

T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

**LEVETİRASETAM VE NEFİRASETAMIN NB2a HÜCRE
KÜLTÜR HATTINDAKİ ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ertan DARIVERENLİ

Tez Danışmanı

DOÇ. DR. Kamil VURAL

MANİSA, 2016

T.C.

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

**LEVETİRASETAM VE NEFİRASETAMIN NB2a HÜCRE
KÜLTÜR HATTINDAKİ ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ertan DARIVERENLİ

Tez Danışmanı

DOÇ. DR. Kamil VURAL

MANİSA, 2016

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince yetişmemde emeği geçen Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Ercüment ÖLMEZ'e ve öğretim üyemiz Sayın Doç. Dr. Tuğba ÇAVUŞOĞLU'na, uzmanlık eğitimim boyunca ve tez çalışmamda danışmanlık görevini üstlenen, bilgi ve deneyimlerinden istifade ettiğim Sayın Doç.Dr. Kamil VURAL'a sonsuz teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmamda bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım Sayın Prof. Dr. M. İbrahim Tuğlu'ya, laboratuvar çalışmalarımda yardımlarından dolayı Dr. Işıl Aydemir'e ve Araş. Gör. Bedirhan Ay'a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca uzmanlık eğitimim süresince anlayışı ve desteğini ile hep yanımda olan sevgili eşim Esra'ya, aileme, kızlarım Hande ve Melis'e teşekkür ederim.

Saygılarımla

Dr. Ertan DARIVERENLİ

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
İÇİNDEKİLER	II
TABLOLAR DİZİNİ.....	IV
GRAFİKLER DİZİNİ.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
RESİMLER DİZİNİ.....	VII
KISALTMALAR.....	VIII
EKLER DİZİNİ	X
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER... ..	2
2.1. Nöron	2
2.1.1. Arka Kök Gangliyonu (AKG) ve primer duyu nöronları	3
2.1.2. Aksonal Taşıma	4
2.1.3. Akson Hasarı	5
2.1.3.1. Waller dejenerasyonu	6
2.1.3.2. Aksonal dejenerasyon	6
2.1.3.3. Segmental Demiyelinizasyon.....	8
2.1.4. Nörodejeneratif hastalıklar ve aksonal taşıma	8
2.2. Nörodejeneratif Hastalıklar	9
2.2.1. Alzheimer Hastalığı	10
2.2.2. Parkinson	15
2.2.3. Amyotrofik Lateral Skleroz	18
2.2.4. Multiple Skleroz (MS)	22
2.2.5. Huntington Hastalığı	25
2.2.6. Spinoserebellar Ataksiler	28
2.2.7. Friedreich Ataksisi.....	28
2.2.8. Frontotemporal Demanslar	29
2.2.9. Prion Hastalığı	31
2.2.10. Kortikobazal Dejenerasyon	32
2.3. Apoptoz	33
2.3.1. Apoptozun Safhaları	36
2.3.2. Apoptoz Morfolojisi	38
2.3.3. Apoptozun Biyokimyasal Özellikleri	39
2.3.4. Apoptozun Oluşum Yolları	40
2.3.4.1. Mitokondriyal yol (Intrinsik)	40
2.3.4.2. Ölüm reseptörleri yolu (Ekstrinsik)	41
2.3.4.3. Endoplazmik Retikulum Aracılı Yol	42
2.4. Klorprifos Ve Nörotoksisite	43

2.5. Pirolidon Türevi İlaçlar	44
2.5.1. Levetirasetam	46
2.5.2. Nefirasetam	49
2.5.3. Nefirasetam, Levetirasetam ve Nöroprotektivite	50
2.6. Nörotoksisite Ve Nöroprotektivite Deneyleri.....	54
2.6.1. Nörotoksisite Tarama Testi	55
2.6.2. MTT Boyama.....	56
2.6.3. TUNEL yöntemi	57
3. MATERYAL VE METOD	58
3.1. Nörotoksite Tarama Yöntemi	58
3.2. MTT Metabolizması	60
3.3. TUNEL Boyaması	61
3.4. İstatistik	63
4. BULGULAR	64
4.1. Nörotoksisite Tarama Testi Sonuçları	64
4.2. MTT Metabolizması Sonuçları	69
4.3. TUNEL Boyama Sonuçları	71
5. TARTIŞMA	74
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	79
7. ÖZET	80
8. SUMMARY	82
9. KAYNAKLAR	83
10. ÖZGEÇMİŞ	100
11. EKLER.....	101

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. TUNEL Boyama Protokolü	63
--	----



GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1: NB2a hücrelerinde ilaçların değişik konsantrasyonlarındaki nörit inhibisyonu üzerine etkisi.....	67
Grafik 2: NB2a hücrelerinde nefirasetamın farklı konsantrasyonlarında nörit inhibisyonu üzerine etkisi.....	67
Grafik 3: NB2a hücrelerinde levetiresetamın farklı konsantrasyonlarında nörit inhibisyonu üzerine etkisi	68
Grafik 4: 25 μ M konsantrasyonda klorprifos uygulanan NB2a hücreleri üzerine levetiresetamın farklı konsantrasyonlarındaki nörit inhibisyonuna etkisi.....	68
Grafik 5: 25 μ M konsantrasyonda klorprifos uygulanan NB2a hücreleri üzerine nefiresetamın farklı konsantrasyonlarındaki nörit inhibisyonuna etkisi.....	69
Grafik 6: Her iki ilacın farklı konsantrasyonlarında MTT metabolizması üzerine etkileri	70
Grafik 7: Nefirasetamın farklı konsantrasyonlarında MTT metabolizması üzerine etkileri.....	70
Grafik 8: Levetirasetamın farklı konsantrasyonlarında MTT metabolizması üzerine etkileri.....	71

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Bir nöronun yapısı	3
Şekil 2: Arka kök gangliyonu anatomisi.....	4
Şekil 3: Alzheimer hastalığının klinik evreleri	12
Şekil 4: Alzheimer hastalığı tarafından etkilenen beyin bölgeleri ve ventriküllerin boyutlarındaki değişiklikler ve sağlıklı beyin dokusu kaybı	13
Şekil 5: Alzheimer hastalığında amiloid plaklar ve nörofibriler yumaklar.....	14
Şekil 6: a) Substantia nigra hücreleri striatuma kadar uzanır b) Salınan dopamin buradaki reseptörlere tutunarak iletim sağlanır	17
Şekil 7: Medulla spinalisteki dejenerasyon	18
Şekil 8: ALS hastalarında glutamate seviyelerindeki artış.....	20
Şekil 9: MS'de görülen plaklar	23
Şekil 10: MS'de zarar gören myelin kılıfları	23
Şekil 11: T hücrelerinin saldırısına uğrayan myelin kılıfı	24
Şekil 12: HH'da bazal gangliyonlardaki dejenerasyon	27
Şekil 13: FTD'da görülen pick hücreleri ve argentofilik inklüzyon cisimleri...	30
Şekil 14: Prion hastalığı etkisi altındaki süngerleşmiş beyin	31
Şekil 15: Apoptotik süreç ve hücrede meydana gelen değişiklikler	38
Şekil 16: İnternal apoptoz mekanizması	41
Şekil 17: Apoptoz gelişiminin genel görünümü	42

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: d-cAMP ile farklılaştırılan NB2a Kültür Hücresi görüntüsü x400...	64
Resim 2: 25 µM klorprifos konsantrasyonu ile NB2a hücrelerinde oluşturulan nörit uzamasının inhibisyonu görüntüsü x400.....	65
Resim 3: 25 µM klorprifos konsantrasyonu ile NB2a hücrelerinde oluşturulan nörit uzaması inhibisyonunun 30 µM konsantrasyonda levetirasetam ile geri döndürülmesi görüntüsü x400.....	66
Resim 4: 25 µM klorprifos konsantrasyonu ile NB2a hücrelerinde oluşturulan nörit uzaması inhibisyonunun 30 µM konsantrasyonda nefirasetam ile geri döndürülmesi görüntüsü x400.....	66
Resim 5. İlaç uygulama sonrası TUNEL görüntüleri	72-73
Resim 6: 25 µM klorprifos konsantrasyonu ile NB2a hücrelerinde oluşturulan nörit uzamasının inhibisyonu görüntüsü x400.....	78

KISALTMALAR

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

MES: Maximal Elektroşok

PTZ: Pentilentetrazol

NTA: Nöropati Target Esteraz

NTT: Nörotoksisite Tarama Testi

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

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

PBS: *Phosphate-buffered Saline*

ANOVA: Tek Yönlü Varyans Analizi

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

HH: Huntington Hastalığı

FTD: Frontotemporal Demanslar

TdT: Terminal deoksinükleotidil transferaz

EKLER DİZİNİ

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu Karar Formu.....101



1. GİRİŞ

Günümüzde sıkça görülen Nörodejeneratif bozukluklar beynin spesifik bölgelerindeki nöronların progresif ve irreversibl kaybı ile karakterize bir grup patolojiye neden olmaktadır. Bu hastalıkların tedavisi genellikle semptomatiktir. Kısa süreli semptomlar giderilir. Ancak hastalığın progresyonu devam eder. Yaş artıkça bu hastalıkların görülme oranı da artar. Bu nedenlerle nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde yeni yaklaşımlar aranmaktadır. Son yıllarda bu hastalıkların tedavisinde pirolidon türevleri grubu içerisinde yer alan; levetirasetam ve nefirasetam bu hastalıkları tedavisinde nöroprotektif oldukları öne sürülerek kullanılmaya başlanmışlardır. Bu ilaçlardan levetirasetam antiepileptik, nefirasetam ise nootropik özellikleriyle ön planda olmalarına rağmen nöroprotektif etkileri olduğu ve bu yüzden bu ilaçların nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılması gerektiğini öneren çalışmalar yayınlanmıştır. Ancak birkaç çalışmada ise bu ajanların az da olsa olası nörotoksik etkileri olabileceği belirtilmiştir.

Bu çalışmada temel olarak antiepileptik ve nootropik kullanım alanları olan levetirasetam ve nefirasetamın fare nöroblastoma hücre dizininde (NB2a) nörotoksisite tarama testi ile nörotoksik veya nöroprotektif etkilerini görmek için uygulanan konsantrasyonlarda nöronlar üzerindeki etkileri, çoğalma ve ölüm gibi davranış mekanizmaları, in vitro olarak araştırılmıştır. Nörotoksisitesi yoksa nörotoksisitesi bilinen ve organofosfatlı bir insektisit olan klorprifos kullanılarak NB2a hücrelerinde nörotoksik hasar oluşturularak levetirasetam ve nefirasetamın bu nörotoksisiteyi önleyici veya geri döndürücü muhtemel etkileri gözlenmeye çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

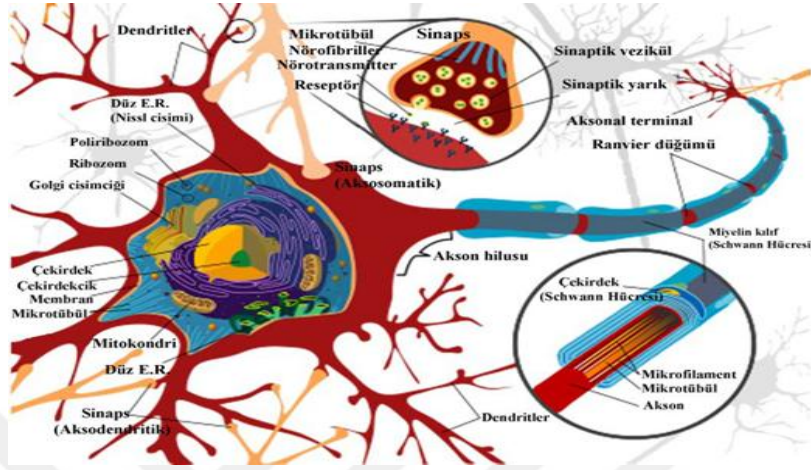
2.1. NÖRON (Sinir Hücresi)

Sinir sistemi anatomik olarak merkezi sinir sistemi ve periferik sinir sistemlerinden oluşmaktadır. Merkezi sinir sistemi: beyin, omurilik ve gözün sinir ile ilgili kısımlarından oluşurken; periferik sinir sistemi: periferik ganglionlar, sinirler, gangliyonları merkezi sinir sistemine bağlayan sinir uçları, reseptörler ve vücudun efektör yapılarından oluşur. Sinir sisteminin işlevsel birimleri, nöron veya sinir hücresi olarak adlandırılan uyarılabilme yeteneğine sahip son derece özelleşmiş hücrelerdir. Bu hücreler de genel olarak soma veya hücre gövdesi, dendritler ve akson olmak üzere üç bölümden oluşur (1).

Bütün nöronlar, onları diğer doku hücrelerinden farklı kılacak genel özelliklere sahiptirler. Nöronlar tipik olarak yüksek derecede polarize durumdadırlar. Elektriksel sinyalleri işleyebilmek için hücre fonksiyonları kısımlara ayrılmıştır. Hücre gövdesi olarak adlandırılan perikaryon, genellikle toplam hücre hacminin onda birinden daha az kısmını oluşturur. Ayrıca gövde, nukleus ve diğer hücre organellerini içerir. Nöronun diğer kısımlarını oluşturan dendritler ve akson, hücre gövdesinden çıkan uzantılardır. Dendritler çok sayıda ince dallara ayrılan diğer nöronlardan sinaptik bilgileri almak için özelleşmiş yapılardır (Şekil 1).

Akson ise elektriksel uyarıları yayan, genellikle uzak mesafelere ulaşan diğer bir sinir hücresi ya da hedef organla nöronu sonlandıran tek özelleşmiş uzantıdır. Nöronların hücre membranındaki iyon kanalları ve pompaları yardımıyla hücrenin içi ve dışı arasındaki anlık iyon değişimleri sonucu elektriksel potansiyelin hızlı bir şekilde değişmesi mümkündür. Nöronlarda polarite ve uyarılabilme özellikleri uzun mesafeler boyunca sinyallerin alınması, iletilmesi ve işlenmesini sağlayacak şekilde gelişmiştir. Hücre gövdesinden çıkan uzantı sayısına göre nöronlar multipolar, bipolar,

psödounipolar ve unipolar olmak üzere dört gruba ayrılırlar. İşlevlerine göre ise duyu, motor ve internöronlar olmak üzere üç gruba ayrılırlar (2).

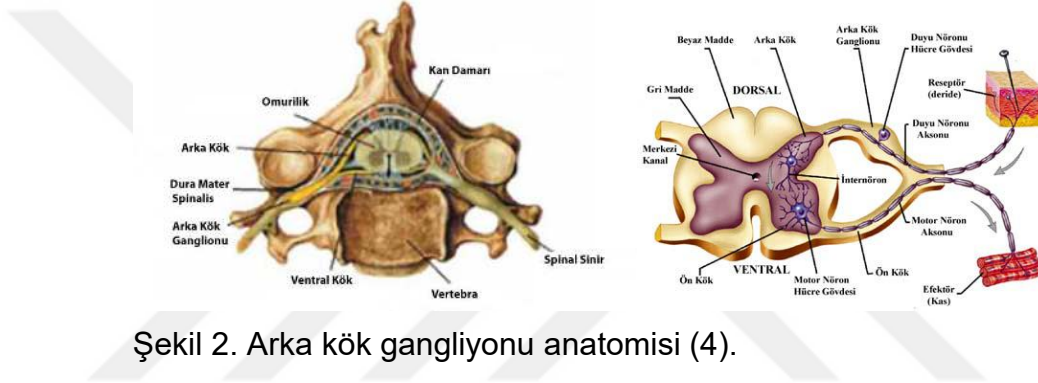


Şekil 1. Bir nöronun yapısı (4).

