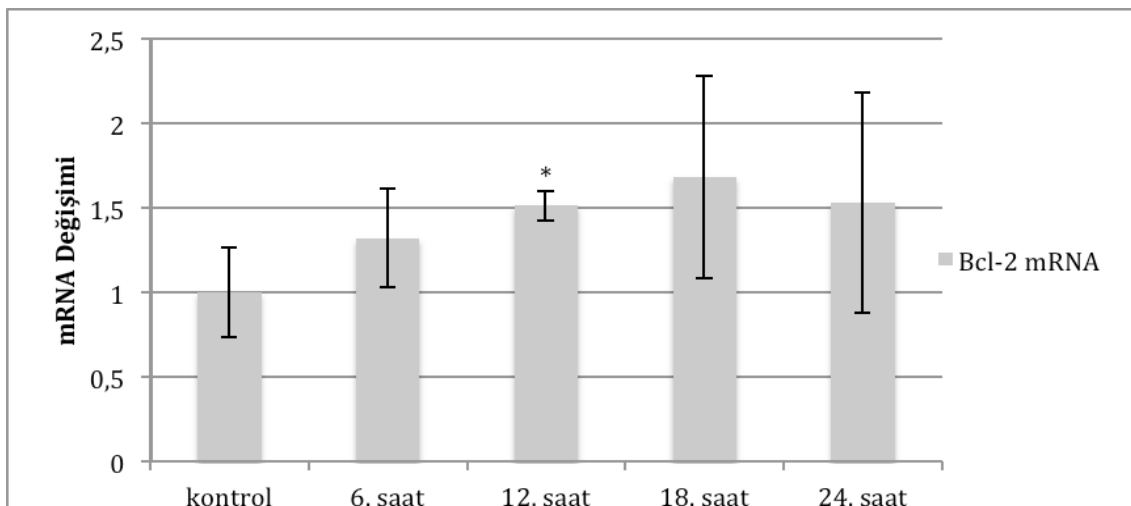


Şekil 10. Lityumun Paraquat ile indüklenen apoptoza etkisi: SH-SY5Y hücreleri 24 saat Lityum ile preinkübe edildikten sonra, 48 saat, 500 µM ve 1000 µM Paraquat ile inkübe edildi. Apoptotik hücre ölümü Cell Death ELISA testi ile değerlendirildi. Lityumun 2mM ($p=0.0021$) ve 5mM ($p=0.0021$) dozlarında, paraquat ile indüklenen apoptotik ölümün anlamlı olarak azalttığı gözlemlendi.

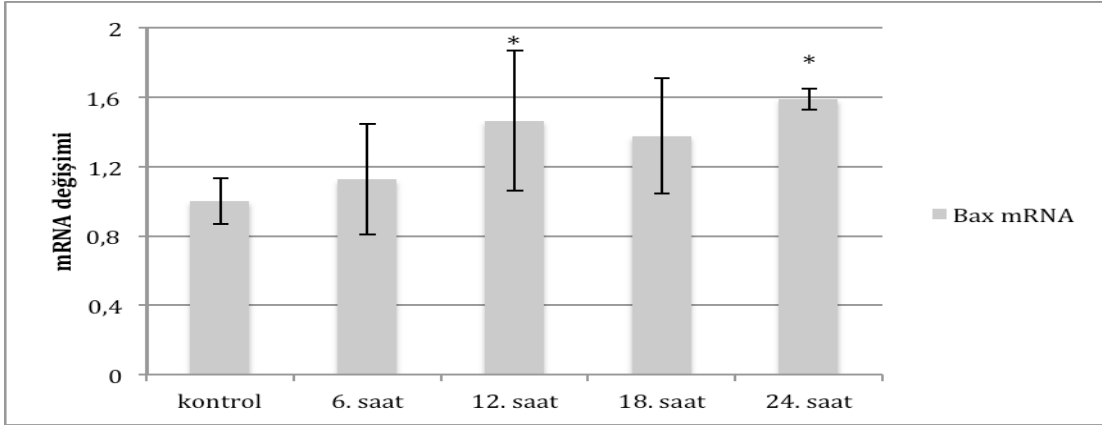
4.7. Paraquat Uygulamasının Bcl-2, Bcl-xl ve Bax mRNA Ekspresyonuna Etkisi

Hücreler 500 µM paraquat ile 6 – 12 – 18 ve 24 saat inkübe edildikten sonra, qPCR yöntemi ile Bcl-2, Bax, Bcl-xl mRNA'larındaki ekspresyon değişiklikleri incelendi.

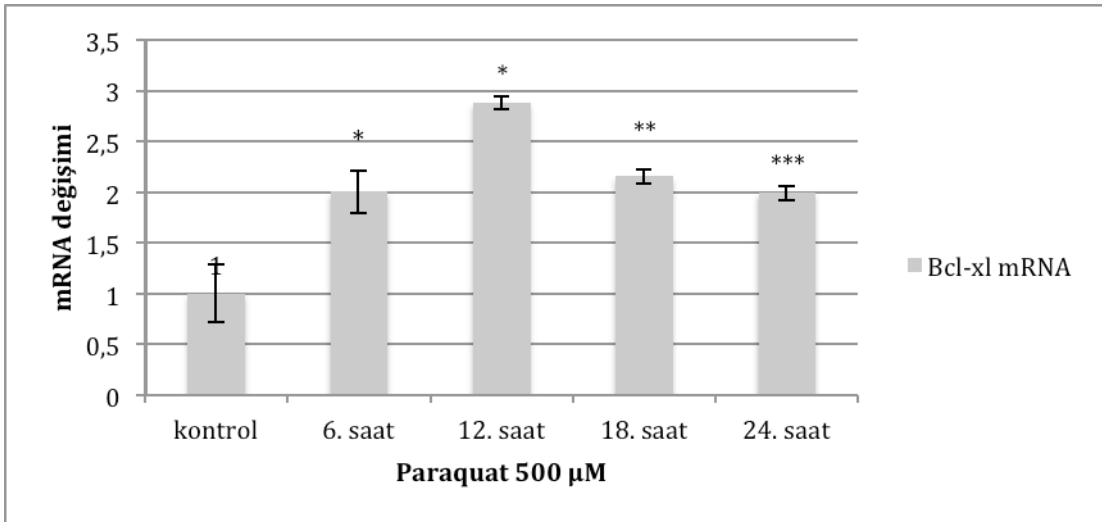
Kontrole oranla; Bcl-2 mRNA'sının 12. saatte (Şekil 11); Bax mRNA'sının 12. ve 24. saatlerde (Şekil 12), Bcl-xl mRNA'sının ise tüm saatlerde anlamlı olarak arttığı gözlemlendi (Şekil 13).



Şekil 11: Bcl-2 qPCR analizi: SH-SY5Y hücreleri 500 µM Paraquat ile çeşitli sürelerde inkübe edilerek, zamana bağlı olarak Bcl-2 mRNA ekspresyonuna etkisi qPCR yöntemi ile incelendi. 12. saatte Bcl-2 mRNA'sında kontrole göre anlamlı bir artış gözlemlendi ($p=0.034$).



Şekil 12: Bax qPCR analizi: SH-SY5Y hücreleri 500 µM Paraquat ile çeşitli sürelerde inkübe edilerek, zamana bağlı olarak Bax mRNA ekspresyonuna etkisi qPCR yöntemi ile incelendi. 12. ve 24. saatlerde Bax mRNA'sında, kontrole göre anlamlı bir artış gözlemlendi (*: $p=0.034$).