2.1.1. Arka Kök Gangliyonu (AKG) ve primer duyu nöronları

Omurilik dorsal ve ventral boynuzlarından, arka (dorsal) ve ön (ventral) köklerden oluşur. Bu kökler, omurilikten ve omuriliğe doğru uzanan sinir lifleri taşırlar. Arka kökler omuriliğe duyu (afferent) lifleri, ventral kökler omurilikten motor (efferent) lifleri taşırlar. Yan taraflarda ise her bir intervertebral deliğe yakın bir şekilde yerleşmiş bir dorsal kök içinde çok sayıda dorsal kökçük, ventral kök içinde ise çok sayıda ventral kökçük birleşmiş durumda bulunmaktadır. Bu kökler sonra intervertebral foramen içinde vertebral kanallarda uzanarak ayrılırlar. Burada arka ve ön kökler duyu ve motor fibrillerin her ikisini taşıyan spinal siniri oluşturmak üzere birleşirler. Omuriliğe lateralden, ön kökle ortadan birleşen bir arka kök, intervertebral foramina içinde kıvrılır ve bu arka kök ganglionudur (Şekil 2.2). Gangliyon nöron hücre gövdelerinin bir arada bulunduğu yapılara verilen addır. AKG periferik duyu liflerinin gövdelerini içerir. Periferik duyu nöronları nadir ve benzersiz bir yapıya sahiptirler. Periferik duyu nöronları psödounipolar yapıdadır.

Psödounipolar nöron tek aksona sahiptir. Ancak gövdeden çıkan tek akson T şeklinde ikiye ayrılır. Aksonun bir kolu ya özelleşmiş bir yapıda, ya da serbest sinir ucu formunda bir reseptör yapısı oluşturur (Meissner kapsülü ya da Paccini kapsülü gibi). Bu reseptörler deri, deri altı dokular, derin dokular ya da iç organlara yerleşmiştir. Aksonun diğer ucu ise merkezi sinir sistemi ile ilişkilidir. Bu nöronlar genellikle duyu sonlanmalarından aldıkları mesajları merkezi sinir sistemine iletirler (Şekil 2). Dolayısıyla bu nöronlara duyu nöronları adı da verilmektedir.



Şekil 2. Arka kök gangliyonu anatomisi (4).

Hücre gövdesi metabolik fonksiyonları yerine getirir ve 10-50 μm büyüklüğündedir. Hücre içinde endoplazmik retikulum ve üzerinde Nissl cisimcikleri bulunmaktadır. Çekirdek içinde belirgin bir çekirdekcik vardır. Arka kök gangliyonları yan yana 10-20 μm büyüklüğünde, en fazla 50 μm büyüklüğünde hücre gövdelerinin bir araya gelmesinden oluşur. AKG nöronları küçük satellit hücreleri tarafından çevrelenir (3).

2.1.2. Aksonal Taşıma

Nöronlar hücre dışıyla içi arasında aksonlarla ve dendritlerle bilgi alışverişini sağlamak için polarize durumdadırlar. Bu polarize yapı, fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri için gereklidir. Polaritenin oluşumundan, birçok protein ve hücrenin sitoskelet elemanlarının nitelikleri ve dağılımları

sorumludur (5). Nöronların hücre iskeleti yapısını oluşturan önemli elemanlarından biri olan nörofilamentler aksonlara mekanik destek ve kararlılık sağlar. Nörofilamentlerin moleküler ağırlıklarına göre NF 68 (hafif zincir), NF 160 (orta zincir) ve NF 200 (ağır zincir)'den oluşan bir heteropolimer oldukları bilinmektedir (6,7). Hücre iskeleti yapısını oluşturan diğer önemli elemanlarından biri mikrotübüllerdir (8,9). Aksonal taşıma gerçekleşirken mikrotübüller bir ray gibi iş görürler. Mikrotübüller α , β tübülün heterodimerlerinden oluşan tüp benzeri yapılardır. On üç adet paralel bir şekilde dizilmiş protofilament mikrotübül duvarını oluşturur. Aksonlarda mikrotübüller daha hızlı büyüyen artı uç ve daha yavaş büyüyen eksi uç olmak üzere polarize durumda uzanır (10).

2.1.3. Akson hasarı

Periferik sinir sistemi hasarları önemli derecede fonksiyon kaybına ve devam eden günlük olayların aksamasına neden olur. Rejenerasyon ve reinnervasyon gerçekleşse de bazen kalıcı olarak hasar görmüş duyu ve motor nöronlar, nöropatik ağrı gibi ikincil problemler yüzünden önemli fonksiyon kayıplarına yol açabilirler (11,12).

Sinir hasarlarından sonra meydana gelen iyileşme ya da adaptasyon üç yoldan biriyle olur:

- a) Hedef dokular hasarlı aksonların rejenerasyonu ile tekrar innerve olması.
- b) Yakınlarda bulunan hasarsız aksonların kolleteral dalları ile tekrar innerve olması.
- c) Kaybolmuş fonksiyonlar ile ilgili sinir sistemi devrelerinin tekrar şekillenmesi (13).

Periferik sinir hasarları sonrasında kesilmiş aksonların rejenere olması ve fonksiyonel bağlantılarını tekrar kurabilmesi canlının yaşı, etkilenen sinir

lifi, lezyon yeri, lezyon tipi ve aksonun kat etmesi gereken mesafeye bağılı olarak değişiklik gösterir (14). Genel olarak insanlarda 2 cm'den daha dar boşluk oluşturan sinir yaralanmaları iyileşebilmekte, fakat 4 cm'den daha fazla aralık oluştığında tamirin neredeyse imkansız olduğu kabul edilmektedir (15). Periferik ve merkezi sinir sistemi sinir hasarının sonuçları birbirini ile yakın ilişkilidir; Şöyle ki periferik bir sinir hasarı genellikle merkezi sinir sisteminde önemli ve uzun süreli değişikliklere ve yeni düzenlemelere neden olur (16,17,18). Siyatik sinir hasarından sonra AKG'larda küçük nöronların büyük nöronlara göre %10-30 arasında daha fazla etkilendiği rapor edilmiştir (19,20,21,22,23). Periferik sinir sisteminde başlıca üç dejenerasyon söz konusudur. Bunlar; Waller dejenerasyonu, aksonal dejenerasyon ve segmental demiyelinizasyondur.

2.1.3.1. Waller dejenerasyonu

Periferik sinir liflerinin kopmasıyla sonuçlanan hasarlardan sonra lezyonun distalinde akson ve miyelin kılıfları Waller dejenerasyonu adlı bir süreç içerisinde parçalanır (13). Dejenerasyon retrograd olarak aksonun proksimal sinir güdüğünün kısa bir segmentinde de meydana gelir (24). Dejenerasyonun artıkları Schwann hücrelerinin ve makrofajların işbirliği ile temizlenir (25,26).

2.1.3.2. Aksonal dejenerasyon

Aksonal dejenerasyon, sinir travması, toksik sebepler, inme, glokom, nörodejeneratif hastalıklar ve normal nöron gelişimi gibi farklı sebeplerle ortaya çıkabilir (27). Bu dejenerasyon ya doğrudan periferik sinir hücre gövdesini ya da aksonun bütününe etkiler (28,29). Periferik sinir hücresi hasar nedeniyle canlılığını yitirmişse geri dönüş mümkün değildir. Hasara sebep olan engeller aksonun bütünlüğü bozulmadan ortadan kalkarsa, akson haftalar ya da aylar sonra fonksiyonuna yeniden kavuşabilir (30). Ancak aksonun bütünlüğü bozulmuşsa Waller dejenerasyonu devreye girer (31).

Aksonal dejenerasyonu anlamak için en uygun ve basit model aksonların transeksiyonudur. Transeksiyon sonrası en az üç morfolojik faz gözlemlenir. Akut dejenerasyon fazında aksonun proksimal ve distal kökleri akson kesilir kesilmez etkilenir (32). Ardından distal aksonun morfolojik olarak sağlam kalan kısmının elektiriksel aktiviteye devam ettiği latent faz gelir (33) ve yaralı bölgeden akson iskeleti boyunca hızlı fragmentasyonun olduğu granüler dejenerasyon fazı gelişir (34,35). Bu ardışık olaylar rodent aksonlarında in vitro 12-24 saatte (36,37,38), in vivo 24-48 saatte (39,40) hızlıca tamamlanır. Bazı fizyolojik koşulları değiştirmek bu süreyi değiştirebilir. Örneğin ortam sıcaklığını düşürmek ve ekstrasellüler kalsiyum düzeylerini azaltmak gibi değişiklikler latent periyodu önemli ölçüde uzatır (41, 42, 43).

N-tipi kalsiyum kanal blokörlerinin (L-tipi değil) aksotomiden 4 gün sonraya kadar akson dejenerasyonunu önemli derecede geciktirdikleri gösterilmiştir (41). Bu durum aksonal dejenerasyonun gerçekleşmesi için hücre içi Ca^{+2} düzeylerinde artışın gerekli olduğunu ve bu artışın iyon spesifik kanallar vasıtası ile olduğunu göstermektedir. Fakat yine de hasarlı aksona hangi sinyal ve hangi yönetici unsur ile Ca^{+2} girişi sağlandığı kesin olarak belirlenememiştir. Yapılan bazı çalışmalarda enerji azalması sebebiyle NA/K/ATPaz aktivitesinde azalma veya tetrodotoksin (TTX) duyarlı Na kanallarının sinir hasarı sonucu zarar görmesi sebebiyle hücreye Na^{+} girişinde artışın olabileceği, bunun membranı depolarize edeceğini ve bu durumun voltaj duyarlı Ca^{+2} kanallarını açarak hücre içine Ca^{+2} akışını artırabileceği belirtilmiştir (44).

Hücre içine ekstrasellüler Ca^{+2} akışının yanı sıra hücre içinde de önemli kalsiyum deposu olan organellerden de intrasellüler Ca^{+2} salınımı olduğu bildirilmiştir (45). Bu hücre içi depoların boşalması ekstrasellüler kalsiyumun hücre içi akışı ile tetiklenebileceği gibi direk sinir hasarının bir sonucu olarak da gerçekleşiyor olabilir. İstisna olarak mitokondri seçici uniporter taşıma sayesinde sitozolik Ca^{+2} seviyelerini tamponlayabilir (46, 47). İskemik sinir hasarlarında kalsiyum, ryanodin ve IP(3) reseptörleri vasıtasıyla endoplazmik retikulumdan salınır (48, 49). Aksotomi durumunda

proksimal aksondaki endoplazmik retikulumun tüm kalsiyum rezervi hızla boşalır (50). Yapılan tüm bu çalışmalar akson hasarında hasarın büyüklüğü, oluşum hızı gibi parametrelerin önemli şekilde Ca^{+2} bağımlı olduğunu göstermektedir.

2.1.3.3. Segmental Demiyelinizasyon

Miyelinli sinir liflerinde, periferik sinir aksonunda bir hasar olmaksızın etrafındaki Schwann hücrelerinde veya miyelin kılıfta meydana gelen hasardır (51). Miyelin yenilenebilen bir kılıftır. Demiyelinizasyon etkeni ortadan kalktığında, demiyelinizasyonu takiben 15 gün ile 6 ay arasında remiyelinizasyon tamamlanabilir. Bununla birlikte remiyelinize olan segmentlerde miyelin, öncekine göre daha ince ve internodal aralıklar daha kısadır (51).

2.1.4. Nörodejeneratif Hastalıklar ve aksonal taşıma

İlk yıllardan itibaren çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda aksonal taşımanın bozulmuş olabileceği düşünülmüştür (52, 53). Diyabetik nöropatiden, Amiyotrofik Lateral Skleroza (ALS), Alzheimer hastalığından Huntington hastalığına kadar pek çok bozuklukta aksonal taşıma kusurları gösterilmiştir (28, 54). Nörodejeneratif hastalıklarda nöron kaybı altında yatan hücresel ve moleküler mekanizmalar tam olarak açıklanamamıştır. Nörodejeneratif hastalıkların gelişmesinin sebeplerinden birisinin de aksonal taşımada meydana gelen bozukluklar olduğu belirlenmiştir (55). Aksonal taşımada görevli olan motor proteinlerdeki mutasyonlar aksonal taşıma bozukluklarına sebep olmaktadır. Anterograd taşımada görevli motor protein kinesinde meydana gelen mutasyon, kinesinin fonksiyonunun bozulmasına, dolayısıyla nörodejenerasyonun uyarılmasına sebep olur. Retrograd taşımada görevli motor proteindeki nokta mutasyonlar ya da delesyonlar dynein fonksiyon bozukluklarına sebep olur (54). ALS, Huntington gibi hastalıklarda aksonal taşımada yavaşlama görülmüştür (56). Çeşitli seviyelerde retrograd aksonal taşıma değişiklikleri (56). Protein agregatların olduğu karakterize edilmiş ALS, Huntington ve Alzheimer hastalıklarında

bu agregatların motor proteinin ayrılmasına sebep oldukları belirlenmiştir. Süperoksit dismutaz (SOD1) mutant agregatları ve Huntingtin proteinlerinin hem dynein hem de kinesin motor proteinleri yakaladıklarına dair kanıtlar bulunmaktadır (57, 58).

Aksonal taşımayı düzenleyen mikrotübüllerdeki tübülün ünitelerin tirozinasyonu, asetilasyonu gibi modifikasyonlarda aksonal taşımayı etkiler (59, 60). Kargonun motor proteine bağlanmasını sağlayan adaptör proteinlerde meydana gelecek bozukluklar nörodejeneratif hastalıklarda belirlenmiştir. Örneğin Charcot Marie Tooth hastalığında endozomların motor proteine bağlanmasında görevli olan adaptör proteindeki mutasyon, ALS hastalığında GTP düzenleyen adaptör proteindeki mutasyon, aksonal nöropati sebebidir (61, 62). Mitokondrilerin ihtiyacı olan yerlere iletilmemesi sonucu oluşan enerji ihtiyacı ve mitokondrial transportta meydana gelen problemlerde çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda gözlenmiştir (63). Özellikle nöronlar gibi postmitotik hücrelerde toksik madde birikimini önlemek ve yaşlanmış organel ve protein agregatlarını parçalamak için makrofaji önemlidir. Nöronlarda otofagozom oluşumu, Ag5 ya da At7 genleri ile kontrol edilir. ALS, Huntington, Parkinson gibi hastalıklarda otofagozomların taşınımına bağlı olarak birikim gerçekleşir (64, 65). Ayrıca hücrenin hayatta kalmasını sağlayacak ya da apoptoza gitmesine neden olacak sinyal iletimin dengesindeki değişiklik patojenitelerdeki hayati noktadır (56).

2.2.NÖRODEJENERATİF HASTALIKLAR

Nörodejenerasyon, nöronların, yani sinir hücrelerinin, hasarı ve kademeli ölümü olarak tanımlanır; bunun sonucunda ortaya çıkan hastalıklara nörodejeneratif hastalıklar denir. En önemli temsilcileri, Alzheimer, Parkinson, Huntington hastalıkları, ALS ve kalıtsal ataksiler olan nörodejeneratif hastalıklar, gelişmiş ülkelerde kalp-damar hastalıkları ve kanserden sonraki en sık ölüm nedenidir. Oluşum mekanizmaları ve etkin tedavileri henüz bulunamamış olan bu kronik ve ilerleyici seyir gösteren hastalıkların, günümüzde ancak semptomatik tedavileri mümkündür.

Dolayısıyla nörodejeneratif hastalıklar, modern tıbbın çözmeye uğraştığı en önemli hedeflerin başında gelir.

Beynin farklı bölgelerini etkiledikleri için, klinikte ayrı ayrı kimlikleri olan nörodejeneratif hastalıkların, hücre mekanizmaları düzeyinde büyük benzerlikleri vardır. Bu bağlamda, nörodejeneratif hastalıkların incelenmesinde tek bir hastalığa yoğunlaşmaktan ziyade, bu gruptaki birkaç hastalığın etki ve oluşum mekanizmalarını anlamaya çalışmak, nörodejenerasyon süreçlerine panoramik bir bakış açısı kazandırır.

Nörodejeneratif hastalıklarda tedavi, ancak nörodejenerasyon oluşum mekanizmalarının anlaşılması ile mümkün olacaktır. Yakın zamana kadar gerek klinisyenler, gerek araştırmacılar nörodejeneratif hastalıkların oluşum mekanizmasına dayalı bir tedaviye, yani tam sağaltıma, oldukça kuşkululu yaklaşırlardı. Son yıllarda bu kötümser görüş yerini büyük oranda iyimserliğe bırakmıştır. Bunda hücre ve gelişim biyolojisi, model sistemler ve ilaç tedavisindeki gelişmelerin göz ardı edilemeyecek bir etkisi vardır. Ancak nörodejeneratif hastalıklardaki araştırmaya en büyük ivmeyi moleküler genetik alanındaki ilerlemeler, yüksek teknoloji kapsamına giren genomik araştırmalar ve hızla gelişen biyolojik yöntemlerle birlikte canlı dokuların ürettiği elektriksel işaretlerin elde edilmesi ve bu işaretleri işleme tekniklerindeki gelişmelerde hız kazandırmıştır (66).

2.2.1. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer Hastalığı ilk olarak 1906'da Alman psikiyatrist ve nöroanatomist Alois Alzheimer tarafından tanımlandı. Nörodejeneratif bir hastalık olan Alzheimer hastalığı (AH), yaşlılarda en sık görülen demans tipidir. Demans, günlük yaşam aktivitelerinin sürdürülmesini engelleyen ilerleyici, kronik bir beyin hastalığıdır. Bellek kaybı, günlük yaşamın gereksinimleriyle başa çıkabilme yeteneğinde azalma, algılamada, toplumsal davranışların düzenlenmesinde ve duygusal tepkilerin kontrolünde bozulma sık karşılaşılan belirtilerdir. Demans büyük çoğunlukla geri dönüşsüz ve ilerleyici bir durumdur.

Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklar sinsi başlar ve yıllar içinde progresif olarak gelişir. Hasta yakınları geriye baktıklarında, hastadaki unutkanlık gibi erken devredeki hafif semptomların hastalığın ilk habercisi olduğunu fark ederler.

Alzheimer hastalığı yaşlılarda siktir ve unutkanlık yaşlılıkla birlikte artar. Normal yaşlanma ile ortaya çıkan unutkanlık gibi hafif kognitif problemler her zaman ileride Alzheimer hastalığı çıkacağına işaret etmez. Diğer yandan hafif bozuklukları olan birçok kişi Alzheimer hastalığının erken evrelerinde olabilir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, yaşa bağlı normal kognitif değişikliklerle Alzheimer hastalığı arasında bir geçiş döneminin olduğunu göstermiştir. Hafif kognitif bozukluk (HKB), normal yaşlanma ile Alzheimer hastalığı arasındaki klinik durumu tanımlar. Bu kişilerde yaşına göre umulandan daha fazla unutkanlık vardır. Fakat Alzheimer hastalığı tanı kriterlerini karşılamaz. Bugün hafif kognitif bozukluğu olan kişilerin yüksek oranda Alzheimer hastalığına yakalanma riski taşıdığına inanılmaktadır. Bu bakımdan bu kişilerin tanınması, izlenmesi ve tedavisi önem taşır.

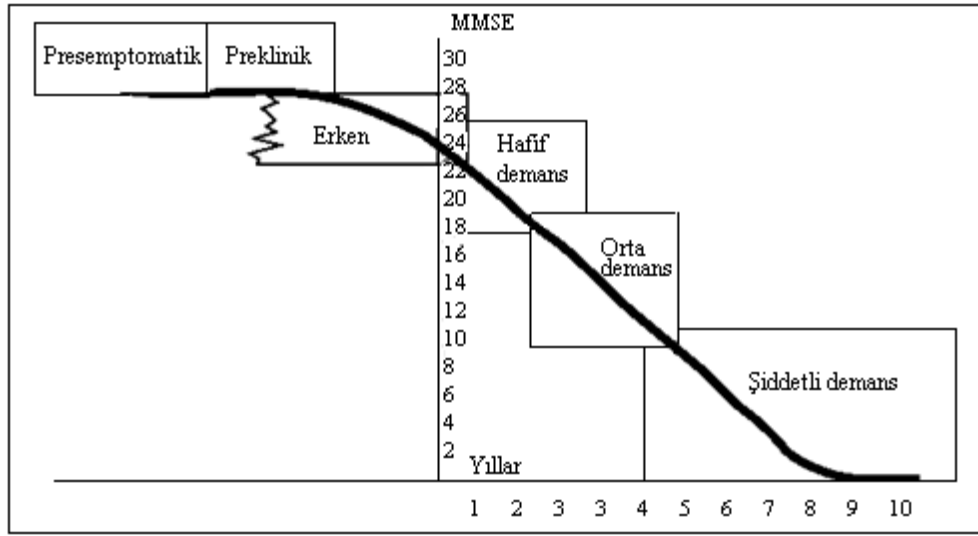
Hafif kognitif bozukluk için klinik kriterler şunlardır:

1. Hasta yakını tarafından da doğrulanan bellek bozukluğu yakınması,
2. Yaşa ve eğitime göre objektif bellek bozukluğu,
3. Genel kognitif fonksiyonların geniş oranda korunmuş olması,
4. Günlük yaşam aktivitelerinin büyük miktarda sağlam olması,
5. Demans bulunmaması.

Bugünkü kanıtlar Alzheimer hastalığına bağlı patolojik değişikliklerin klinik bulgular ortaya çıkmadan 15-20 yıl önce başladığına işaret etmektedir. Alzheimer hastalığı klinik olarak;

1. Preseptomatik dönem,
2. Preklinik dönem,
3. Erken “şüpheli” Alzheimer hastalığı,
4. Hafif Alzheimer hastalığı,
5. Orta dönem Alzheimer hastalığı,
6. Ağır (şiddetli) dönem Alzheimer hastalığı

şeklinde altı gruba ayrılabilir (Şekil 3).



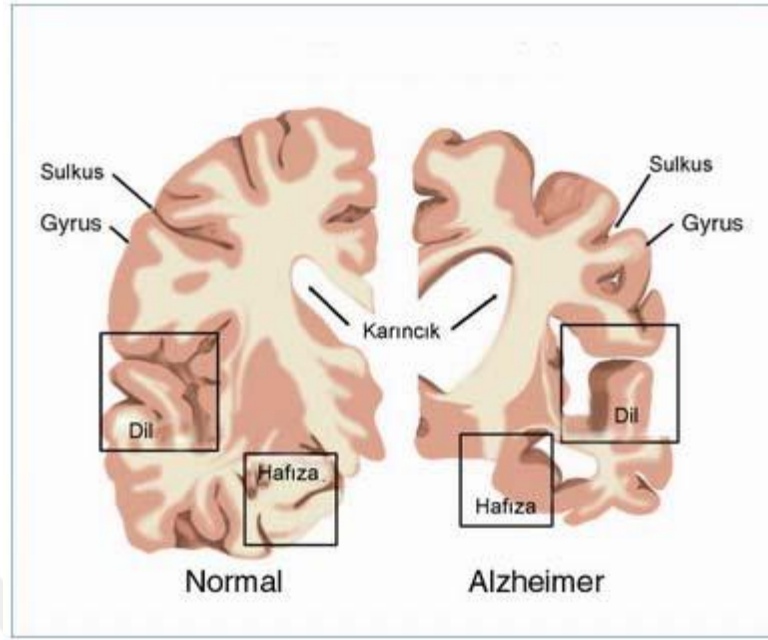
Şekil 3: Alzheimer hastalığının klinik evreleri (67).

Alzheimer hastalığında ortaya çıkan nörodejenerasyonun, hipoksi veya iskemi (düşük oksijen veya düşük kan akışı) gibi, beyine yönelik bir saldırıya karşı immün veya inflamatuvar bir yanıt olduğuna ilişkin iyi kanıtlar vardır.

Alzheimer hastalığında beyindeki dejenerasyonun bir akut faz tepkisini (bedenin genellikle enfeksiyon veya travmaya tepki olarak hızla başlattığı savunma işlemi) uyardığı düşünülmektedir. Bu sitokin denen ve bedenin savunma düzeneklerini uyaran proteinlerde hızlı bir artışa yol açar.

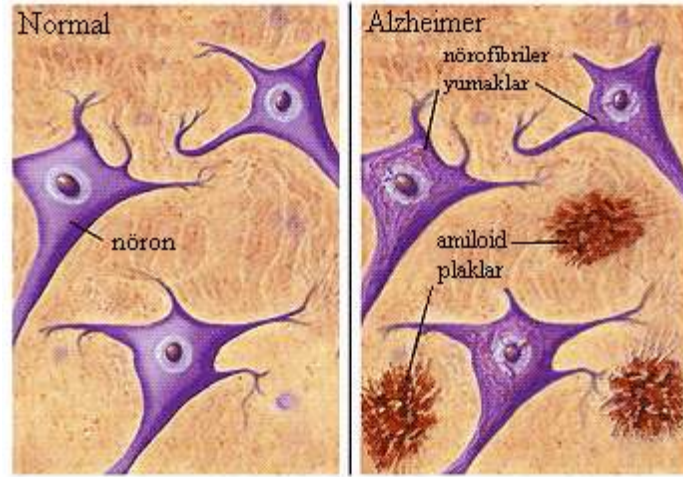
Serbest radikaller de (hücrelere hasar verebilecek ileri derecede reaktif kimyasallar) Alzheimer hastalığında rol oynuyor olabilir. Beden normalde serbest radikalleri, serbest radikal parçalayıcılar adı verilen kimyasal maddelerle 'temizler', ancak Alzheimer hastalığında bu yeti bozulmuş olabilir.

Alzheimer hastalığı beynin yapısında ve işlevinde karakteristik değişikliklerle ilişkilidir. Hastalık sırasında beyinde ortaya çıkan en belirgin yapısal değişiklik büzüşme, küçülmedir. Şekil 4'de gösterildiği gibi karıncıkların (beyindeki boşluklar) boyutları büyür.



Şekil 4: Alzheimer hastalığı tarafından etkilenen beyin bölgeleri ve ventriküllerin boyutlarındaki değişiklikler ve sağlıklı beyin dokusu kaybı (67).

Alzheimer hastalığında anahtar patolojik süreçlerden biri, yoğun protein tortularının (bunlara amiloid veya senil plaklar denir) beyindeki nöronların etrafında birikmesidir. Alzheimer hastalığında plaklar ilk olarak beyinde bellek ve diğer bilişsel (düşünme gibi) işlevler için kullanılan bölgelerde birikir. Amiloid plakların kendilerinin mi Alzheimer hastalığına yolaçtığı, yoksa bunları Alzheimer hastalık sürecinin bir sonucu mu oldukları açık değildir. Amiloid öncül (prekürsör) proteinindeki (APP) bir kusurun (gen mutasyonları, yaşlanma ve diğer çevresel etmenlere bağlı olarak) beyinde anormal amiloid birikmesine yol açtığı düşünülmektedir. Nöronların içlerinde nörofibriler yumak adı verilen, çözünmez birbirine dolanmış lifler oluşur. Bunlar, hücrelerin içindeki yapı iskeletlerine benzetilebilecek, sağlıklı nöronların yapısal çerçevesini şekillendiren tau adındaki bir proteinden yapılıdır (Şekil 5).



Şekil 5: Alzheimer hastalığında amiloid plaklar ve nörofibriler yumaklar (67).

Alzheimer hastalığında nöroiletiçi düzeylerinde de kayda değer değişiklikler olur. Bu değişiklikler tedavinin önemli hedefleri olmakla birlikte, büyük olasılıkla Alzheimer hastalığı olan insanların beyinlerindeki daha temel patolojik değişikliklere göre ikincildir. Asetilkolin kolinerjik nöronların nöroileticisidir (kimyasal habercisi). Alzheimer hastalığında ilk dejenere olan bunlardır. Asetilkolin aktivitesindeki azalma, beyinde bazal çekirdeklerdeki hücre kaybına bağlanmıştır. Alzheimer hastalığında asetilkolin sentezi ve yıkımından sorumlu enzimlerin düzeylerinde düşmeler de gözlenmiştir.

Normal koşullarda N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörünü aktive eden glutamat bellek ve öğrenmeyi kolaylaştırmak için kısa, ani salınımlarla salınır. Alzheimer hastalığında glutamat sürekli olarak salınır, bu da kalsiyum (Ca^{2+}) iyonlarının hücre içine girmesine izin verir. Bu bellek ve öğrenme süreçlerini sekteye uğratar ve sonunda hücre ölümüne yol açar. Alzheimer hastalığında serotonin reseptörlerinin sayısı azalmıştır, bu da duygu durum değişikliklerine yolaçabilir (67).

2.2.2. Parkinson Hastalığı

Parkinson Hastalığı (PH) dünya toplumlarında görülen ikinci en yaygın nörodejeneratif hastalık olup, hareket bozuklukları kategorisinde ise görülme sıklığı açısından birinci sıradadır. Parkinson Hastalığının görülme sıklığı 65 yaş üzeri popülasyonda %2'dir ve yaş ile birlikte artış göstermektedir; bu özelliği de Parkinsonun yaşlanma ile doğrudan ilintili bir hastalık olduğu gerçeğini ortaya koymaktadır.

Parkinson, genellikle 50 yaşından sonra ortaya çıkan, nadiren 40 yaşın altında beliren, yavaş ilerleyen bir klinik tablodur. Parkinsondaki en önemli belirtilerden birisi istirahat halinde görülen tremor yani titremedir. En çok ellerde görülür, tremor genellikle saniyede 3-7 vuruşlu olup bir amaca yönelik hareket esnasında ve uykuda; Örn. bir bardağı tutmak için uzanıldığında kaybolur. Parkinsonda görülen bu titreme çeşidi elektroensefalografi (EEG), elektromiyografi (EMG) etkileşiminin açıkça gözlemlendiği en önemli klinik belirtilerden biridir.

Parkinsonda diğer önemli bir belirti kas tonusundaki artmadır. Bu nedenle hastada bir katılaşma vardır. Hastaya pasif bir hareket yaptırılmak istendiğinde bir dirençle karşılaşılır.Örneğin hastanın bükülmüş kolu dirsekten açılmaya çalışıldığında zaman karşılaşılan direnç nedeni ile hareket zorlaşır. Buna dişli çark arazi adı verilir.

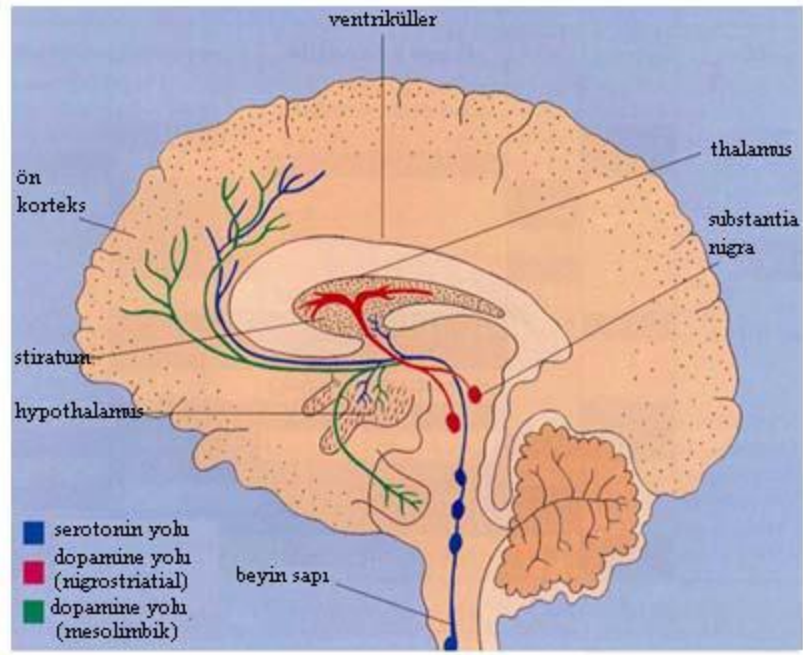
Diğer önemli bir belirti hareketlerdeki genel yavaşlamadır. Yürüyüş küçük adımlarla, kolları sallamadan ve vücut öne eğik (antefleksiyon postürü) pozisyonundadır. Bunlara ilave olarak mimiklerde azalma, monoton ve kısık sesle konuşma ve oturup - kalkma güçlüğü de hastalığa eşlik eder. Her vakada rastlanmamakla birlikte hipersalivasyon (salya artımı), sebore (ciltte ve saçlı deride yağlanma, pullanma), konstipasyon (kabızlık) sık görülen; empotans, enkontinans (idrar kaçırma), ortostatik hipotansiyon seyrek görülen otonom sinir sistemi belirtileridir. Depresyon ve ileri devrelerde demans (bunama) görülür. Hastalık tablosu hastadan hastaya değişir. Bazen

hastalık uzun yıllar sadece tremor ve adalelerde kasılma ile birlikte seyreder. Bu tablonun adı Hemiparkinsonizm'dir. Bazı durumlarda tremor olmaksızın hareketlerde yavaşlama, adalelerde katılaşma ve duruş bozukluklarının ön planda olduğu ve daha hızlı ilerleme gösteren vakalara rastlanır.