Şekil 13: Bcl-xL qPCR analizi: SH-SY5Y hücreleri 500 µM Paraquat ile çeşitli sürelerde inkübe edilerek, zamana bağlı olarak Bcl-xL mRNA ekspresyonuna etkisi qPCR yöntemi ile incelendi. Bcl-xL mRNA'sında, tüm saatlerde kontrole göre anlamlı bir artış gözlemlendi (6. saat için *: $p=0.043$, 12. saat için *: $p=0.043$, 18. saat için **: $p=0.034$, ***: 24. saat için $p=0.021$).

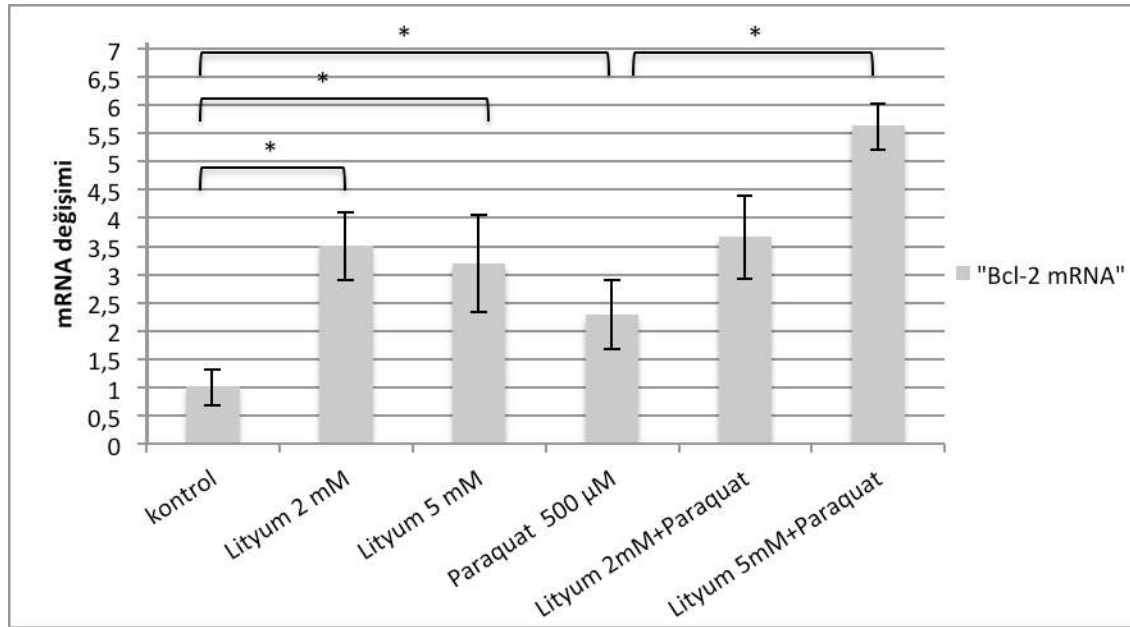
4.8. Lityum Preinkübasyonunun Paraquat ile değışen Bcl-2, Bcl-xL ve Bax mRNA Ekspresyonuna Etkisi

Hücreler 24 saat süre ile 2 mM ve 5 mM LiCl ile preinkübe edildikten sonra, 500 µM paraquat ile 12 saat inkübe edildi. Daha sonra, qPCR yöntemi ile Bcl-2, Bax, Bcl-xL mRNA'larındaki ekspresyon değışikleri incelendi.

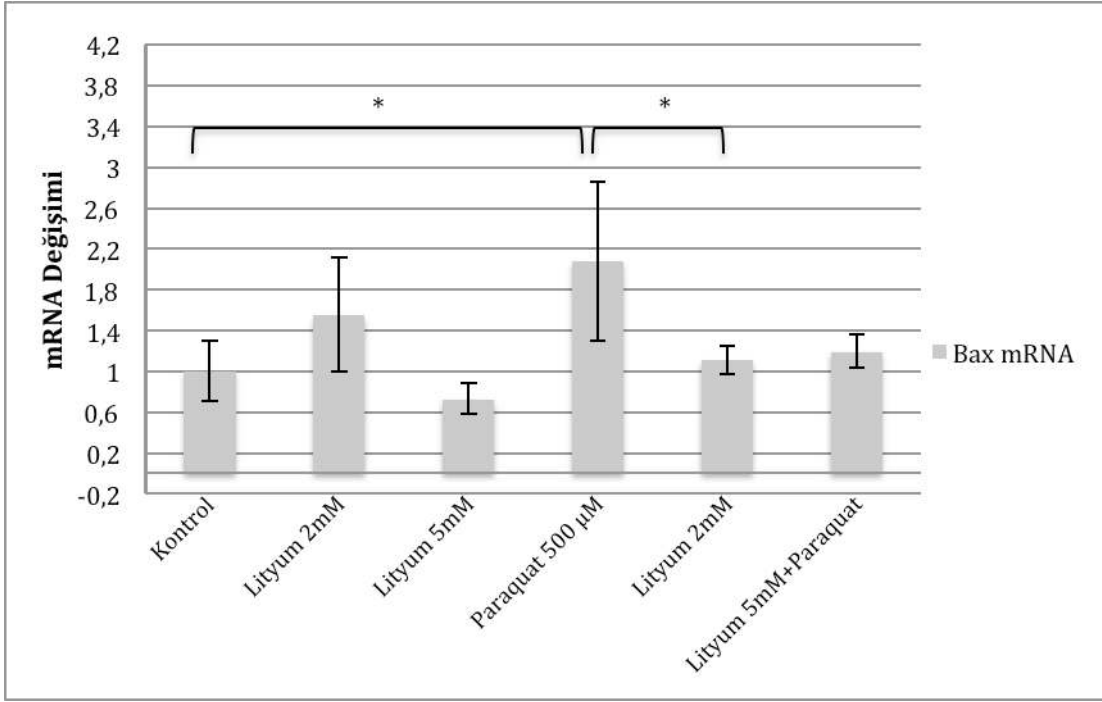
Sadece Lityum (2mM ve 5mM) ya da sadece Paraquat (500 μ M) ile inkübasyon, Bcl-2 mRNA'sında kontrole göre anlamlı bir artış sağlarken; Lityum 5mM ile preinkübasyon sonrası Paraquat ile inkübasyonun daha fazla artışa neden olduğu gözlemlendi (Şekil 14).

Sadece paraquat ile inkübasyonun Bax mRNA'sını anlamlı derecede arttırdığı, 2mM Lityum preinkübasyonunun bu artmayı anlamlı olarak azalttığı gözlemlendi (Şekil 15).