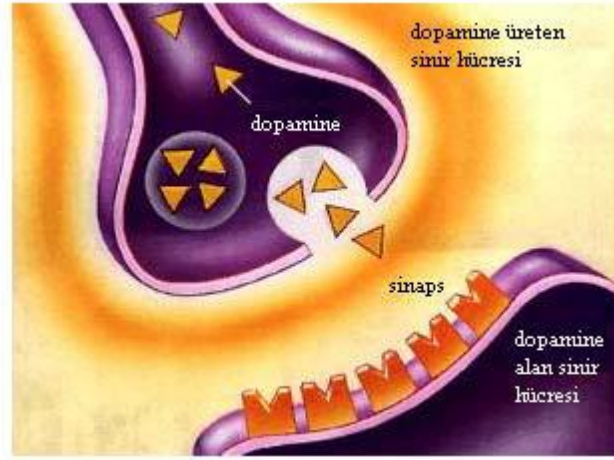
Parkinson hastalığı primer olabildiği gibi başka nedenlere bağlı olarak da gelişebilir;

- Posttravmatik (travma sonrası),
- Sinir sistemini etkileyen bazı ilaçlar sebebiyle,
- Arterioskleroza bağlı olarak,
- Toksik etkenler yüzünden,
- Ansefalit (beyin iltihabı) sonrası.

Parkinson hastalığında beynin derin kısmında yer alan kara çekirdekteki (substansiya nigra) (Şekil 4) dopamin adlı kimyasal maddeyi üreten sinir hücreleri hasara uğrar ve eksilir. Bu hücrelerin hasara uğramalarının nedeni bugün için hala bilinmemektedir. Bunun rasgele bir durum olmadığı ve damar sertliği, zayıf kan dolaşımı, iltihabi ya da mikrobik kökenli değişikliklerden ileri gelmediği açıkça bellidir. Henüz keşfedilmemiş bazı maddelerin eksikliğinin ya da bilinmeyen bir toksinin bu hücre hasarından sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür. Bu hücrelerin uzantıları "striyatım" (çizgili cisim) adı verilen bölgelerdedir ve burada yer alan reseptörlere, salınmış olan dopamin bağlanır ve bilgiyi bir sinir hücresinden diğerine iletir. Beyinde yeterli dopamin yapılamadığı için uzuvlarda istirahat halindeyken titreme, kas sertliği, hareket yavaşlığı ve duruş bozukluğu ile şekillenen Parkinson belirtileri ortaya çıkar. Semptomlar ortaya çıkmadan önce substansiya nigradaki dopaminerjik nöronların yaklaşık %60'ı ve striyatumdaki dopaminin ise %80'i kaybolmuş durumdadır (Şekil 6).



(a)



(b)

Şekil 6: a) Substantia nigra hücreleri striatuma kadar uzanır. b) Salınan dopamin buradaki reseptörlere tutunarak iletim sağlanır.

Parkinson dopamin adı verilen sinir sistemi için gerekli olan maddenin düzeyinin düşmesi ile ortaya çıkan bir hastalık olduğu için tedavide de bu maddenin yerine konması prensibine bağlı medikal tedavi uygulanmaktadır.

Ancak Stereotaktik Talamotomi adı verilen bir yöntemle cerrahi tedavi de söz konusu olabilmektedir (68, 69).

2.2.3. Amyotrofik Lateral Skleroz

Amyotrofik lateral skleroz (ALS), beyin kabuğu, beyin sapı ve omurilikteki motor nöronların özgün ölümü ile tanımlanan bir hastalıktır. ALS adı bir taraftan kas atrofisine öte yandan yan kordon yani piramidal yolun tutuluşuna işaret eder. Motor nöron hastalığı ile kastedilen hem birinci (piramidal yol) hem de ikinci motor nöronun tutuluşudur. Gerçekten hastalığın belirtileri, başlıca birinci ve ikinci nöronun tutuluşuna ait olanlardır. İkinci nöron tutuluşu kraniyal çekirdeklerin ve medulla spinalisteki önboynuz hücrelerinin dejenerasyonu nedeniyledir (Şekil 7).



Şekil 7: Medulla spinalisteki dejenerasyon

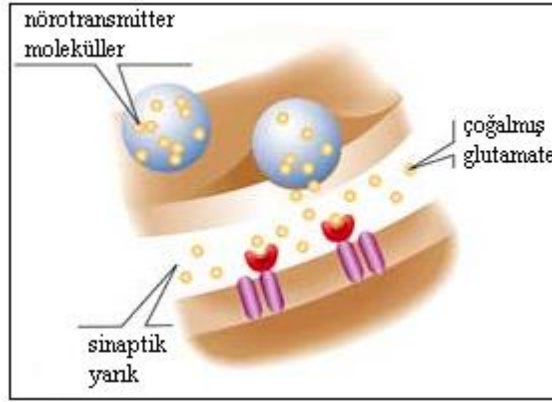
Nöron ölümlerinin sonucunda, vücuttaki istemli kaslar güçsüzleşir ve istemli kaslardaki güçsüzlük genel bir felçle sonuçlanır. Çoğunlukla, seksüel, bilişsel ve duysal işlevler korunur. Kaslardaki zayıflık ellerde ya da bacaklarda, ağız-yutak bölgesinde ya da dilde başlayabilir ve sürekli ilerleyerek yayılır. Bu yayılma "bulber" alandaki kasları da tutabileceği için konuşma ve yutma gücüne neden olabilir. İleri evrelerinde solunum yetersizliğine de yol açabilir.

ALS, ailesel ve seyrek olmak üzere ikiye ayrılır. Ailesel ALS'nin nedeni genetik faktörlerdir. Toplam ALS vakalarının hemen hemen %5-10'u bu türdendir. Bu vakalarda vücutta bulunan 'Süper oksit dismutaz' (SOD1) enziminin mutasyonu sonucu bakır-çinko bağımlılığından çıkması ve serbest radikallere yönelmesi sorunları görülür. ALS vakalarının yaklaşık %90-95'lik kısmı seyrek türden ALS'dir. Bu türde hastalıkta kalıtsal bir neden yoktur. Fakat daha sonraları bunun nedeninin de bir tür mutasyon olduğu öğrenilmiştir.

ALS'nin tam olarak nedeni bilinmemektedir. Fakat bilimadamlarının 1993 yılında, Cu/Zn superoksit dismutaz (SOD1) enzimini üreten genlerde mutasyonun olmasını keşfetmeleri ile önemli bir aşama kaydedildi. Bu enzimin önemi, bazı şartlarda (yaklaşık olarak %20 oranında) ALS'de etkili olmasıdır. Enzim, vücudun zehirli serbest radikaller olan superoksitlerden zarar görmesini engelleyen kuvvetli bir antioksidandır. Serbest radikaller, hücrede normal metabolizma sırasında üretilen yüksek derecede reaktif olan moleküllerdir. Bu moleküller, DNA'ya ve hücre içi proteinlere zarar verebilirler. Henüz SOD1 enziminde olan mutasyonun nöron dejenerasyonunu nasıl etkilediği tam net olarak anlaşılamasa da araştırmacılar serbest radikal birikiminin bu genin çalışmasında sorunlar yaratabileceği teorisini ortaya sürmüşlerdir.

Hastalık üzerine yapılan çalışmalar ayrıca motor nöron dejenerasyonunda glutamatın rolünü belirlemeye de yoğunlaşmıştır. Glutamat nörotransmitter madde adı verilen mesaj taşıma görevi olan kimyasal bir maddedir. Bilim adamlarının araştırması sonucunda sağlıklı insanlar ve ALS hastaları arasında yapılan bazı karşılaştırmalarda; kanın plazmasındaki ve omurilik sıvısında bulunan glutamat seviyelerinin, hastalarda daha fazla olduğu görülmüştür. Laboratuvar çalışmaları, ortamda çok fazla glutamat olmasının ve bunun uzun sürmesinin sinir hücrelerinin ölmesine neden olduğunu kanıtlamıştır (eksitotoksisite). Astrositlerin nöronlar tarafından sarılı olan ekstrasellüler sıvıdaki glutamati etkisiz hale

getirememesi, glutmata bağı olan nöro dejenerasyonunun (sinir hücrelerinin bozulması) bir sebebi olarak gösterilmiştir (Şekil 8).



Şekil 8: ALS hastalarında glutamat seviyelerindeki artış.

Vücudun bağışıklık sisteminin normal hücrelere saldırması ile otoimmün sisteminin buna yanıt vermesi de motor nöron dejenerasyonun olası bir nedenidir. Bazı bilim insanları, antikörlerin doğrudan veya doğrudan olmayarak motor nöronların fonksiyonlarını zayıflattığı hakkında bir teori ileri sürmüştür. Buna göre, antikörler beyin ve kaslar arasındaki sinyal iletimini etkilemektedir. Son bulunan bilgilere göre, hastalığın ileri seviyelerinde sinir sisteminin bağışıklık hücreleri olan mikroglia'ların ön plana çıktığı görülmüştür.

ALS'ye dair ilk belirtiler genellikle farkedilmez ya da gözden kaçır. İlk belirtiler, kaslarda seğirme, titreme, kas zayıflığı sonucunda kolların veya bacakların etkilenmesidir. Bu tür belirtilerin zamanla artması sonucunda ALS hastalığı ortaya çıkar. ALS'nin belirtileri sonucunda vücutta hangi kas etkilenmekteyse o kısım ilk olarak zarar görür. Hastaların %75' inde ilk belirtiler, kol ve bacak kaslarında görülmüştür. Bu vakaların bazılarında hastalık önce bacaklardan bir tanesini etkilemiş ve hastalar da bunu ilk olarak yürürken veya koşarken sendeledikleri sonucu keşfetmişlerdir. Bazı vakalarda ise hastalık ilk olarak elleri ve kolları etkilemiştir. Bu tür hastalar da, hastalığı el becerisi gerektiren düğmeye basma, yazı yazma, anahtarlar ile kapı açma gibi basit işleri yapamamaları sonucu fark etmişlerdir. Bu hastalığa

yakalanmış hastaların yaklaşık %25 kadarında daha farklı belirtiler görülmüştür. Bunlardan en önemlisi konuşma zorluğu ve net konuşamamadır. Çiğneme bozuklukları ve dilin hareketinin zorlaşması da izleyen belirtilerdir. Dilin hareketinin sınırlanması sonucunda nefes borusu tıkanabilir ve bundan başka ilerleyen durumlarda da tam anlamıyla konuşma kaybı oluşabilir.

Hastalığın ilk aşamasında kasların etkilenmesinden sonra, ilerleyen aşamalarda hastalığın tüm vücudu etkilediği görülür. Hastaların hareket edememesi, konuşamaması ve sözcükleri telaffuz edememesi (dysarthria), yiyecekleri çiğneyememesi (dysphagia) örnek gösterilebilir. Üst motor nöronlarının hasar görmesi sonucu kaslarda sertleşme (spastisite) ve abartılı refleksler denen hiperrefleksiya durumu görülür. Babinski işareti denen abartı bir refleks de (ayak baş parmağının anormal bir biçimde şişmesi şeklinde olur) üst motor nöronlarının hasar gördüğünü gösterir. Alt motor nöronlarının da hasar gördüğü, kaslarda oluşan zayıflık ve kramp gibi belirtiler sayesinde anlaşılır. Kasların deri altından da istemsiz olarak titremesi de önemli bir belirtidir. Bir hastaya ALS tanısının konması için, hastalarda üst ve alt sinir hücresi hasarlarının başka durumlardan kaynaklanmadığından emin olunmalıdır.

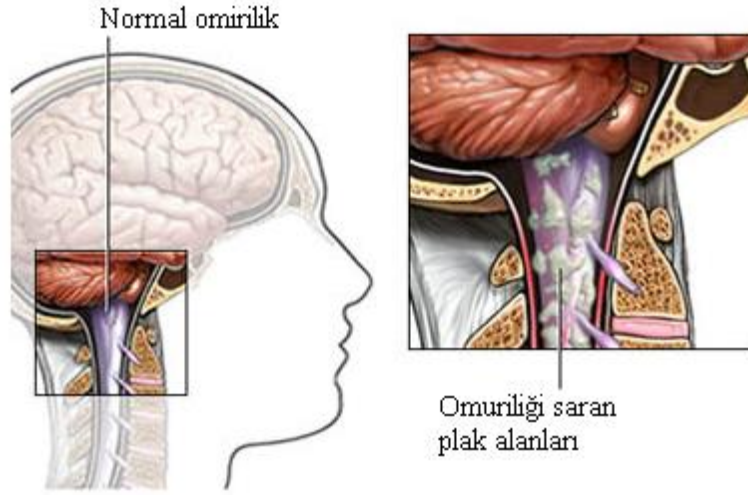
Hastalığın gelişimi ve yayılım hızı kişiden kişiye değişse bile, sonuç olarak hastalığa yakalanan kişiler ayağa kalkamaz veya yürüyemez, yatağa yatıp kendiliğinden kalkamaz veya ellerini ve kollarını kullanamaz. Çiğneme güçlükleri ve çiğneme yeteneğindeki zayıflama sonucu hastaların normal yemek yiyememesi yemek sırasında hastanı boğulma riskini artırır. Sonucunda da kilo problemleri ortaya çıkar. Hastalık her ne kadar bilince ve anlamaya etki etmese bile, bazı vücut fonksiyonlarının zamanla kaybedilmesi ALS hastalarında sinirlilik ve bunalım gibi ruh hali değişikliklerini de beraberinde getirir. Diyafram kaslarının zayıflaması sonucunda bu bölgedeki hava kapasitesi ve basınç azalır. Bazı durumlarda ilk belirti olarak, kol ve bacak kaslarının zayıflaması gibi belirtiler yerine diyafram kasının zayıfladığı da görülür.

ALS hastalığının kesin teşhisinin konulması için bir test bulunmasa da, üst ve alt motor nöronlarından tek bir kol veya bacak kasına gelen sinyaller hastalığın tanısında çok belirleyici olmaktadır. Bu testlerden biri de elektromiyografi (EMG)'dir. Bu yöntem kasların elektriksel aktivitesini kaydeden özel bir tekniktir. EMG'nin kesin sonuçları hastaya tam olarak ALS tanısının konmasında etkili olmaktadır. Bir başka test yöntemi de sinir iletim hızının (NCV) ölçülmesidir. Doktor manyetik rezonans (MR) görüntülenmesi yöntemi testini de isteyebilir. Testin amacı, manyetik alanda radyo dalgalarını hastanın beynine ve omuriliğine göndererek bu bölgeler hakkında ayrıntılı görüntüler almaktır.

Mount Sinai School of Medicine adlı tıp okulunda yapılan ve 2006 yılının şubat ayında Nöroloji adlı dergide yayınlanan bir çalışma ile, ALS hastalarında sağlıklı insanlara göre serebral omurilik sıvısında bulunan üç karakteristik proteinin miktarının kayda değer derecede daha düşük olduğu saptanmıştır. Bu proteinlerin seviyeleri değerlendirildiğinde, bu değerlerin ALS tanısında %95 oranında kesin sonuç verdiği kanıtlanmıştır (Bu üç protein: TTR, kristatinC, ve nöroendokrin protein 7B2'nin karboksil terminal parçalarıdır). Bu proteinler, ALS'nin tanısının doğrulanmasında kullanılan ilk biyolojik yapılardır (70).