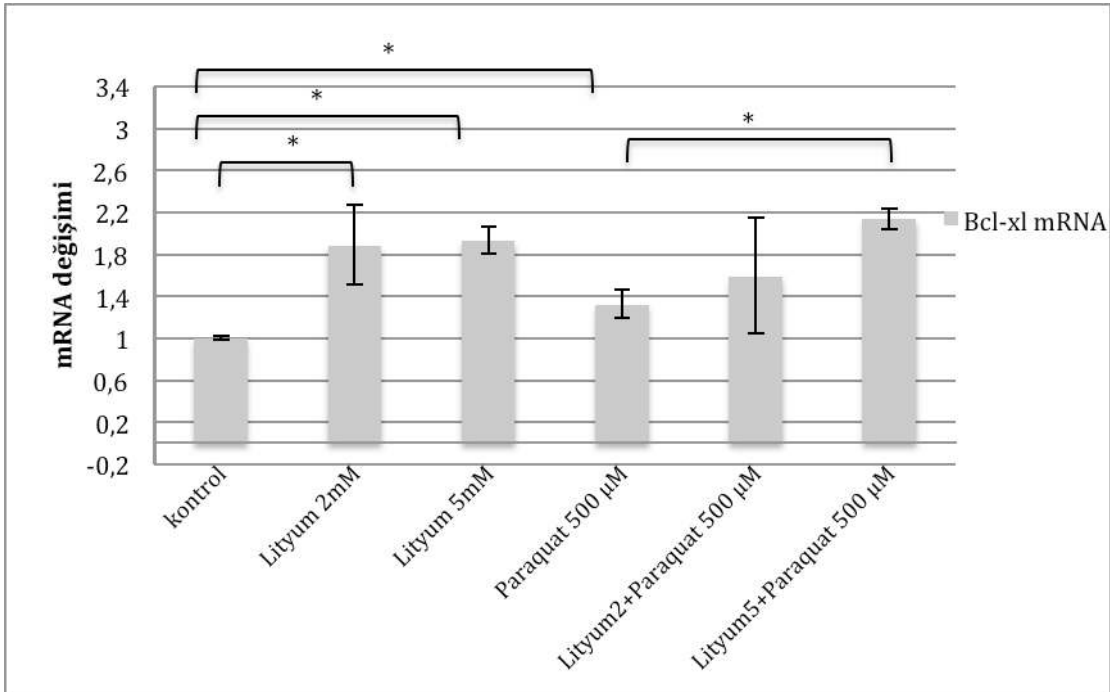
Sadece Lityum (2mM ve 5mM) ya da sadece Paraquat (500 μ M) ile inkübasyonun, Bcl-xl mRNA'sında kontrole göre anlamlı olarak arttırdığı; Lityum 5mM ile preinkübasyon sonrası Paraquat ile inkübasyonun da bu artışı anlamlı olarak daha da arttırdığı gözlemlendi (Şekil 16).



Şekil 14: Lityum preinkübasyonu sonrası Bcl-2 qPCR analizi: SH-SY5Y hücreleri 24 saat Lityum ile preinkübe edildikten sonra, 12 saat 500 μ M Paraquat ile inkübe edildi. Bcl-2 mRNA'sının, Paraquat inkübasyonu ile anlamlı derecede arttığı ($p=0.021$), 5mM Lityum preinkübasyonu bu artmayı anlamlı olarak daha da arttırdığı gözlemlendi ($p=0.021$).



Şekil 15. Lityum preinkübasyonu sonrası Bax qPCR analizi: SH-SY5Y hücreleri 24 saat Lityum ile preinkübe edildikten sonra, 12 saat 500 µM Paraquat ile inkübe edildi. Bax mRNA'sının, Paraquat inkübasyonu ile anlamlı derecede arttığı ($p=0.043$), 2mM Lityum preinkübasyonu bu artmayı anlamlı olarak azalttığı gözlemlendi ($p=0.034$).



Şekil 16. Lityum preinkübasyonu sonrası Bcl-xL qPCR analizi: SH-SY5Y hücreleri 24 saat Lityum ile preinkübe edildikten sonra, 12 saat 500 µM Paraquat ile inkübe edildi. Bcl-xL mRNA'sının, Paraquat inkübasyonu ile anlamlı derecede arttığı ($p=0.05$), 5mM Lityum preinkübasyonun da bu artışı anlamlı olarak daha da arttırdığı gözlemlendi ($p=0.034$).

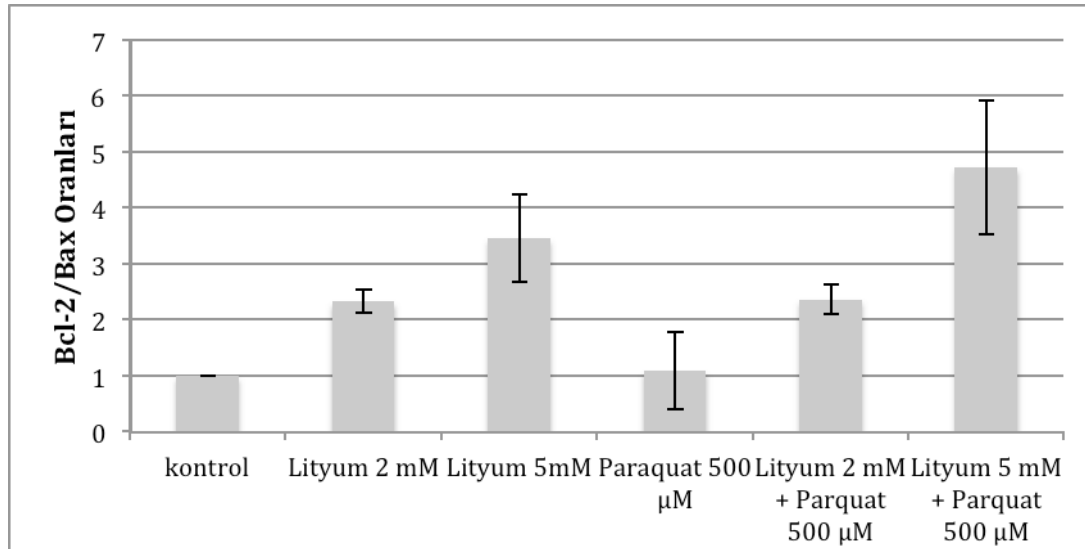
4.9. Bcl-2/ Bax Oranı ile Lityumun Antiapoptotik Etkisinin Analizi

Antiapoptotik etkili Bcl-2 mRNA artışının, proapoptotik etkili Bax mRNA artışına oranı, apoptotik ölümün değerlendirilmesinde kullanılan belirteçlerindendir. Bu amaçla yapılan hesap sonucu elde edilen oranlar Tablo 9. ve Şekil 17’de verildi.

Apoptozun anlamlı olduğu durumlarda Bcl-2/ Bax oranı azalırken, apoptozun azaldığı durumlarda bu oran artmaktadır. Deney sonucunda elde edilen oranlar, Lityumun her iki dozunda da Bcl-2/Bax oranını Bcl-2 lehine arttırarak apoptozu önlediği görüldü.

Tablo 9: Bcl-2/Bax Oranları

Kontrol	1	
Lityum 2 mM	2.327347185	
Lityum 5mM	3.459601684	
Paraquat 500 µM	1.089852203	
Lityum 2 mM + Paraquat 500 µM	2.366382295	p=0.021
Lityum 5 mM + Paraquat 500 µM	4.724317186	p=0.022



Şekil 17. Bcl-2/ Bax Oranları: Şekil 14. Ve Şekil 15’te elde edilen mRNA verileri oranlandı. Lityumun her iki dozunun da Bcl-2/Bax oranını Bcl-2 lehine arttırdığı ve apoptozu önlediği görüldü.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında Lityum ve Valproik Asidin SH-SY5Y nöronal hücre hattında paraquat toksisitesine karşı koruyucu etkileri ilk kez incelendi. LDH testi sonuçlarına göre lityumun 2mM ve 5mM dozlarında, paraquat toksisitesini önleyici bir etkisi olduğu gösterildi. Lityumun nöron koruyucu etkisi farklı sürelerde preinkübe edilen hücre hatlarında farklı gruplar tarafından gösterilmiştir. Lityumun 24 saat preinkübasyonu sonucunda, kolşisin (Jorda, 2004), valinomisin (Li, 2002), rotenon (Xiong, 2011), ouabain (Hennion, 2002) toksisitesinde nöroprotektif etkisi bulunduğu gösterilmiştir. 96 saat Lityum preinkübasyonu sonucunda ise; 3-nitropropionik asid (Crespo-Biel, 2009), MPP (1-methyl-4-phenylpyridine) (Manji, 2000), staurosporin (Bijur, 2000), 6-hidroksidopamin (Chen, 2004a) toksisitesine karşı nöroprotektif etki gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, Lityum ile 7 gün preinkübe edilen hücrelerde rotenon, H₂O₂ ve thapsigargin ile indüklenen hücre ölümünün azaldığı gösterilmiştir (Lai, 2006).

Bu çalışmada LDH testi sonuçlarına göre VPA'nın terapötik 100 µM ve 500 µM dozlarında bir koruyuculuk gösterilemedi. Literatüre bakıldığında; 300 µM dozunda VPA'nın, 72 saat preinkübasyonu sonucu staurosporinle indüklenen ölüme karşı (Song, 2012), 700 µM dozunda VPA'nın, 24 saat preinkübasyonu sonucunda valinomisine karşı (Li, 2002) koruyucu etkisi bulunduğu gösterilmiştir. Ayrıca Lai ve ark., 24 saat preinkübasyonun değil ancak 7 gün preinkübasyonun rotenona karşı SH-SY5Y hücrelerini koruduğunu göstermişlerdir (Lai, 2006). Buna karşın; çeşitli yayınlarda da VPA'nın; thapsigargin (Lai, 2006), ouabain (Hennion, 2002), glutamat (Leng, 2008) ve staurosporin (Plant, 2008) ile oluşturulan toksisite modellerinde herhangi bir koruyuculuğu olmadığı belirtilmiştir.

Valproik asidin koruyuculuğu sıklıkla kronik preinkübe edilen hücrelerde görüldüğünden, bizim de çalışmamızda 3 ve 7 gün süreli deneyler planlandı, ancak ön çalışmamızda bazal koşulda %50'yi aşan ölümle karşılaşıldığı için deneye devam edilmedi.

Bir sonraki aşamada, paraquatın SH-SY5Y hücreleri üzerindeki toksik etkisi sonucu oluşan ölümün nekrotik bir ölüm mü, yoksa apoptotik bir ölüm mü olduğu araştırıldı. Bu amaçla kullanılan Cell Death ELISA yöntemi sonucunda, Paraquatın hücrelerdeki apoptotik ölümü anlamlı olarak arttırdığı görüldü. Benzer bulgular, SH-SY5Y hücreleri (Nisa-Santano, 2006; Fujimori, 2012; Yang, 2009), insan akciğer epitel hücreleri (Cappelletti, 1998) ve serebral granül hücrelerinde (Polo, 2007) farklı gruplar tarafından da elde edilmiştir.

Paraquatın apoptotik etkisini, Bcl-2 Bax ve Bcl-xl proteinlerinin sentezini değiştirerek tetiklediği düşünülmüştür. Bunun üzerine yapılan çalışmalarda 500 µM dozunda paraquat ile 48 saat inkübasyonun SH-SY5Y hücrelerinde proapoptotik etkili Bax'ın ekspresyonunu arttırdığı (Young, 2008), 200-400 µM dozlarında paraquat ile 18 saat inkübasyonun Bcl-2, Bax ve Bcl-xl miktarını arttırdığı (Fei, 2007), 50-600 µM dozlarında paraquat ile 24 saat inkübasyonun sıçan feokromositoma hücre hattında (PC12) Bcl-2 ve kaspaz-3 aktivasyonunu azalttığı gösterilmiştir (Kang, 2007).

Lityum, uzun yıllar aktif klinik kullanımı bulunsa da etki mekanizmaları tam olarak açıklanamamış duygudurum düzenleyici bir ilaçtır. Lityumun nöron koruyucu etkilerine aracılık eden pek çok mekanizma ortaya konmuştur. Bunların en önemlileri GSK3β ve I3P gibi hücre içi sekonder haberciler, BDNF ekspresyon artışı ve apoptoz yolağıdır (Chiu, 2010). Çalışmamızda cell death ELISA analizi SH-SY5Y hücrelerinde Lityum'un paraquat ile indüklenen apoptozu önlediği ilk kez gösterildi. Jorda ve ark.'nın serebral granül hücrelerinde (CGC) yaptığı bir çalışmada lityumun, kolşisinle indüklenen apoptozu karşı hücreleri koruduğunu, DNA fragmentasyonunu ve kromatin yoğunluğunu düşürdüğünü göstermişlerdir (Jorda, 2000). Lityumun Na⁺/K⁺ pompası inhibitörü olan ouabaine karşı hücreleri koruduğunun gösterilmesi ile birlikte lityumun antiapoptotik mekanizmasının Na⁺ ve K⁺ katyonlarının transmembran değişimi ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür (el-Mallakh, 1993; Henning, 2002). Daha sonra lityumun bu etkisi, Mora ve ark. tarafından CGC kültüründe düşük potasyum konsantrasyonu ile indüklenen apoptozun önlenmesi ile doğrulanmıştır (Mora, 1999). Ekstra ve intraselüler potasyum iyonu konsantrasyonları, hücrenin apoptotik ve proapoptotik süreçler arasındaki geçişinde önemli rol oynamaktadır. Lityum, potasyum seviyelerindeki değişime bağlı apoptozu; hücre membranını stabilize ederek, apoptozla ilişkili tirozin kinazı bloke ederek ve siklik adenosin monofosfat (cAMP) ve insülin büyüme faktörünü aktive ederek göstermektedir (Tomomura, 2005). Aynı zamanda lityumun, protein kinaz B defosforilasyonu ile ve seramid C2 ile GSK-3β i süpresyonu ile indüklenen apoptozu inhibe ettiği de gösterilmiştir (Goldbaum, 2002). Ayrıca Lityumun, fosfolipaz c-γ ve 3-fosfoinositol kinaz (PI-3K) aktivasyonu yoluyla apoptozu bloke ettiği de fare glial hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (Chen, 2004a).

Lityum'un apoptoz yolağına etkisinde önemli bir mekanizma, Bcl-2 protein ailesi üzerinde yaptığı ekspresyon değişimleridir. Lityumun, hem *in vivo* frontal kortekste, hipokampüste ve striatum da hem de kültüre edilmiş insan ve sıçan kökenli hücrelerde,

antiapoptotik etkili Bcl-2 proteininin seviyesini arttırdığı gösterilmiştir (Manji, 2000). Lityumun 7 gün preinkübasyonu sonrası, serebral granül hücrelerinde glutamat ile indüklenen hasar modelinde, Bcl-2 seviyesini arttırdığı, proapoptotik etkili Bax ve p53 gibi proteinlerin seviyesini düşürdüğü bildirilmiştir (Chen, 1999). Yapılan başka bir çalışma sonucunda, Lityumun 3mM dozda ve 7 gün süreli preinkübasyonunun, kültüre edilmiş fare hipokampal hücrelerde radyasyonla indüklenen apoptozu önlediği, bunu ise Bcl-2 protein ekspresyonunu ve Bcl-2/Bax oranını arttırarak gerçekleştirdiği gösterilmiştir (Yazlovitskaya, 2006).