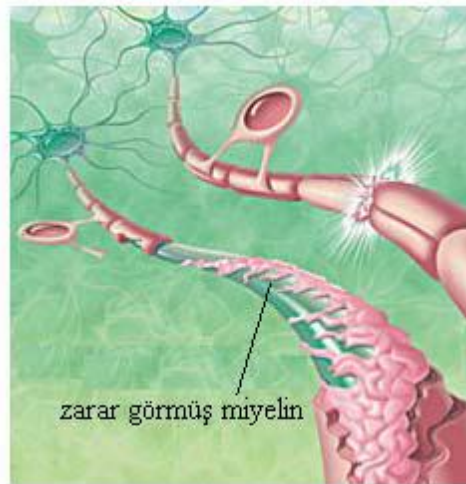
2.2.4. Multiple Skleroz (MS)

Merkezi sinir sisteminin yani beyin ve omuriliğin kronik, inflamatuvar ve demiyelizan hastalığıdır. MS'deki bulgular myelin hasarı nedeni ile oluşur. MS'de çoğunlukla ak maddede plaklar görülür. Plak doku içerisinde oluşmuş bir yara gibi düşünülebilir. Plak, MS'e özgü hasarın olduğu çoğunlukla yuvarlak ya da oval görünümlü sınırlı bir alandır. Plaklar toplu iğne başı küçüklüğünde olabilecekleri gibi, çok ender olarak cm'lerce büyük de olabilirler. Plakların tümü belirti vermez ve kimi zaman sessiz kalıp bulguya yol açmazlar (Şekil 9).



Şekil 9: MS’de görülen plaklar

Başlangıçta MS plaklarının içi kan yolu ile geldiği düşünülen iltihap hücreleri ile doludur. İltihap oluşturan hücrelerin yıkıcı etkisi ile plak bölgesinin içine denk gelen yerdeki myelin giderek yok olur. Bu aşamada myelin kılıfın parçalandığı yerdeki akson korunmasız kalır ki bu duruma demiyelinizasyon (myelin kaybı) denir. Bu aşamada çıplak yani korunmasız sinirlerde iletim aksar ya da kesilir. O sinirlerin ilişkide olduğu beden bölümünde belirtiler oluşur (Şekil 10).

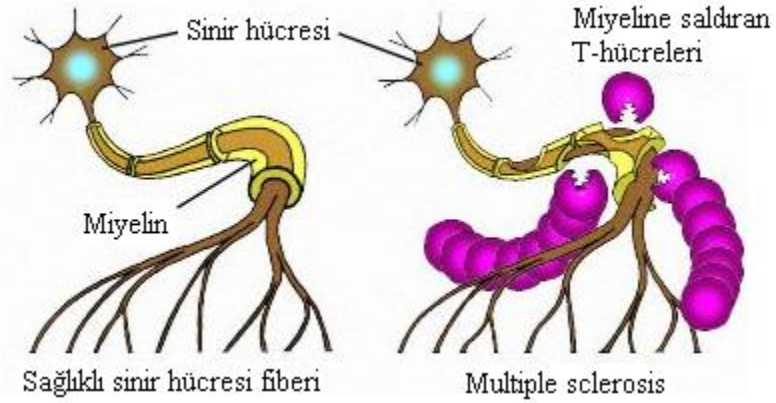


Şekil 10: MS’de zarar gören myelin kılıfları

Yer yer soyularak aksonu çıplak bırakan myelini, oligodentrisitler yeniden yaparak siniri çevrelerler, buna da remiyelinizasyon denir. Bu dönem atağın bittiği, bulguların kaybolduğu ya da azaldığı dönemdir. Ancak yeniden myelin yapımı aslı kadar başarılı olmamaktadır. Dolayısıyla da iletim eskisinden daha yavaş olur.

MS hastalığı en sık 20'li, 30'lu yaşlarda görülür. 40 yaş altı genç erişkinlerde en sık özürnlük yapan nörolojik hastalıktır. Hem kadın hem de erkeklerde ortaya çıkan bir hastalıksa da MS'li kadınların sayısı erkeklerden yaklaşık olarak 2 kat daha fazladır.

MS'nin neden olduğu kesin olarak bilinmemektedir. Ancak genetik bir yatkınlığın varolduğu düşünülmektedir. Ancak MS klasik anlamda genetik bir hastalık değildir. MS' nin bir otoimmün hastalık olduğuna dair de birçok ipucu vardır. Bir virüs ya da bakterinin MS'e neden olduğu düşünülmektedir. Özetle genetik yatkınlığı olan bireylerde çevresel tetikleyiciler ile başlatılan bir dizi otoimmün reaksiyonun MS'e neden olduğu görüşü, bazı noktalarda tam kanıtlanmamış olsa da hala yaygın olarak kabul görmektedir (Şekil 11).



Şekil 11: T hücrelerinin saldırısına uğrayan myelin kılıfı

MS'de duyuşal yakınmalar çoktur. Belirtilerin hiç biri MS'e özgü değildir. Üst ya da alt ekstremitelerde kuvvet kaybı oluşur. Kuvvetin azaldığı bölgede duyu azalması da bulunabilir. Görmeye dair bazı bozukluklar yaşanır. Tek gözde geçici görme azalması ya da kaybı oluşabilir. Bulanık, bulutlu

görme, görme keskinliğinde ve renkli görmede azalma, bakılan yerin bir bölümünü görememe gibi yakınmalar olabilir. Bu duruma optik nörit denir. Optik nörit, göz siniri miyelinin sınırlı bir bölümünün hasarı sonucu gözden beyine iletilen görme sinyallerinin iletiminin aksamasıdır. Optik nörit atağının yaşam boyu tekrarlama olasılığı vardır. Baş dönmesi, dengesizlik, konuşma zorlukları ya da bozuklukları (disfoni), yürüme bozuklukları, yürüme zorluğu görülür. Titreme (tremor) MS'nin oldukça sık görülen bir belirtisidir. İdrar ve bağırsak sorunları MS'de sıktır. MS sık idrar yapma, sıkıştırma, acele etme, idrar kaçırma, hiç tutamama, geldiğini anlamama, tam boşaltamama, yapmaya başlayamama gibi pek çok idrar yakınması olabilir. MS cinsel sorunlar da yaratabilir. Cinsel organlarda bir hasar yaratmaz ancak bu organların denetiminden sorumlu olan beyin bölgesinin ya da omuriliğin etkilenmesi ile belirtiler oluşabilir. MS'li erkeklerde ereksiyon problemi ve erken boşalma görülebilir. MS'de baş ağrısı ve eklem ağrıları görülebilir. Yüzde duyu kaybı, fasiyal kuvvetsizlik oluşabilir. MS'lilerde duygusal durum etkilenebilir. Depresyon oldukça sık görülür. Çok nadir olarak akıl bozuklukları da oluşabilir. Unutkanlık da MS'de sık görülür.

MS tanısı koyduracak özgün bir test yoktur. Manyetik rezonans incelemesi MS tanısında sıkça başvurulmuş bir yöntemdir. BOS incelemesi MS tanısında yarar sağlar.

Başka bazı hastalıklarda olduğu gibi MS'de de hastalığı tümüyle yok edecek kesin bir tedavi şekli yoktur. Bu MS'in tedavisinin olmadığı anlamına gelmez. Doğal gidişini etkileyen ilaçlar vardır. MS'in yarattığı belirtiler tedavi edilebilir. MS atakları kortizonla tedavi edilebilir (71).

2.2.5. Huntington Hastalığı (HH)

Bazal gangliyonlardaki doğrudan veya dolaylı yolların dengesizlikleri sonucu ortaya çıkan Huntington hastalığı veya Huntington koresi genelde korenin baskın olduğu hareket bozukluğu (kore, distoni, parkinsonizm), psikiyatrik bulgular ve demansın eşlik ettiği hereditör nörodejeneratif bir hastalıktır.

Huntington otozomal dominant geçişlidir ve çok büyük oranda ailevidir; yeni mutasyonlar sonucu sporadik vakaların ortaya çıkması çok nadirdir. Huntington çoğunlukla 4. veya 5. dekatta başlar ve kadın-erkek eşit olarak etkilenir. Hastalık yaklaşık %10 oranında 20 yaşından önce (Jüvenil Huntington) ve %10 oranında da 60 yaşından sonra ortaya çıkar.

Huntington'nun klinik bulguları motor, psikiyatrik ve kognitifdir. Erişkin başlangıçlı Huntington genellikle hafif motor koordinasyon güçlüğü veya yerinde duramama ile başlar. Daha sonra belirgin koreik hareketler klinik tabloya hakim olur. Kore hastalığının en belirgin bulgusu olmasına rağmen, parkinsonizm bulguları da hastaların hemen hemen hepsinde görülür. Yürümede güçlük ve düşmeler sıklıktır. Okülomotor bulgular Huntington'nun erken belirtisi olabilir ve hareket bozukluğu olmadan nörolojik muayenede bulunabilir. Sakkadik göz hareketlerinde yavaşlama, göz hareketine başlamada güçlük ve yavaş izleme hareketinde duraksamalar başlıca okülomotor bulgulardır. Dizatri ve disfaji hastalığının ileri basamaklarında görülür, anatriye kadar ilerleyebilir ve aspirasyona sebep olabilir. Terminal dönemde hasta yatağa bağımlı hale gelir. Ölüm aspirasyon pnömonisinden veya diğer tıbbi komplikasyonlardan olur. Bulguların ortaya çıkmasından sonra ölüme kadar geçen ortalama yaşam süresi genellikle 15-20 yıl arasındadır.

Kognitif ve psikiyatrik bulgular hareket bozukluğundan önce görülebilir. Kognitif bozukluk ilk olarak sıklıkla hastanın mental esnekliğinde, reaksiyon hızında azalma ile ortaya çıkar ve ön planda frontal işlev bozukluğu ile karakterizedir. Hastalık ilerledikçe global bir mental yıkım, dolayısıyla demans tablosu gelişir. Huntington'da en sık görülen psikiyatrik bozukluk depresyondur. Bundan başka mani, obsesif-kompulsif bozukluk, irritabilite, anksiyete, ajitasyon, impulsivite ve apati olabilir. Hastalarda intihara da sık rastlanır.

Jüvenil başlangıçlı Huntington (Westphal varyantı) erişkin başlangıçlı hastalıktan birkaç özelliği ile ayrılır. Jüvenil başlangıçlı hastalarda görülen hareket bozukluğu genellikle koreden çok parkinsonizmdir. Kore hastalığının

seyrinde hiç görülmeyebilir. Hastalığın başlangıç bulguları sıklıkla dikkat güçlüğü, davranış ve kişilik değişikliği, okul performansında düşme, distoni, bradikinezi ve bazen de tremordur. Epileptik ataklar ve hızlı seyirli demans da görülebilir. Bu varyantın ölüme kadar geçen hastalık süresi erişkin vakalardan daha kısadır.

Huntington'da en belirgin patoloji kaudat nukleus ve putamende olan atrofidir. Daha az oranda globus pallidus, korteks, talamus ve subtalamura da atrofi görülür. Mikroskopik olarak korteks, kaudat nukleus ve putamende nöron kaybı vardır ve buna gliosis eşlik eder. Striatumdaki orta büyüklükteki dikensi nöronlarda büyük oranda kayıp gözlenir. Nörogörüntülemeye ilerleyici korteks ve kaudat nukleus atrofisi göze çarpar (Şekil 12) .



Şekil 12: HH da bazal gangliyonlardaki dejenerasyon

Huntington'a neden olan 4. kromozomun kısa kolundaki mutasyon, huntingtin geninde normalden fazla CAG trinükleotid tekrarına ve bunun sonucunda da huntingtin proteinindeki glutamin miktarında artışa neden olur. CAG tekrarı 40'ın üzerinde olursa Huntington ortaya çıkar. Patolojik CAG tekrar sayısı normal sınıra yaklaştıkça, hastalığın ortaya çıkış süresi de genellikle uzar. Huntingtin geninin ürünü olan huntingtin proteininin görevi henüz bilinmemektedir. Huntington'un kesin tanısı huntingtin genindeki CAG tekrar sayısındaki artışın gösterilmesi ile konur. Asemptomatik bireyler için prediktif ve prenatal tanı da mümkündür.

Huntington'un tedavisi günümüzde sadece semptomatiktir. Korenin tedavisi için dopamin reseptör blokerleri (haloperidol, pimozid, flufenazin, klozapin, olanzapin, risperidon), benzodiazepinler, dopamin depolarını boşaltan ilaçlar (rezerpin, tetrabenezin) kullanılabilir. Dopaminerjik nörotransmisyonu azaltan ilaçlar hastalığın ileri evrelerinde ve juvenil başlangıçlı hastalarda Parkinsonizmi arttırabileceğinden çok dikkatli kullanılmalıdır. Hastada bradikinezi ve rijitide ağırlıklı ise dopamin yararlı olabilir ancak dopaminin koreyi arttırabileceği de unutulmamalıdır. Psikiyatrik semptomlar için antidepresanlar ve atipik nöroleptikler kullanılabilir (72).

2.2.6. Spinoserebellar Ataksiler

Spinoserebellar ataksiler (SCA) otozomal dominant geçiş gösteren, genetik ve klinik olarak heterojen yapıya sahip bir nörodejeneratif hastalık grubudur. Dünya çapında belli coğrafi bölgelerde yapılan popülasyon çalışmaları, SCA'nın görülme sıklığının 3/100 000 olduğunu gösterir.

SCA'lar yavaş seyreden, geç başlangıçlı hastalıklardır ve temelde denge ve koordinasyon kaybı ile tanımlanırlar. SCA'ların nörolojik bulguları arasında okulomotor ve hareket bozuklukları, piramidal işaretler, kognitif bozukluk, ataklar ve periferik nöropati yer alır. SCA hastalarında beyin MR'ı ile gözlenebilen nörodejenerasyon şekli spinal atrofi, olivopontocerebellar atrofi ve kortikal cerebellar atrofidir. Hastalık başlangıç yaşı değişik SCA alt tiplerine göre değişir. Hastalık genelde 30'lu ya da 40'lı yaşlarda görülür ve ölüm, hastalık başlangıcından 10-20 sene sonra gerçekleşebilir.

2.2.7 Friedreich Ataksisi

Friedreich Ataksisi (FA) ilk olarak, 1863 yılında, Alman doktor Nicholaus Friedreich tarafından tanımlandı. FA otozomal resesif geçiş gösteren spinocerebellar dejeneratif bir hastalıktır ve en sık görülen ataksi çeşididir. FA'ya özgün patolojik bulgular ana duyuşal nöronların dorsal kök gangliyondaki erken kaybıdır.

Bu hastalık genellikle 20 yaşından önce, yürümede yavaş yavaş gelişen bir dengesizlikle başlar. Bağımsız yürümenin kaybına kadar geçen

süre ortalama olarak 10-15 yıldır. Hastalarda ilerleyici ataksinin yanı sıra tremor, baş dönmesi, aşağı ekstremitelerde derin duyu bozukluğu, ekstansör taban derisi cevabı, nistagmus, skolyoz ve kardiyak bulgular olabilir. Aşağı ekstremitelerdeki arefleksi genellikle hastalığın erken evrelerinden itibaren vardır. Hastalığın seyri esnasında dizatri, disfaji, özellikle alt ekstremitedeki kaslarda güçsüzlük ve atrofi gelişir. İleri evrelerde işitme kaybı, görme kaybı ve sfinkter bozukluğu sıktır. Kardiyak bulgular sol ventrikül hipertrofisi, asimetrik septal hipertrofi ve global hipokinezi şeklindedir. Bunların sonucunda aritmiler, kalp yetmezliği ve angina gelişebilir. Hastaların yarısından fazlası kardiyak nedenlerle ölürlür. Hastalığa %10 oranında insuline dirençli diyabet eşlik eder.

Elektrofizyolojik incelemelerde duysal sinir aksiyon potansiyellerinde küçülme saptanır. Nörogörüntülemelerde spinal kord atrofi ve göreceli olarak korunmuş serebellum dikkati çeker. Hastalığın nedeni 9. kromozomun uzun kolunda bulunan Friedreich genindeki mutasyondur. Bu mutasyon sonucunda gendeki GAA tekrar sayısında artma olur ve transkripsiyon mekanizması bozularak mitokondriyal bir protein olan frataksinin işlev kaybına neden olur. Mitokondride bulunan frataksin proteininin, demir-kükürt komplekslerinin biyosentezinde kritik bir görev üstlendiği bilinmektedir.