İlgili verilerin ışığında bizim çalışmamızda, lityumun paraquata karşı var olan nöroprotektif etkisinin mekanizmasında bcl-2 ailesi üzerine etkilerinin araştırılması planlandı. Çalışmamızın sonucunda, literatürle uyumlu olarak tek başına paraquat uygulanmasının; Bcl-xl ve Bax mRNA düzeyinde artışa yol açtığını; ancak Bcl-2 mRNA seviyesinde anlamlı bir değişiklik yapmadığı gösterildi. Daha sonra uyguladığımız lityum preinkübasyonu ile, paraquatın artışına neden olduğu Bax mRNA seviyesini anlamlı olarak azalttığını, anti apoptotik etkili Bcl-2 ve Bcl-xl mRNA miktarlarını da anlamlı olarak arttırdığını bulduk.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızın ilk bölümünde lityum ve valproik asidin, SH-SY5Y hücrelerini, mitokondriyal bir inhibitör olan Paraquat ile hasara karşı koruyup korumadığını araştırdık. Lityumun terapötik dozlarda (2mM ve 5mM) 24 saatlik preinkübasyonunun, paraquat toksisitesine karşı hücreleri anlamlı düzeyde koruduğu ilk kez bizim çalışmamızda gösterilmiştir.

VPA'nın terapötik olarak belirlenmiş dozlarında, 24 saat ve 48 saat preinkübasyonu sonucunda herhangi bir koruyuculuk gözlemlenmedi. Bu nedenle daha ileri çalışmalarda, düşük dozlarda 3-7 gün süreyle veya daha yüksek dozlarda kısa süreli (1-6 saat) preinkübasyon denenmelidir.

Çalışmamızın ikinci bölümünde paraquatın SH-SY5Y hücreleri üzerinde apoptoz yolu ile ölüm oluşturduğu, ayrıca Bcl-2, Bax ve Bcl-xl mRNA'larında anlamlı artışa neden olduğu gösterildi.

Lityumun, Paraquat ile oluşturulan modelde, Bcl-2, Bax ve Bcl-xl'in mRNA'ları üzerinde olan etkisinin incelendiği deneylerin sonucunda ise, 5mM Lityum preinkübasyonunun, antiapoptotik etkili Bcl-2 ve Bcl-xl mRNA'sını, kontrol ve sadece paraquat uygulamasına göre arttırdığı; sadece paraquat uygulaması sonucu anlatımı anlamlı olarak artan proapoptotik etkili Bax mRNA'sının ise lityum 2mM preinkübasyon sonucunda azaldığı belirlendi.

Paraquat inkübasyonu, ön deneylerde her üç mRNA miktarının da anlamlı olarak değiştiği 12. saat ile sınırlı tutuldu, ancak ilerideki çalışmalarda zamana bağlı değişimleri de incelenmelidir.

Bu çalışmanın ötesinde, Bcl-2 Bax ve Bcl-xl mRNA'larında değişikliği sağlayan koşulların, protein seviyesinde de uyumlu şekilde değişikliğe yol açıp açmadığı Western blot gibi yöntemlerle incelenmelidir.

7. KAYNAKLAR

Ahlskog JE, diagnosis and differential diagnosis of Parkinson's disease and parkinsonism, *Park Rel Disord*, 2001;7:63-70.

Andersen PM, Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in the CuZn superoxide dismutase gene, *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2006; 6: 37–46.

Arraf Z, Amit T, Youdim MB, Farah R. Lithium and oxidative stress lessons from the MPTP model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 2012 May 10;516(1):57-61. Epub 2012 Mar 28. PubMed PMID: 22480690.

Berridge MJ, Downes CP, Hanley MR, Neural and development actions of lithium, A unifying hypothesis, *Cell* 1989; 59: 411-419

Bielecka AM, Obuchowicz E, Antiapoptotic action of lithium and valproate, *Pharmacological Reports*, 2008; 60: 771–782

Bian Q, Shi T, Chuang DM, Qian Y. Lithium reduces ischemia-induced hippocampal CA1 damage and behavioral deficits in gerbils. *Brain Res*. 2007 Dec 12;1184:270-6. Epub 2007 Sep 29. PubMed PMID: 18028886.

Bijur GN, De SP, Jope RS, Glycogen synthase kinase-3beta facilitates staurosporine- and heat shock-induced apoptosis. Protection by lithium. *J Biol Chem*, 2000; 275: 7583–7590.

Bocci T, Pecori C, Giorli E, Briscese L, ve ark., Differential Motor Neuron Impairment and Axonal Regeneration in Sporadic and Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis with SOD-1 Mutations: Lessons from Neurophysiology, *Int J Mol Sci*. 2011;12(12):9203-15.

Bowden CL, Valproate, *Bipolar Disorder*, 2003; 3;5:189-202.

Caccamo A, Oddo S, Tran LX, LaFerla FM. Lithium reduces tau phosphorylation but not A beta or working memory deficits in a transgenic model with both plaques and tangles. *Am J Pathol*. 2007 May;170(5):1669-75.

Cappelletti G, Maggioni MG, Maci R, Apoptosis In Human Lung Epithelial Cells: Triggering By Paraquat and Modulation By Antioxidants, *Cell Biology International* 1998; 22;9/10: 671–678.

Castro AA, Ghisoni K, Latini A, Quevedo Je ark., Lithium and valproate prevent olfactory discrimination and short-term memory impairments in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) rat model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res*. 2012 Apr 1;229(1):208-15. Epub 2012 Jan 17. PubMed PMID: 22266923.

Chakraborty G, Saito M, Mao RF, Wang R, Vadasz C, Saito M. Lithium blocks ethanol-induced modulation of protein kinases in the developing brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Mar 14;367(3):597-602.

Chen G, Bower KA, Ma C, Fang S, Thiele, CJ, Luo J, Glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) mediates 6-hydroxydopamine-induced neuronal death. *FASEB J*, 2004a; 18: 1162–1164.

Chen RW, Chuang DM, Long term lithium treatment suppresses p53 and Bax expression but increases Bcl-2 expression. A prominent role in neuroprotection against excitotoxicity, *J Biol Chem.*,1999;274(10): 6039-42.

Chi-Tso Chiu, De-Maw Chuang, Molecular actions and therapeutic potential of lithium in preclinical and clinical studies of CNS disorders, *Pharmacology & Therapeutics* 128 (2010) 281–304.

Chiu C, Chuang DM, Molecular actions and therapeutic potential of lithium in preclinical and clinical studies of CNS disorders, *Pharmacology & Therapeutics*, 2010; 128: 281–304.

Clay H, Sullivan S, Konradi C, Mitochondrial Dysfunction and Pathology in Bipolar Disorder and Schizophrenia, *Int J Dev Neurosci.* 2011 May ; 29(3): 311–324.

Coppede` F, Mancuso M, Siciliano G, Genes and the Environment in Neurodegeneration, *Biosci Rep*, 2006; 26: 341–367.

Crespo-Biel N, Camins A, Pallas M, Canudas AM, Evidence of calpain/cdk5 pathway inhibition by lithium in 3-nitropropionic acid toxicity in vivo and in vitro. *Neuropharmacology* ,2009; 56: 422–428.

De Sarno P, Axtell RC, Raman C, Roth KA, Alessi DR, Jope RS. Lithium prevents and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2008 Jul 1;181(1):338-45.

Djaldetti R, Lev N, Melamed E, Neuroprotection in Progressive Brain Disorders, *IMAJ*, 2003; 5: 576-580

DSM-IV-TR Tanı Ölçütleri Basvuru Elkitabı. Amerikan Psikiyatri Birliği. Washington, DC 2000'den, Çeviri Editörü; Prof. Dr. Ertuğrul Köroğlu. Hekimler Yayın Birliği. Ankara 2001. sayfa: 151–174.

Duka T, Duka V, Joyce JN, Sidhu A. Alpha-Synuclein contributes to GSK-3beta-catalyzed Tau phosphorylation in Parkinson's disease models. *FASEB J*. 2009 Sep;23(9):2820-30. Epub 2009 Apr 15. PubMed PMID: 19369384; PubMed Central PMCID: PMC2796901

Engel T, Goñi-Oliver P, Lucas JJ, Avila J ve ark., Chronic lithium administration to FTDP-17 tau and GSK-3beta overexpressing mice prevents tau hyperphosphorylation and neurofibrillary tangle formation, but pre-formed neurofibrillary tangles do not revert. *J Neurochem.* 2006 Dec;99(6):1445-55. Epub 2006 Oct 24. PubMed PMID: 17059563.

el-Mallakh RS, Li R, Is the Na⁺-K⁺-ATPase the link between phosphoinositide metabolism and bipolar disorder?, *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 199; 5(4): 361-8.

Farooqui A, *Neurochemical Aspects of Neurotraumatic and Neurodegenerative Diseases*, 1st Edition, Springer, 2010; 325-382.

Feng HL, Leng Y, Ma CH, Zhang J, Ren M, Chuang DM. Combined lithium and valproate treatment delays disease onset, reduces neurological deficits and prolongs survival in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Neuroscience*. 2008 Aug 26;155(3):567-72. Epub 2008 Jun 21. PubMed PMID: 18640245; PubMed Central PMCID: PMC2709275.

Fornai F, Longone P, Cafaro L, Kastsiuchenka O, ve ark., Lithium delays progression of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Feb 12;105(6):2052-7. Epub 2008 Feb 4. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Oct 21;105(42):16404-7. PubMed PMID:18250315; PubMed Central PMCID: PMC2538879.

Fujimori K, Fukuhara A, Inui T, Allhorn M, Prevention of paraquat-induced apoptosis in human neuronal SH-SH5Y cells by lipocalin-type prostaglandin D synthase, *International Society for Neurochemistry, J. Neurochem.*, 2012; 120: 279–291.

Gill A, Kidd J, Vieira F, Thompson K, Perrin S. No benefit from chronic lithium dosing in a sibling-matched, gender balanced, investigator-blinded trial using a standard mouse model of familial ALS. *PLoS One*. 2009 Aug 3;4(8):e6489. PubMed PMID: 19649300; PubMed Central PMCID: PMC2714460.

Goldbaum O, Richter-Landsberg: Activation of PP2Alike phosphatase and modulation of tau phosphorylation accompany stress-induced apoptosis in cultured oligodendrocytes, *Glia*, 2002; 40: 271–282.

Guo Q, Furukawa K, Sopher BL ve ark., Alzheimer's PS-1 mutation perturbs calcium homeostasis and sensitizes PC 12 cells to death induced amyloid β peptide, *Neuroreport*, 1996; 8:379- 383.

Hennion JP, el-Masri MA, Huff MO, el-Mailakh RS, Evaluation of neuroprotection by lithium and valproic acid against ouabain-induced cell damage, *Bipolar Disorder*, 2002;4(3):201-6.

Ferrucci M, Spalloni A, Bartalucci A, Cantafora E ve ark A systematic study of brainstem motor nuclei in a mouse model of ALS, the effects of lithium. *Neurobiol Dis*. 2010; 37(2):370-83. Epub 2009 Oct 27. PubMed PMID: 19874893.

Higuchi M, Trojanowski JQ, Lee VMY. Pathobiological features in neurodegenerative diseases: an overview, *Int Congr Ser*, 2004;1260:69-75.

Jain KK, *The handbook of neuroprotection*, Humana Press, New York, USA. 2011; pp: 25-132.

Jefferson JW, Greist JH. Lithium, In: Sadock BJ, Sadock VA, editors. Kaplan and Sadock's Comprehensive Textbook of Psychiatry, 8. edition. Philadelphia, PA, ABD. 2007; pp.2839-2850

Jellinger K, Advances in our Understanding of Neurodegeneration, In: Qureshi J, Parvez HS, editor. Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders. Cambridge: Elsevier; 2007. p. 1-58.

Jorda EG, Verdaguer E, Canudas AM, Jimenez A ve ark., Implications of cyclin-dependent kinase in the neuroprotective properties of lithium. Neuroscience, 2000; 134: 1001–1111.

Jorda EG, Verdaguer, E, Morano, A, Jimenez A, ve ark., Lithium prevents colchicine-induced apoptosis in rat cerebellar granule neurons. Bipolar Disorder, 2004;6: 144–149.

Kang K, Kim YJ, Kim YH, Roh JN, Nam JM, Kim PY, Ryu WS, Lee SH, Yoon BW. Lithium pretreatment reduces brain injury after intracerebral hemorrhage in rats. Neurol Res. 2012 Jun;34(5):447-54.

Ketter TA, Wang PW, The Emerging Differential Roles of GABAergic and Antiglutamergic Agents in Bipolar Disorder, J, Clin Psychiatry, 2003; 6: 15-20

Kim YH, Rane A, Lussier S, Andersen JK. Lithium protects against oxidative stress-mediated cell death in α -synuclein-overexpressing in vitro and in vivo models of Parkinson's disease. J Neurosci Res. 2011 Oct;89(10):1666-75. doi: 10.1002/jnr.22700. Epub 2011 Jun 24. PubMed PMID: 21710541; PubMed Central PMCID: PMC3154577.

Koh SH, Song C, Noh MY, Kim HY, ve ark., Inhibition of glycogen synthase kinase-3 reduces L-DOPA-induced neurotoxicity. Toxicology. 2008 May 21;247(2-3):112-8. Epub 2008 Feb 26. PubMed PMID: 18387727

Kretschmar HA, Molecular pathogenesis of prion diseases, Eur.Arch. Psychiatry Clin. Neurosci., 1999; 249: 56-63.

Lai JS, Zhao C, Warh JJ, Li PP, Cytoprotection by lithium and valproate varies between cell types and cellular stresses, European Journal of Pharmacology, 2006; 539: 18–26.

Li H, Li Q, Du X, Sun Y ve ark., Lithium-mediated long-term neuroprotection in neonatal rat hypoxia-ischemia is associated with antiinflammatory effects and enhanced proliferation and survival of neural stem/progenitor cells. J Cereb Blood Flow Metab. 2011;31(10):2106-15. doi: 10.1038/jcbfm.2011.75. Epub 2011 May 18. PubMed PMID: 21587270; PubMed Central PMCID: PMC3208156.

Li Q, Li H, Roughton K, Wang X, Kroemer G, Blomgren K, Zhu C. Lithium reduces apoptosis and autophagy after neonatal hypoxia-ischemia. Cell Death Dis. 2010 Jul 15;1:e56. PubMed PMID: 21364661; PubMed Central PMCID: PMC3032556.

Liu Y, Chen G, Ma C, Bower KA, Xu M, Fan Z, Shi X, Ke ZJ, Luo J. Overexpression of glycogen synthase kinase 3 β sensitizes neuronal cells to

ethanol toxicity. *J Neurosci Res*. 2009 Sep;87(12):2793-802.