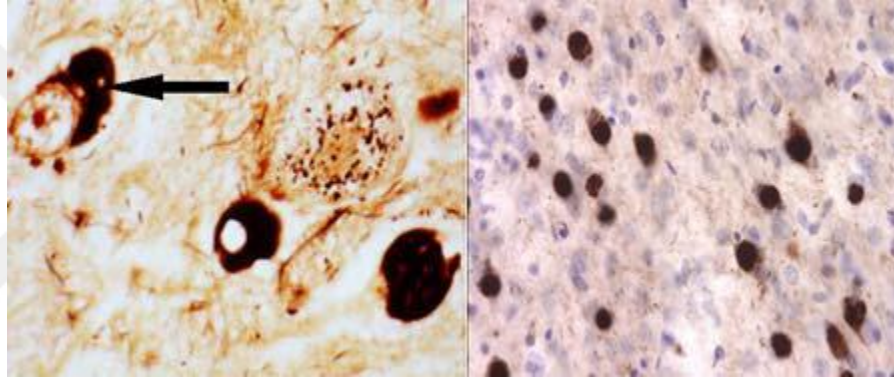
FRDA geninin birinci intronundaki GAA tekrar dizisinin patojenik ekspansiyonu frataksin proteininin eksikliğine yol açar ki, bu da FA'nın başlıca nedenidir. Frataksin transkripsiyon ve ekspresyonundaki azalma, demir-kükürt komplekslerini barındıran proteinlerin azalması ve mitokondride demir birikimi ile sonuçlanır, bu da serbest radikal oluşumunu tetikler. Friedrich ataksisinin geç başlangıçlı ve tendon reflekslerinin korunduğu alt tipleri de vardır.

2.2.8 Frontotemporal Demanslar (FTD)

Frontotemporal demans Alzheimer Hastalığından sonra en sık görülen dejeneratif demans tipidir. Semptomlar presenil dönemde ortaya çıkar.

Sıklıkla familiyaldır. Klinik bulguları oldukça heterojendir. Anatomik lokalizasyona göre başlıca iki klinik tipten söz edilebilir: Esas olarak kişilik değişikliği ve yönetici işlev bozukluğu ile karakterli frontal tip (fv-FTD) ve ilerleyici lisan bozukluğu ile karakterli temporal tip (tv-FTD).

Hastalığın patolojisi ilk kez Alois Alzheimer tarafından 1901'de tanımlanmıştır. Bu tanımlamaya göre hastaların beyinlerinde senil plaklar ve nörofibriler yumaklar olmaksızın akromatik nöronal balonlaşma (Pick hücreleri) ve argentofilik inklüzyon cisimleri görülmektedir. Bu cisimciklerin ubiquitin ve immunoreaktif tau proteini içerdikleri gösterilmiştir (Şekil 13).

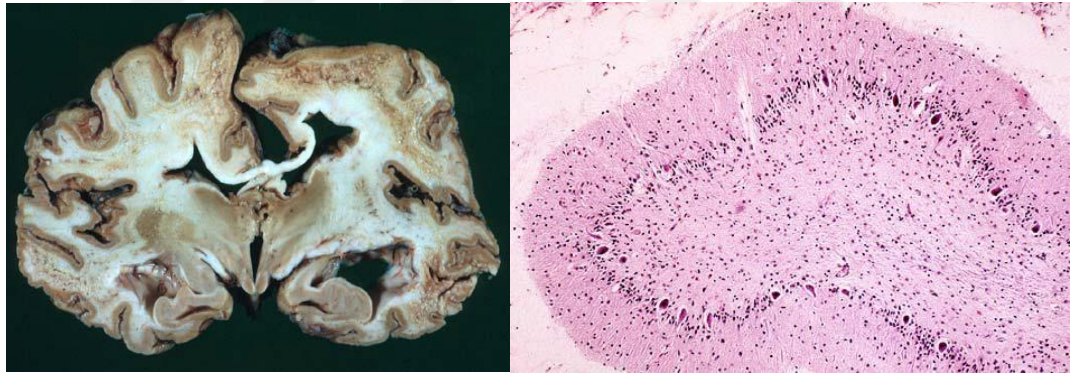


Şekil 13: FTD'da görülen pick hücreleri ve argentofilik inklüzyon cisimleri

Nonspesifik frontal lob dejenerasyonu gösteren hasta grubunda en belirgin lezyonlar; frontal ve anterior temporal loblarda hücre kaybı, mikrovakualizasyon ve yüzeysel korteks tabakalarında gliosis varlığıdır. Değişen derecelerde olmak üzere; mezensefalon, bazal ganglionlar ve talamusta gliosis ile karakterize subkortikal dejenerasyon ve beyin sapı tutulumu da patolojik tabloya eklenebilir. Eğer hastada motor nöron hastalığı varsa, ön boynuz hücresi kaybı da söz konusudur.

2.2.9 Prion Hastalığı

Bu hastalıkların etkeni "İnfektif Prion"lardır. Hastalık etkeninin Prion olduğu hipotezi, 1997 yılında Nobel tıp ödülü alan Prusiner tarafından 1982 yılında ortaya atılmıştır. Aslında normal Prion (PrP^c) bir glikoprotein olup insanlarda ve hayvanlarda normal hücrelerde (sinir sistemi, dalak, lenf yumrusu, barsak lenf dokusu ve lenforetiküler sistem) bulunur. Normal Prion 250 amino asitten oluşmuştur. İnsanlarda PRNP geninde bulunur. İnfektif Prion normal hücrelerde bulunan Prion'un (PrP) değişime uğramış şekli ve posttranslasyonel bir üründür. İnfektif Prion normal Prionun yanlış katlanması ile oluşmakta ve β -yaprak (beta sheet) içermektedir. Bu anormal Prion, yani hastalık yapan infeksiyöz Prion hücre içinde birikerek vakuol dejenerasyonu ve bazı fibriller (Scrapie Associated Fibrils=SAF) oluşumuna neden olur ve sonuçta beyin süngerimsi bir hal alarak canlı yaşamını kaybeder (Şekil 14).



Şekil 14: Prion hastalığı etkisi altındaki süngerleşmiş beyin ve serebellar dejenerasyon

İnfektif Prion fiziksel, kimyasal etkenlere, dolayısıyla çevre şartlarına yaklaşık 2-3 yıl dayanıklıdır. Güneş ışığından etkilenmez. Pişirmeyle infeksiyözitesi kaybolmaz. Etken 134-136°C'de 3 bar atmosfer basıncı altında 30 dakika ısıtmakla infeksiyöz gücünü kaybeder. Etkenin infeksiyöz gücünün yok edilmesinde sodyum hipoklorit ve sodyum hidroksit kullanılmaktadır. İnfektif prion katlanmış halde olduğu için sindirim enzimlerinden (proteolitik enzimler) çok az etkilenir. Etkenin, RNAse ve DNAse enzimlerinden etkilenmediği için

RNA veya DNA taşımadığı, dolayısıyla bakteri ve virustan farklı olduğu ortaya çıkmıştır. Etken hastalandığı canlıda bağışıklık oluşturmaz. Bu yüzden hastalanan canlıda infektif Prion'a karşı spesifik antikorlar saptanamamıştır.

2.2.10 Kortikobazal Dejenerasyon (KBD)

Adından da anlaşılacağı gibi bu hastalık serebral korteks ve bazal ganglionların birlikte tutulumu ile karakterizedir. Nöropatolojik özelliği beynin özellikle frontal ve bazen paryetal bölgelerindeki kortikal piramidal nöronların şişmesi, balonlaşması ve akromazisi (soluklaşması) ile karakterize asimetric kortikal atrofi, substantia nigra pars compactadaki melanin içeren hücrelerin kaybı ve ilave olarak daha birçok subkortikal, beyinsapı ve bazenserebellar yapılarda hücre kaybı ve gliosis olarak özetlenebilir.

Kortikal bölgelerin ve bazal ganglia yapılarının birlikte tutulmasına bağlı olarak bu hastalıkta çeşitli kortikal ve ekstrapiramidal bulgular bir arada görülürler. Bu birlikteliğin yanısıra en önemli özellik bulguların belirgin ölçüde asimetric olmasıdır. Hastalık orta-ileri yaşlarda kortikal veya ekstrapiramidal bulgularla başlayabilir. Ekstrapiramidal bulgular genellikle asimetric rijidite, bradikinezi, distoni olarak ortaya çıkan akinetik-rigid bir sendromdur. Rijidite ve distoni hastanın elini kullanmasını çok güçleştirecek ağırlıkta olabilir. Buna sıklıkla postüral instabilite ve dizatri eklenir, bulgular zamanla diğer tarafa da yayılırlar. Kortikal bulguların en sık ve en belirgin olanı apraksidir. Apraksi bazen ağır tutulum gösteren tarafta rijidite ve distoniden dolayı muayene edilemez, daha az tutulan tarafta daha kolay gösterilebilir. Bunun yanında yabancı el (alien limb) olarak adlandırılan, bir ekstremitenin vücuda ait olmadığı hissi ve bu ekstremitenin istem dışı, iradeden bağımsız, bazen amaçlı gibi görünen hareketleri ortaya çıkabilir. Diğer kortikal bulgular myoklonus ve kortikal tipte duyu kusurunu (elin üzerine yazılan harfleri, içine konulan eşyaları tanıyamama) içerir. Hastaların birçoğunda diseksekutif sendrom olarak da adlandırılan frontal tipte bir demans oluşur. Bazen supranükleer tipte bir bakış felci gelişebilir ve PSP ile karışabilir.

Görülebilecek diğer bulgular canlı yüz refleksleri, yakalama refleksi gibi ilkel refleksler, disfaji bazen deserebellar belirtilerdir.

KBD'lu hastalar dopaminerjik tedaviye iyi cevap vermezler. Myoklonus klonazepamdan, distoni baklofenden yarar görebilir. Kontraktür gelişmesini önlemek için fizyoterapi ve ergoterapi önemlidir. Hastalık başladıktan sonra sürekli ve yavaş bir şekilde ilerler, prognozu kötüdür. Başlangıçtan itibaren yaşam beklentisi 6-8 yıldır (66, 73).

2.3. APOPTOZ

Gelişmiş organizmalarda gereksinim duyulmayan ve/veya fonksiyonu bozulan hücrelerin kontrollü ve programlı ölümüne apoptoz denir (74). Apoptozun, organizmalarda gelişmede ve homeostazın sürdürülmesinde vazgeçilmez bir rolü vardır. Yunancada “Dökülen Yaprak” anlamına gelen apoptoz; patolojide “Programlı Hücre Ölümü ”nü ifade etmektedir. Apoptoz terimi ilk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie adlı araştırmacılar tarafından kullanılmıştır (75, 76). Apoptozun genetik düzenlenmesi hakkındaki bilgiler *Caenorhabditis elegans* ile yapılan ayrıntılı incelemeye dayanmaktadır (77).

Apoptoz, ölüm için programlanmış hücrelerde; hücrelerin kendi nükleer DNA'larını, nükleer ve sitoplazmik proteinlerini parçalayacak enzimleri aktive eden, kontrollü bir şekilde düzenlenmiş intrasellüler programla yürütülen bir hücre ölümü yolağıdır. Hücrenin plazma membranı sağlam kalır, ancak yapısı değişir. Bu değişim sonrası hücre fagositoz için hedef haline gelir. Ölü hücre, içeriği dışarı sızmadan hızlıca temizlenir ve bu nedenle organizmada inflamatuvar reaksiyona yol açmaz (78).

Apoptotik hücre ölüm programı, Bcl-2 ailesi proteinleri, kaspazlar ve apoptotik proteaz aktive edici faktörler olmak üzere üç ana bileşen içermektedir. Bu anahtar bileşenlerin biyokimyasal aktivasyonu, apoptozda gözlenen morfolojik değişikliklerden, mitokondriyal hasardan, çekirdek zarı kırılmalarından, DNA fragmentasyonundan, kromatin kondansasyonundan ve apoptotik cisimciklerin şekillenmesinden sorumludur. Ayrıca kanser,

nörodejenerasyon, otoimmünite, kalp hastalıkları ve diğer bozukluklar gibi geniş bir alana yayılan hastalıkların patogenezi apoptozun kötü regülasyonu ile ilişkilidir. Apoptoz; istenmeyen ya da potansiyel olarak zararlı hücreler ile birlikte ömrünü tamamlamış hücreleri ortadan kaldırılmasında rol oynar. Aynı zamanda, hücreler onarılamayacak ölçüde zarar gördüklerinde ve özellikle de hasar hücrenin DNA'sını etkilediğinde ise apoptoz patolojik bir olaydır. Böyle durumlarda, onarılamayacak derecede hasar görmüş hücreler apoptoz ile yok edilir (78). Sonuçta apoptozun rol aldığı pek çok patolojik ve fizyolojik süreç vardır (79-82). Apoptoz, organizmanın normal işleyişi sırasında görülen ve düzenli olarak sürmesi gereken bir tür hücre ölüm şeklidir. Hızlanmış veya yavaşlamış apoptoz hastalık belirtisi olabilir. Apoptozun gereksiz yere oluştuğu veya hızlandığı hastalıklara, AIDS, nörodejeneratif hastalıklar, insüline bağımlı diabetes (Tip I) örnek verilebilirken apoptozun yavaşladığı hastalıklara otoimmün hastalıklar ve kanser örnek verilebilir (83).

Fizyolojik Nedenlere Bağlı Apoptoz:

1. Embriyogenezde (implantasyon, organogenez, gelişimsel involüsyon ve metamorfoz) hücrelerin programlı ölümü.
2. Hormona bağlı doku involüsyonu (Menstrüel siklusta, menopozda ovarian atrezide, laktasyon gösteren memenin regresyonunda, kastrasyon sonrası prostat atrofisinde).
3. Çoğalma gösteren hücre gruplarında hücre sayısının devamlılığının (homeostazis) sağlanması (kemik iliği ve timustaki immatür lenfositler, germinal merkezdeki B hücreleri ve intestinal kriptlerdeki epitel hücreleri).
4. Olgunlaşmalarını tamamladıktan sonra ya da önce potansiyel olarak zararlı self-reaktif lenfositlerin elimine edilmesi.
5. Akut inflamatuvar yanıtta nötrofiller veya immün bir yanıtta görev alıp kullanılmış konak hücrelerinin ölümü.
6. Sitotoksik T hücreleri tarafından gerçekleştirilen hücre ölümü (virüsle enfekte hücreler, neoplastik hücreler ve transplant reaksiyonu) (78).

Patolojik Nedenlere Bağlı Apoptoz

1. Çeşitli etkenler (radyasyon, sitotoksik kanser ilaçları, hafif derecede hipoksi ve ısı gibi) ile oluşan DNA hasarı. DNA hasarı ve tümör süpresör gen p53'ü de kapsayan mekanizma ile apoptoz indüklenir. DNA hasara uğrayınca hücrede p53 birikir ve hücre döngüsünü G1 fazında durdurur. DNA onarım süreci başarısız olduğunda ise p53 apoptozu tetikler. Ayrıca p53 mutasyona uğradığında veya yok olduğunda apoptozu uyarmada yetersiz kalır. Bu durum bazı kanserlerde olduğu gibi hücrenin sağ kalımına ve anormal çoğalmasına sebep olur.

2. Katlanmış proteinlerin birikimi (Santral sinir sistemi ve diğer organlarda endoplazmik retikulumda stres oluşturan protein birikimi).

3. Bilinen bazı enfeksiyonlara bağlı hücre ölümü (adenovirüs, HIV enfeksiyonu ya da dokuda immün yanıt oluşturan viral hepatitler).

4. Duktus obstrüksiyonundan sonra organ parankiminde patolojik atrofi (pankreas, parotis ve böbrek).

5. Tümörlerde hücre ölümü (çoğunlukla gerileyen tümörlerde olmakla birlikte bazen de aktif büyüyen tümörlerde) (78).

Apoptoz, hücre bölünme oranını hücre ölümü oranıyla dengeleyerek doku homeostazının dengelenmesinde ve gelişim sürecinde oldukça önemli bir rol oynamaktadır. Günümüzde kullanılan birçok ilaç, apoptozu indüklemeye yetilerinden dolayı tümör hücrelerini öldürmektedir ve ilaç direnci çalışmalarında apoptozun rolü giderek artan bir şekilde çalışılmaktadır. Apoptoz, gebelik ve nörodejeneratif bozukluklar gibi birçok hastalığın çeşitli aşamalarında rol almaktadır. Apoptozun, doku homeostazındaki ve Alzheimer ve Parkinson gibi yaşla bağlantılı dejeneratif bozukluklarda meydana gelen apoptotik hücre ölümünün gözlenmesindeki fizyolojik önem, apoptozun yaşlanmayla ilgili çalışmalarda kritik bir belirleyici parametre olabileceğini ileri sürmektedir (86).