Langan C, McDonald C, Neurobiological trait abnormalities in bipolar disorder, *Mol Psychiatry*. 2009;14(9):833-46

Lansbury Jr PT, Brice A, Genetics of Parkinson's disease and biochemical studies of Implicated gene products, *Current Op Gen Develop*, 2002;12:299-306.

Leng Y, Liang MH, Ren M, Marinova Z ve ark., Synergistic neuroprotective effects of lithium and valproic acid or other histone deacetylase inhibitors in neurons: roles of glycogen synthase kinase-3 inhibition. *J Neuroscience*, 2008; 28:2576–2588.

Leroy K, Ando K, Héraud C, Yilmaz Z, Authelet M, Boeynaems JM, Buée L, De Decker R, Brion JP. Lithium treatment arrests the development of neurofibrillary tangles in mutant tau transgenic mice with advanced neurofibrillary pathology. *J Alzheimers Dis*. 2010;19(2):705-19.

Li, X, Ketter TA, Frye MA, Synaptic, intracellular, and neuroprotective mechanisms of anticonvulsants: are they relevant for the treatment and course of bipolar disorders, *J Affect Disorder*, 2002;69: 1–14.

Ma J, Zhang GY, Liu Y, Yan JZ, Hao ZB. Lithium suppressed Tyr-402 phosphorylation of proline-rich tyrosine kinase (Pyk2) and interactions of Pyk2 and PSD-95 with NR2A in rat hippocampus following cerebral ischemia. *Neurosci Res*. 2004 Aug;49(4):357-62. PubMed PMID: 15236860.

Manji HL, Moore GJ, Rajkowska G, Chen G, Neuroplasticity and cellular resilience in mood disorders, *Molecular Psychiatry* (2000) 5, 578–593.

Manji HL, Moore GJ, Chen G, Lithium Up-Regulates the Cytoprotective Protein Bcl-2 in the CNS In Vivo: a Role for Meurotrophic and Neuroprotective Effects in Manic Depressive Illness, *J Clinic Psychiatry*, 2000; 61: 82-95.

Mora A, Gonzales-Polo RA, Fuentes JM, Soler G, Centeno F: Different mechanisms of protection against apoptosis by valproate and Li⁺. *Eur J Biochem*, 1999; 266: 886–891.

Nakashima H, Ishihara T, Suguimoto P, Yokota O, Oshima E, Kugo A, Terada S, Hamamura T, Trojanowski JQ, Lee VM, Kuroda S. Chronic lithium treatment decreases tau lesions by promoting ubiquitination in a mouse model of tauopathies. *Acta Neuropathol*. 2005 Dec;110(6):547-56. Epub 2005 Oct 14. PubMed PMID: 16228182.

Niso-Santano M, Moran JM, Rubio LG, Martin GA, Low Concentrations of Paraquat Induces Early Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2, Protein Kinase B, and c-Jun N-terminal Kinase 1/2 Pathways: Role of c-Jun N-Terminal Kinase in Paraquat-Induced Cell Death, *Toxicological Sciences*, 2006; 92(2): 507–515.

Ozen O, Human Prion Disease: Creutzfeldt-Jakob Disease, *Journal of Neurological Sciences*, 2007, Volume 24, Number 2, Page(s) 182-189.

Pizzasegola C, Caron I, Daleno C, Ronchi A, Minoia C, Carri MT, Bendotti C, Treatment with lithium carbonate does not improve disease progression in two different strains of SOD1 mutant mice. *Amyotroph Lateral Scler*. 2009;10(4):221-8.

Plant KE, Anderson E, Simecek N, Brown R, The neuroprotective action of the mood stabilizing drugs lithium chloride and sodium valproate is mediated through the up-regulation of the homeodomain protein Six1, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2009;235: 124–134.

Polo RA, Nisa-Santano M, Ortis MA, Martin GA ve ark., Inhibition of Paraquat-Induced Autophagy Accelerates the Apoptotic Cell Death in Neuroblastoma SH-SY5Y Cells, *Toxicological Sciences*, 2007; 97(2): 448–458.

Przedborski S. Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease, *Parkinsonism Rel Disord*, 2005; 11: S3-S7.

Rajkowska G, Cell pathology in mood disorders, *Semin Clin Neuropsychiatry*, 2002;7(4):281-92

Ren M, Senatorov VV, Chen RW, Chuang DM. Postinsult treatment with lithium reduces brain damage and facilitates neurological recovery in a rat ischemia/reperfusion model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May 13;100(10):6210-5. Epub 2003 May 5. PubMed PMID: 12732732; PubMed Central PMCID: PMC156351.

Rosenberg JM, Salzman C, Update: New uses for lithium and anticonvulsants, *CNS Spectr*, 2007; 67; 12(11):831-41.

Rockenstein E, Torrance M, Adame A, Mante M, Bar-on P, Rose JB, Crews L, Masliah E. Neuroprotective effects of regulators of the glycogen synthase kinase-3 β signaling pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease are associated with reduced amyloid precursor protein phosphorylation. *J Neurosci*. 2007 Feb 21;27(8):1981-91. PubMed PMID: 17314294.

Sarkar S, Krishna G, Imarisio S, Saiki S, O'Kane CJ, Rubinsztein DC. A rational mechanism for combination treatment of Huntington's disease using lithium and rapamycin. *Hum Mol Genet*. 2008 Jan 15;17(2):170-8.

Sasaki T, Han F, Shioda N, Moriguchi S, Kasahara J, Ishiguro K, Fukunaga K, Lithium-induced activation of Akt and CaM kinase II contributes to its neuroprotective action in a rat microsphere embolism model. *Brain Res*. 2006;1108(1):98-106. Epub 2006 Jul 14. PubMed PMID: 16843447.

Saudou F, Finkbeiner S, Devys D, Greenberg ME, Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions, *Cell* 95:55–66 (1998).

Sava A, Tomodo T, Mechanisms of neuronal cell death in Huntington's disease, *Cytogenet Genome Res*, 2003; 100: 287–295.

Sawa A, Mechanisms for neuronal cell death and dysfunction in Huntington's disease, pathological cross-talk between the nucleus and the mitochondria? *J molec Med*, 2001; 79: 375–381.

Schäfer M, Goodenough S, Moosmann B, Behl C. Inhibition of glycogen synthase kinase 3 beta is involved in the resistance to oxidative stress in neuronal HT22 cells. *Brain Res*. 2004 Apr 16;1005(1-2):84-9. PubMed PMID: 15044068.

Senatorov VV, Ren M, Kanai H, Wei H, Chuang DM. Short-term lithium treatment promotes neuronal survival and proliferation in rat striatum infused with quinolinic acid, an excitotoxic model of Huntington's disease. *Mol Psychiatry*. 2004;9(4):371-85.

Shin JH, Cho SI, Lim HR, Lee JK, Lee YA, Noh JS, Joo IS, Kim KW, Gwag BJ, Concurrent administration of Neu2000 and lithium produces marked improvement of motor neuron survival, motor function, and mortality in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Pharmacol*. 2007 Apr;71(4):965-75.

Sofola O, Kerr F, Rogers I, Killick R, Augustin H, Gandy C, Allen MJ, Hardy J, Lovestone S, Partridge L. Inhibition of GSK-3 ameliorates Abeta pathology in an adult-onset *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *PLoS Genet*. 2010 Sep 2;6(9). pii: e1001087.

Song N, Boku S, Nakagawa S, Kato A ve ark., Mood stabilizers commonly restore staurosporine-induced increase of p53 expression and following decrease of Bcl-2 expression in SH-SY5Y cells, *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 2012 (Basımda).