Nekroz, birçok hasar verici koşullar altında oluşan hücre ölümünün patolojik bir modudur. Nekrotik hücre ölümü hücre şişmesini ve organel parçalanmasını takiben lizis ve hücre içi içeriğin dışarı salınmasını içermektedir. Bu yapıdaki hücre ölümü, etrafta bulunan dokulara zarar verebilir (87).

2.3.1. Apoptozun Safhaları

Apoptoz belli olaylar ile başlatılan, düzenli, temelde kaskad zincirini takip eden, dört basamaktan oluşan, enerji bağımlı bir süreçtir.

Sinyal (başlama) fazı: Apoptozun başlangıç safhasıdır. Apoptotik uyarı ilk olarak bir sinyal yaratır. Membran aracılığıyla alınan bu sinyaller apoptozun pozitif veya negatif belirleyicileri olabilir. Yüzey ölüm reseptörlerinin (özellikle tümör nekroz faktör (TNF) ailesi üyelerinin), mitokondriyal yolun veya diğer uyarıların apoptozu başlatmasını içerir.

Kontrol ve hazırlık fazı: İntrasellüler pozitif veya negatif düzenleyici moleküller apoptozu uyarır, başlatır ya da durdurur. Bu olaylar spesifik proteinlerle gerçekleştirilir. Burada başlatıcı kaspazlar ve bazı kinazların/fosfatazların aktivasyonu yer alır. Bu proteinler tüm sürecin ilerlemesinde rol aldıkları için önemlidirler. Büyük ölçüde mitokondriyal fonksiyonu düzenleyerek apoptotik süreçte yer alırlar. Apoptoz mitokondride iki değişikliğe yol açar;

1. Mitokondriyal şişme: Apoptotik sinyal mitokondri zarında permeabilite değişimi,

2. Sitokrom C sitoplazma içine salınır ve proteolitik olayların gelişimi hazırlanır (75, 78, 88).

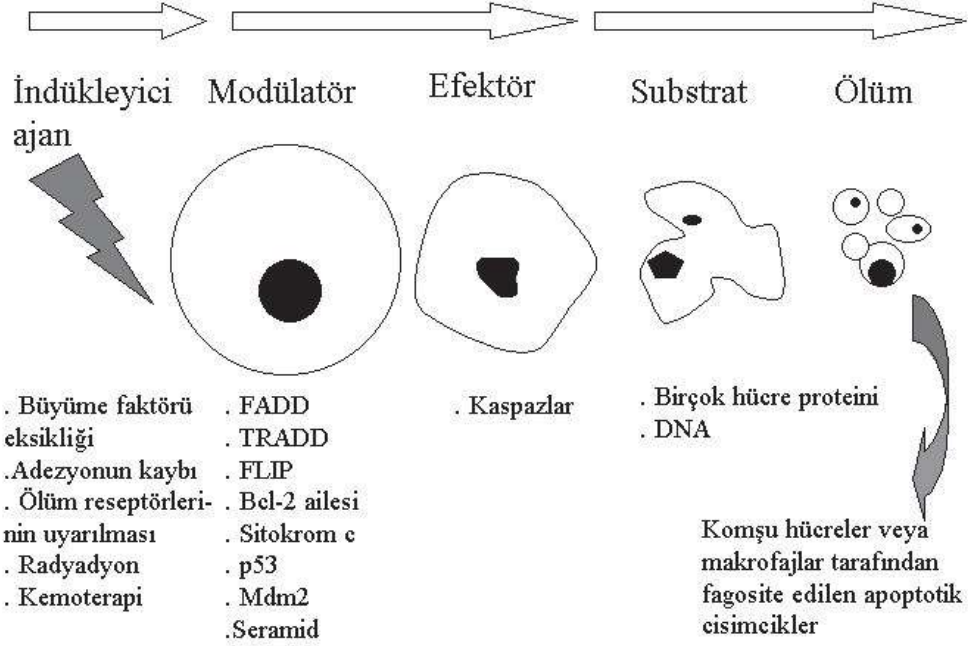
Uygulama fazı: Bu evreden büyük ölçüde kaspaz protein ailesi sorumludur. Kaspazlar (sistein bağımlı aspartat spesifik proteaz) kalsiyum bağımsız hücre içi sistein proteaz sınıfının en önemli bölümünü oluştururlar. İnaktif öncüller olarak hücre sitoplazmasında bulunurlar ve çoğu proapoptotiktir. Biyolojik fonksiyonlarına göre 3 gruba ayrılırlar:

1. Sitokin aktivasyonu yapanlar: Kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 14
2. Apoptozu başlatanlar: Kaspaz 2, 8, 9, 10
3. Apoptozu yürütenler (efektör grup): Kaspaz 3, 6, 7

Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara iletirler. Efektör kaspazlar ise proteolitik etki göstererek apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar (88). Apoptozun uygulama fazı proteolitik bir kaskattır. Kaspazlar hücre iskeleti ve nükleer matriks proteinlerini parçalayarak hücre iskeletini yıkarlar.

Ölü hücrelerin fagositozla eliminasyonu; Apoptotik hücre ve parçalarının yüzeylerinde bulunan işaretleyici moleküller, komşu hücreleri ve fagositleri uyarır (75, 78).

APOPTOTİK SÜREÇ



Şekil 15. Apoptotik süreç ve hücrede meydana gelen değişiklikler (83).

2.3.2. Apoptoz Morfolojisi

Apoptozda morfolojik bulgular şunlardır:

- Çevre Hücrelerden Ayrılma:** Apoptozda ilk olarak hücreler birbirleriyle olan temas bölgelerini ve mikrovillusları içeren yüzey oluşumlarını kaybederek komşu hücrelerden ayrılmaya başlarlar (81).
- Hücre Büzüşmesi:** Hücre boyutları küçülür. Sitoplazma yoğun olup organeller nispeten normal görünmekle birlikte sıkı paketlenmeler gösterir (78). Organel bütünlüğü korunur ancak bu organeller küçülerek hücre zarına bağlı cisimler oluştururlar (81).
- Kromatin Yoğunlaşması:** Apoptozun en karakteristik görüntüsünü oluşturur (78, 80). Değişik boyut ve şekillerde kromatin birikimleri, periferde hücre membranının altında bulunur (78, 81, 82). Kromozomal DNA'lar kendi içinde 180- 200 bp'lik internükleozomal

fragmanlara ayrılarak parçalanır. Nükleus iki ya da daha fazla parçaya bölünür (78, 82, 89).

- d. Sitoplazmik Kabarcıklar ve Apoptotik Cisimlerin Oluşumu: Apoptotik hücrede yaygın yüzeysel tomurcuklanma gözlenir (78, 82). Fosfatidilserin, hücreden dışarı çıkar. Sitoplazma yoğunlaşır; mitokondri, sitokrom-C gibi apoptozi uyaran faktörleri serbestleştirerek hücre bütünlüğünü kaybeder ve parçalanır. Daha sonra membranla çevrili sitoplazma da nükleer parçalarla birlikte veya onlar olmadan sıkı paketlenmiş organellerden oluşan apoptotik cisimler şeklinde parçalanırlar (82, 89).
- e. Apoptotik Hücre veya Cisimciklerin Makrofajlar Tarafından Fagositozu: Apoptotik cisimcikler hızla fagositlerin lizozomal enzimleri tarafından sindirilir (78, 81).

Hematoksilen-eozin ile boyanmış dokularda apoptotik hücreler oval veya yuvarlak, yoğun eozinofilik sitoplazmalı, dens nükleer kromatin parçaları ile birlikte görülür. Apoptoz, nekrozdan farklı olarak inflamasyon oluşturmaz ve bu da histolojik olarak saptanmasını güçleştirir (78, 90).

2.3.3. Apoptozun Biyokimyasal Özellikleri,

Apoptotik hücrelerde genellikle diğer patolojik değişikliklerden farklı biyokimyasal özellikler görülür. Bu özelliklerin bazıları nekrotik hücrelerde de görülebilir. Apoptozun spesifik bir özelliği kaspaz adlı bir enzim grubu ile protein hidrolizidir. Transglutaminaz aktivitesi ile aşırı protein çapraz bağlanması sitoplazmik proteinleri kovalent bağlı büzülmüş tabakalara çevirir, bu tabakalar apoptotik cisimler haline parçalanabilir. Apoptotik hücrelerde 50-300 kilobazlık büyük parçalar halinde, karakteristik DNA yıkımı gözlenir. Daha sonra DNA, Ca^{+2} ve Mg^{+2} bağımlı endonükleazlar aracılığı ile internükleozomal parçalanma sonucunda 180-200 bazlı oligonükleozom parçalarına dönüşür. Apoptotik hücreler, plazma membranlarının dışında fosfatidilserin ve trombospondin bağları bulundurlar (75, 78). Meydana gelen bu değişiklikler apoptotik hücrenin proinflamatuvar hücresel içerik

ortaya çıkmadan makrofajlar tarafından fagositoz için tanınmasına olanak verir (90).

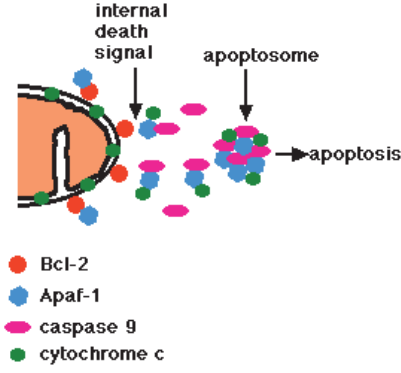
2.3.4. Apoptozun Oluşum Yolları

Apoptotik hücre ölümü farklı sinyal ileti mekanizmaları aracılığıyla uyarılabilmektedir. Bu sinyal ileti mekanizmaları: mitokondriyal yol (intrinsik), ölüm reseptörleri (ekstrinsik) yolu ve endoplazmik retikulum aracılı yoldur.

2.3.4.1. Mitokondriyal yol (Intrinsik)

Intraselüler ölüm sinyallerinin proapoptotik moleküllere iletilerek aktivasyonlarının sağlandığı süreçleri içerir (91). Sitokrom c, sitozolik apoptotik proteaz aktivasyon faktörü-1 (Apaf-1) ve pro-kaspaz-9 ile apoptozom oluşturmak üzere birleşir (92). Sitokrom c'nin mitokondriden sitozole saliverilmesi hücre ölüm yolunu etkinleştirir. Sitokrom c'nin saliverilmesini takiben, prokaspaz 9 ve Apaf-1 sitozolde bir araya gelerek "apoptozom" olarak adlandırılan bir kompleks oluşturur. Bu kompleks içinde prokaspaz 9 etkinleşerek kaspaz 9'a dönüşür ve kaspaz 9, kaspaz 3 ve 7'yi etkinleştirir. Böylece apoptotik süreç gelişir (93).

Mitokondriyal yolun kontrolü, Bcl-2 ailesine ait pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerinin dengesine bağlıdır. Bcl 2 ailesine ait proteinler, sitokrom c'nin mitokondri membranından sitozole salınımını denetlerler. Sitokrom c, mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirine ait bir proteindir. Son yıllarda anlaşılan önemiyle apoptoz sürecinde merkezi bir konuma oturmuştur. Bu yüzden de sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya saliverilmesi apoptoz yoluna girmiş bir hücrede geri dönüşümsüz bir döneme girildiğini işaret eder (94).



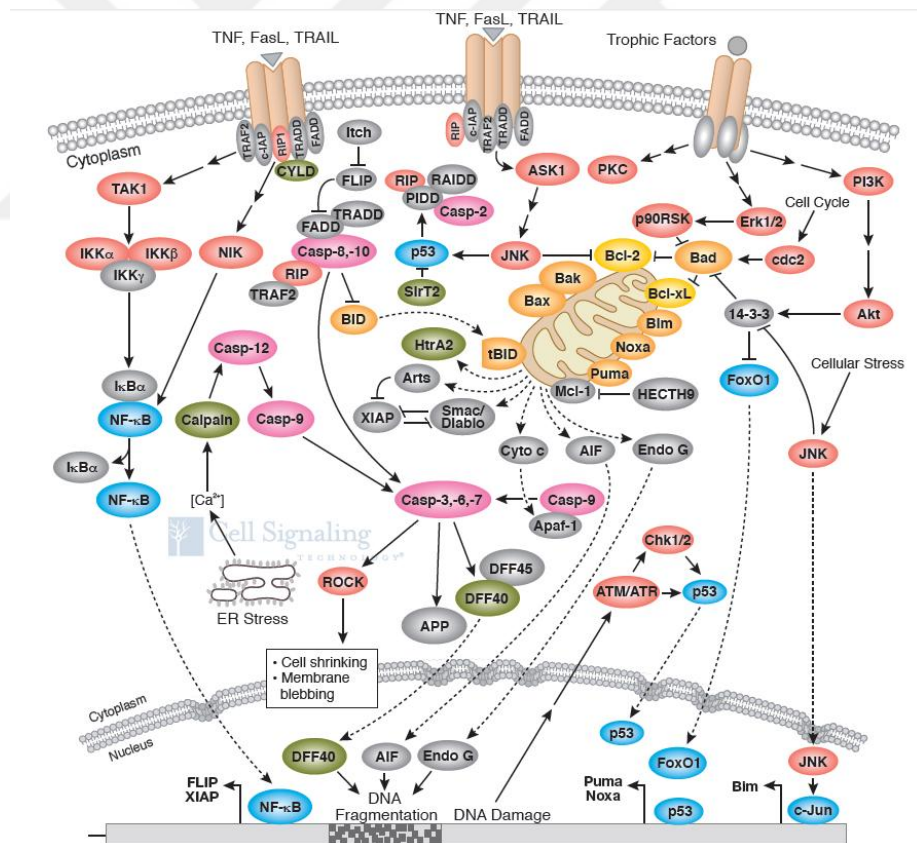
Şekil 16. İnternal apoptoz mekanizması (97).

2.3.4.2. Ölüm reseptörleri yolu (Ekstrinsik)

Apoptozun dış sinyallerle tetiklendiği yoldur. Ölüm reseptörleri olarak bilinen tümör nekroz faktör (TNF) reseptör ailesinin plazma membran proteinlerine bağlanması ile tetiklenir (95). Apoptozin ölüm reseptörleri yolu, TNF ailesi hücre yüzey reseptörlerin kendileriyle ilişkili apoptoz uyarıcı ligandlar (TRAIL), Fas ligantları ya da bazı malign ve normal hücrelerin kendilerine özgü reseptörleriyle birleşmesiyle gerçekleşir (77). Ölüm reseptörleri; TNF reseptör gen ailesine aittir. Bilinen altı tane ölüm reseptörü (CD95 (APO-1/Fas), TRAIL (TNF Related Apoptoz Inducing Ligand)-R1, TRAILR2, TNF-R1, DR3 ve DR6) vardır. Adaptör proteinler, reseptörle gelen sinyal sonucunda kaspazlara bağlanıp onları aktive ederler (96). Duyarlı ligandların bağlanmasıyla üç TNFR ya da Fas molekülü kompleks oluşturmak üzere bir araya gelir ve TNFR ve Fas trimerlerinin sitoplazmik bölümleri sırasıyla TRADD ve FADD/Mort-1 adlı adaptör proteinlerine bağlanırlar. Reseptörlerin sitoplazmik kısımları, adaptör proteinler ve proteazlar bir “Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi (DISC)”ni oluştururlar. Proteazların aktivasyonu apoptotik sinyali üretir (77). DISC, kaspaz-8’in doğrudan aktivasyonuna öncülük eder. Kaspaz-8 de kaspaz-3’ü aktive eder ve apoptoz oluşur (92).