Sudduth TL, Wilson JG, Everhart A, Colton CA, Wilcock DM. Lithium treatment of APPSwDI/NOS2-/- mice leads to reduced hyperphosphorylated tau, increased amyloid deposition and altered inflammatory phenotype. *PLoS One*. 2012;7(2):e31993.

Sun X, Huang L, Zhang M, Sun S, Wu Y. Insulin like growth factor-1 prevents 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced apoptosis in PC12 cells through activation of glycogen synthase kinase-3beta. *Toxicology*. 2010 Apr 30;271(1-2):5-12.

Şengül C, CB Şengül, Ellibeşinci yılında lityumun öyküsü, *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni* 2004;14(1):50-56.

Tunca Z, Özerdem A, Duygudurum Dengeleyici İlaçlar, In: Yüksel N, Soygür H, Tural Ü, Demet MM, ed. *Temel Psikofarmakoloji*, 1. Baskı, Ankara: Türk Psikiyatri Yayınları, 2010;

Toledo EM, Inestrosa NC. Activation of Wnt signaling by lithium and rosiglitazone reduced spatial memory impairment and neurodegeneration in brains of an APPsw/PSEN1DeltaE9 mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry*. 2010 Mar;15(3):272-85, 228.

Tomomura F, Furuichi T: Apoptosis-associated tyrosine kinase (AATYK) has differential Ca²⁺ dependent phosphorylation states in response to survival and apoptotic conditions in cerebellar granule cells. *J Biol Chem*, 2005; 280: 35157–35163.

Vahip S. Duygudurum düzenleyicileri: Lityum, Karbamazepin, Valproat, Güleç C, Köroğlu E, Psikiyatri Temel Kitabı. Cilt 21.Baskı ,Ankara Hekimler Yayın Birliği, 1998:995-1018

Wei H, Leeds PR, Qian Y, Wei W, Chen R, Chuang D. beta-amyloid peptide-induced death of PC 12 cells and cerebellar granule cell neurons is inhibited by long-term lithium treatment. *Eur J Pharmacol*. 2000 Mar 31;392(3):117-23.

Xiong N, Jia M, Chen C, Xiong J, ve ark., Potential autophagy enhancers attenuate rotenone-induced toxicity in SH-SY5Y. *Neuroscience*. 2011 Dec 29;199:292-302.

Xu J, Culman J, Blume A, Brecht S, Gohlke P. Chronic treatment with a low dose of lithium protects the brain against ischemic injury by reducing apoptotic death. *Stroke*. 2003 May;34(5):1287-92. Epub 2003 Apr 3. PubMed PMID: 12677021.

Yan XB, Hou HL, Wu LM, Liu J, Zhou JN. Lithium regulates hippocampal neurogenesis by ERK pathway and facilitates recovery of spatial learning and memory in rats after transient global cerebral ischemia. *Neuropharmacology*, 2007; 53(4):487-95.

Yang W, Castiglioni TC, Koh HC, Son IH, Paraquat activates the IRE1/ASK1/JNK cascade associated with apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells, *Toxicology Letters*, 2009;191: 203–210.

Yazlovitskaya EM, Edwards E, Thotala D, Fu A, Ususky KL, Whetsell WO Jr., Shinohara ET, Hallahan DE: Lithium treatment prevents neurocognitive deficit resulting from cranial irradiation. *Cancer Res*, 2006; 66: 11179–11186.

Youdim MB, Arraf Z. Prevention of MPTP (N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine) dopaminergic neurotoxicity in mice by chronic lithium: involvements of Bcl-2 and Bax. *Neuropharmacology*. 2004 Jun;46(8):1130-40.

Yong Y, Ding H, Fan Z, Luo J, Ke ZJ. Lithium fails to protect dopaminergic neurons in the 6-OHDA model of Parkinson's disease. *Neurochem Res*. 201; 36(3):367-74.

Young W, Tiffany-Castiglioni E, Paraquat-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: involvement of p53 and mitochondria, *J Toxicol Environ Health A*. 2008;71(4): 289-99.

Zhang X, Heng X, Li T, Li L, Yang D, Zhang X, Du Y, Doody RS, Le W. Long-term treatment with lithium alleviates memory deficits and reduces amyloid- β production in an aged Alzheimer's disease transgenic mouse model. *J Alzheimers Dis*. 2011;24(4):739-49. PubMed PMID: 21321394.

Zhong J, Yang X, Yao W, Lee W. Lithium protects ethanol-induced neuronal apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Dec 1;350(4):905-10

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
TELEFON	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
FAKS	0 232 412 22 43
E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	327-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Antimanik İlaçlardan Lityum ve Valproik Asir'in SH-SY5Y Hücre Hattı Üzerinde Koruyuculuğu
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	-
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr.Ayşegül ÖZERDEM Y.L.Öğr.Begüm ALURAL Psikiyatri A.D
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	-		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	-		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2011/31-08	Tarih: 22.09.2011
	Prof.Dr.Ayşegül ÖZERDEM'in sorumlusu Y.L.Öğr.Begüm ALURAL'ın yürütücüsü olduğu "Antimanik İlaçlardan Lityum ve Valproik Asit'in SH-SY5Y Hücre Hattı Üzerinde Koruyuculuğu" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Ph.D.Besti ÜSTÜN (Başkan Yardımcısı)	Ph.D.Yüksek Hemşire	DEU Hemşirelik Yüksekokulu	Kadın	E ☐	H ☒	Kongrelerde
Prof.Dr.Osman AÇIKGÖZ	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Mehtap MALKOÇ	Ph.D.Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksekokulu	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Ph.D.Zuhal BAHAR	Ph.D. Yüksek Hemşire, Halk Sağlığında doktora	DEU Hemşirelik Fakültesi	Kadın	E ☐	H ☒	Kongrelerde
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr. Adnan MENDERES	Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi	DEU Tıp Fakültesi Plastik,Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi A.D.	Erkek	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Servet AKAR	İç Hastalıkları (Romatoloji)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Doç.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Doç.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Doç.Dr.İşıl TEKMEK	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.PhD.Meltem Kutlu GÜRSEL	Hukuk	D.E.Ü Hukuk Fakültesi İdare Hukuku Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E ☐	H ☒	Katılmadı

ÖZGEÇMİŞ

BEGÜM YALÇIN

TC Kimlik No / Pasaport No:	37798647742
Doğum Yılı:	1987
Yazışma Adresi :	GÖZTEPE MAH. 56/2 SK. NO:1 D:6 KONAK 35260 34144 İzmir/Türkiye
Telefon :	232-2855013
e-posta :	yalcinbegum@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	İstanbul Üniversitesi	FEN FAKÜLTESİ	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Lisans	2009

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
---------------	------	-------	-------------	------------	--------------

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Moleküler Biyoloji ve Genetik

PROJE DENEYİMİ

Proje Adı	Kurum	Bütçe	Tarih	Görev	Proje Türü
SARKOİDOZDA TNF GEN POLİMORFİZMLERİNİN ANALİZİ	TÜBİTAK DNA/Doku Bankası-Gen Araştırmaları Laboratuvarı	1500	01.06.2007-20.11.2008	Araştırmacı/Uzman	Kurumsal (BAP v.b.)

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı	
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı	
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı	

Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)			

ÖDÜLLER

Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
------------	------------------	------

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

Diğer yayınlar

Düzenleme Tarihi :23/07/2012