2.3.4.3. Endoplazmik Retikulum Aracılı Yol

Endoplazmik retikulum (ER), protein biyosentezinde ve katlanmasında, hücre içi kalsiyum dengesinin düzenlenmesinde önemli rol oynar. Hücre içi kalsiyum (Ca^{+2}) homeostazisinin bozulması ve intraluminal oksitadif çevresinin değişmesi de dâhil olmak üzere çeşitli şartlar, ER'un stresini artırabilir ve apoptoza yol açabilir (98). Dış uyaranlar, hücre içinde Ca^{+2} artışına neden olabilir. Bununla birlikte cAMP gibi hücre içi ikincil haberciler de aktive edilir. Bu da kaspaz kaskadına sebep olur ve apoptozu başlatır (99). ER'un stresinin apoptozun gelişimine etkisinin ne olduğu tam olarak anlaşılamamasına rağmen, son çalışmalar, ER proteazlarının, kaspaz-7 ve kaspaz-12 nin apoptoza katıldığını öne sürmektedir (98).



Şekil 17: Apoptoz gelişiminin genel görünümü (100).

2.4. KLORPRİFOS VE NÖROTOKSİSİTE

Klorprifos [0,0-diethyl-0-(3,5,6-trichloro-2-pyridinyl) phosphorothioate], bahçe, tarım ve orman zararlılarına karşı yaygın olarak kullanılan dolayısı ile insanların sıkça maruz kaldığı organofosfatlı bir insektisittir (101). Klorprifosun metabolitleri, klorprifos-okson ve 3,5,6- trikloro-2-pridinol klorprifosdan daha toksiktir (101, 102).

Klorprifosun metaboliti, klorprifos-okson sinir kavşaklarında asetilkolin esterazı inhibe ederek ciddi kolinerjik toksisite oluşturur (103, 104). In vivo ve in vitro deneysel çalışmalarda, akut ve kronik organofosfat uygulamalarının sonucunda ortaya çıkan toksik etkilerin (hepatotoksisite, nörotoksisite, genetik toksisite, embriyotoksisite, immünotoksisite gibi) patogenezinde oksidatif doku hasarının rol oynadığı ortaya konulmuştur (103, 104). Serbest radikaller, özellikle DNA, protein ve hücre fosfolipitlerinin çoklu doymamış yağ asitleri olmak üzere organik ve inorganik bileşiklerle reaksiyona girerler. Özellikle DNA'ya saldıran serbest radikaller önemli zararlara neden olurlar. Bu zararlar karsinojenik mutasyonlara neden olabilir (105). Karsinojenik ksenobiyotikler, hücre içindeki sitokrom p450, peroksizomlar ve mitokondrideki enzimatik sistemleri değiştirerek veya indükleyerek serbest radikaller oluştururlar. Ek olarak, serbest radikalleri toplayarak hücreyi koruyan enzimatik veya enzimatik olmayan sistemleri tüketirler veya inhibe ederler veya taşıyabileceklerinden fazla yük yüklerler. Hücrede oksidatif hasar oluşturarak lipid peroksidasyonu, deoksiribonükleik asit hasarı veya protein değişikliklerine yol açarlar. Bunlar da azalmış gap junction aracılıklı haberleşme, transkripsiyon faktörlerinin (AP-1, NF-kB) aktivasyonu, intrasellüler kalsiyum ve pH değişiklikleri veya hücre ölümü gibi hücresel fonksiyon değişikliklerine yol açabilir (106).

Yapılan çalışmalarda, organofosfat uygulanmasını takiben karaciğer, beyin, tiroid gibi çeşitli doku örneklerinde lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan malondialdehit (MDA) düzeyinde artış ve enzimatik antioksidan savunma elemanlarından süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glukoz-6-fosfat dehidrogenaz

(G6PDH) ve glutatyon redüktaz (GR) aktivitelerinde değişiklikler olduğu saptanmıştır (103, 104, 106).

Klorprifosun tüm bu etkilerinin yanı sıra kolinesteraz inhibisyonundan bağımsız olarak nörotoksisite oluşturduğu ortaya atılmıştır. Bu iddia çeşitli deney hayvanlarında ve hücre hatlarında yapılan çalışmalarla desteklenerek klorprifosun gelişimsel nörotoksik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (107). Bu göstergeler Amerika'da Çevre Koruma Ajansının klorprifos kullanımını sınırlamasına sebep olmuştur (108). Daha sonrasında yapılan laboratuvar çalışmaları da klorprifosun nöronal proliferasyonu inhibe ettiğini (109) ve kognitif fonksyonları bozduğunu göstermiştir (107, 108).

Bazı araştırmacılar klorprifosun gelişimsel nörotoksik efektlerinin asetilkolinesteraz inhibisyonu aracılığıyla olmayabileceğini; çalışmalarında uyguladıkları kolinerjik reseptör antagonistleriyle bu etkileri geri döndüremediklerini ortaya koyarak göstermişlerdir (110). Yapılan in vivo çalışmalar ile hücre kültürü modellerinde yapılan çalışmalar birbiri ile uyumlu sonuçlar vermiştir. Örneğin Das ve Barone 1999 yılında yaptıkları çalışmada klorprifosun PC12 hücre hattında nörit uzamasını asetilkolinesteraz inhibisyonu olmadan da inhibe ettiğini göstermişlerdir (111). Yapılan bazı çalışmalarda ise ilacın hem antimitotik hemde proapoptotik bir ajan olduğu söylenmektedir (112). Klorprifosun nöronlarda meydana getirdiği hasar sonrasında nörit uzamasının durması, proliferasyonun inhibisyonu ile birlikte nekrotik ve apoptotik süreçlerin başlaması beklenmektedir.

2.5. PİROLİDON TÜREVİ İLAÇLAR

Günümüzde santral sinir sistemi hastalıklarında nootropik ilaçların kullanımına yönelik artan bir ilgi görölmektedir. Pirasetam'ın klinik etkinliği ile ilgili yapılan meta-analiz sayesinde daha fazla bilgi birikimi olmuştur. Bu sistematik araştırmanın birincil amacı bu gruptaki pazarlanan ve araştırması devam eden ilaçların farmakoloji, farmakokinetik/farmakodinamik, etki mekanizması, doz araştırması, toksikolojik ve yan etki araştırmaları ile ilişkili

bilimsel literatür birikimini ve dolayısıyla bu ilaçların klinik gelişimlerini ortaya koymaktır. Gerçekleştirilen literatür taramasının ana hedefi son 10 yılda santral sinir sistemi hastalıklarında kanıt temelli olarak yapılan araştırmaların makaleleri olmuştur. Bahsi geçen santral sinir sistemi hastalıkları;

- a. Kognisyon / hafıza problemleri,
- b. Epilepsi ve nöbet gelişimi,
- c. Nörodejeneratif hastalıklar,
- d. İnme / iskemi,
- e. Stres ve anksiyete.

Pirolidon türevi (pirasetam benzeri) ilaçlar üç alt gruba ayrılırlar.

Birinci alt grupta pirasetam, oksirasetam, anirasetam, pramirasetam ve fenilpirasetam bulunur ve bunlar insanlarda kullanılan ve bazıları diyet takviyesi olarak da kullanılabilen ilaçlardır. Bunlardan oksirasetam ve anirasetam artık klinik kullanımda değildir. Pramirasetam'ın travmatik beyin hasarı ile ilişkili kognitif kusurların giderilmesinde faydalı olduğu bildirilmiştir. Hafif bilişsel (kognitif) bozuklukların tedavisinde pirasetam uzun dönemde fayda göstermemiş olmasına rağmen yapılan son çalışmalarda koroner bypass ameliyatları sırasında kullanıldığında nöroprotektif etkileri olduğu ortaya konmuştur. Aynı zamanda serebrovasküler ve travmatik kaynaklı bilişsel bozuklukların tedavisinde oldukça etkilidir fakat depresyon ve anksiyeteyi azaltıcı etkisi hafıza geliştirici etkisinden daha fazla görülmüştür. Miyoklonus epilepsi ve tardif diskinezi hastalarında destekleyici tedavi seçeneği olarak faydalı olduğu görülmüştür. Fenilpirasetam pirasetama göre daha potent olup daha fazla endikasyonda kullanılma potansiyeli vardır. Pirasetamın vazodilatör bir ilaç ile kombine edildiğinde çeşitli kognitif bozukluklarda ilave faydalı etkileri olduğu da gösterilmiştir.

İkinci alt grupta levetirasetam, seletrasetam ve brivarasetam bulunmaktadır. Bu alt gruptaki ilaçların kognitif etkileri çok açık şekilde belirgin olmamasına rağmen antiepileptik etki gösterirler.

Üçüncü alt grup klinik etkinlikleri ve etki mekanizmaları hala tam belirgin olmayan pirasetam türevlerinden oluşmaktadır. Örneğin bunlardan

nefirasetam felç geçirmiş hastalarda kognisyonu düzeltmede başarısız olmuş ve bu hastalarda klinik denemelerde yerini bir antidepresan olan rolipram almıştır. Bu alt grup üyelerinin çoğu hala araştırmaların pre-klinik evresindedirler.

Pirasetam ve birçok pirasetam türevinin etki mekanizmaları ile ilgili hala birçok bilinmeyen mevcuttur. Glutamat reseptörlerinin subtiplerinde GABAerjik olmayan kademeli etkileri olduğu görülmüştür. Pirasetam'ın nöronal hücrelere kalsiyum girişini artırdığı zannedilmektedir. Fakat bu fonksiyon önemli bir soru işareti barındırmaktadır. Çünkü normalde böylesi bir kalsiyum girişinin nöronal hücrelere oldukça zararlı etkileri olabilir. İkinci alt grup üyeleri farklı nöronal reseptörlere (sinaptik vezikül 2A gibi) bağlanarak da etki göstermelerine rağmen nefirasetam gibi üçüncü alt grup üyeleri birinci alt grupta olduğu gibi böyle bir etki göstermezler. Etkinlik oranları ile ilgili yapılan hesaplamalara göre bu gruptaki ilaçların en azından bazılarının klinik gelişimleri devam edecek gibi görünmektedir (113).

2.5.1. LEVETİRASETAM

Levetirasetam bütün dünyada 2000 yılından itibaren kullanıma giren en yeni antiepileptik ilaçlardan biridir. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde levetirasetam yalnızca parsiyel başlangıçlı epilepside ek tedavi ilacı olarak onay almıştır. AB ülkelerinde ise levetirasetam birinci basamak monoterapi ilacı olarak da kullanıma girmiştir. Levetirasetam yaşlılarda kullanılan ve zekâ üzerine etkisi olduğu söylenen Pirasetamın etil analogunun S-enantiomeridir. Levetirasetam oral alımı takiben hızlı ve nerdeyse tamamen absorbe olur. En yüksek plazma konsantrasyon değeri oral alımından bir saat sonra ölçülür. Gıda alımı plazma konsantrasyon değerini %20 azaltarak bu değere yükselmeyi 1.5 saat geciktirmektedir fakat biyoyararlanımını azaltmaz (114,115). 500 – 5000 mg değerinde doz ve levetirasetam plazma değeri arasında lineer ilişki vardır (116). Levetirasetam metabolizması sitokrom P450 enzim sisteminden bağımsızdır. Levetirasetam vücutta değişmeden böbreklerden atılır (%27'si metabolize olur). Başlıca metabolik yolağı kanda asetamid grubu ile hidrolizdir (116). Metabolik ürünü inaktiftir. Levetirasetam

plazma yarı ömrü erişkinlerde 7 ± 1 saattir. Bu değer yaşlılarda kreatinin klirensinin artması nedeniyle 2,5 saat uzayabilir (114). Böbrek hastalığı olanlarda kreatinin klirensine göre doz titrasyonu yapılması gerekmektedir (114). Hepatik metabolizma ve proteine bağlanma olmaması diğer ilaçlarla etkileşiminin olmadığını göstergesidir Bugüne kadar levetirasetamın fenitoin, warfarin, digoksin ve oral kontraseptiflerle farmakokinetik etkileşimi gösterilmemiştir (114, 115). İntravenöz (İV) formunun oral formuyla bioekivalan olduğu gösterilmiştir. Levetirasetamın lineer kinetiği vardır, serum konsantrasyonu doza paralel olarak artmaktadır (115). Levetirasetamın efektif plazma değeri belirlenememiştir. Yanıt veren ve yanıt vermeyen hastalarda ortalama plazma değeri 12,9 ila 9,5 $\mu\text{g/mL}$ olarak ölçülmüştür. Hastaların çoğunun 1000 mg/gün dozda nöbetlerinin olmadığı gösterilmiştir ve bu dozdaki plazma değeri $6,5\pm2,4$ $\mu\text{g/mL}$ ölçülmüştür. Buna rağmen levetirasetamın terapötik ve toksik dozu belirlenememiştir (114). Levetirasetamın etki mekanizması diğer antiepileptik ilaçlardan farklıdır. Antikonvülzan etkisi standart epilepsi modellerinde gösterilememiş, ancak "kindling model"inde gösterilmiştir (117). Levetirasetamın sinaptik vezikül proteini 2A'ya (SV2A) bağlanarak etki ettiği düşünülmektedir. SV2A proteinine bağlanarak vezikülden glutamat salınımını engellediği düşünülmektedir (118). Zar glikoproteini olan SV2A en fazla sinaptik ve endokrin hücrelerin vezikül zarlarında bulunmaktadır. Levetirasetamın SV2A üzerinden de antiepileptik etkisinin olduğu ileri sürülmüştür. Levetirasetam dışındaki diğer antiepileptik ilaçların SV2A'ya etkinliği yoktur. Yapılan in vitro çalışmalarda N-tipi yüksek voltajlı aktive kalsiyum kanallarını kısmi olarak kapatarak hücre içi depolardan kalsiyumu azaltarak etki ettiği gösterilmiştir. Aynı zamanda Gamma-aminobütirik asit (GABA) ve glisin ile düzenlenen akımlardaki azalmayı kısmen tersine çevirir (118).

Levetirasetamın hedeflenen dozu 2 yarım doza ayrılan 60 mg/kg/gündür. Önce 20 mg/kg/gün 2 hafta, ardından 40 mg/kg/gün ve nihayetinde 60 mg/kg/gün dozuna ulaşılması önerilir. En yüksek dozu tolere edemeyen hasta popülasyonunda 40 mg/kg/gün dozla sınırlanmalıdır (114). En sık rastlanan yan etkisi depresyon ve uyku bozukluğudur. Epilepsi

cerrahisiyle nöbetleri kontrol edilemeyen hastaların, ameliyat olmayan hastalara kıyasla levetirasetama daha iyi yanıt verdiği gösterilmiştir. Epilepsi cerrahisiyle kontrol altına alınamayan hastaların uzun dönem takip sonuçlarında yeni başlanmış levetirasetam pozitif prognostik faktör olarak kabul edilmektedir. Levetirasetamın status epileptikus'ta (SE) kullanımı önerilmektedir. Levetirasetamın yükleme dozu 250 ila 1500 mg arasında değişir. İdame dozu 1500 mg/gün'den 7000 mg/güne kadar arttırılabilir(119, 120, 121)

Farmakolojik özellikleri;

Ağızdan alındıktan sonra tama yakın olarak emilir. Gıda ile birlikte alımı biyoyararlanımı etkilemez ancak emilim oranı yavaşlar. Çocuklarda günlük idame doz erişkinin %130-140'ına biyoeşdeğerdir. Günlük çocuk dozu: 10-20 mg/kg/gün başlanılıp, haftalık 10 mg/kg arttırılarak 32-60 mg/kg/gün dozuna kadar verilebilir (115) . Levetirasetam karaciğer tarafından metabolize olmaz, plazma proteinlerine bağlanma oranı düşük olduğundan, diğer antiepileptik ilaçlarla alındığında etkileşime girmez. Kararlı plazma düzeyine 2 gün içinde ulaşmaktadır. Alınan miktarının % 66-76'sı değişmeden idrar ile atılmakta ve % 27'si aktif olmayan metabolitlere dönüşmektedir. Yarılanma ömrü 7 saat olup böbrek yetersizliğinde bu süre uzamaktadır (122).

Levetirasetamla yapılan hayvan çalışmalarında nöbetleri kontrol altına almasının yanında nöron koruyucu etkisinin de olduğu bildirilmiştir (122). Erişkin sıçanlarda orta beyin arterinin bağlanmasıyla oluşturulan beyin hasarının levetirasetam tedavisi ile azaldığı gösterilmiştir. Hanon ve ark. erişkin sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmada levetirasetamın antiepileptik etkinin yanında antiepileptogenezis etkisinin de olduğu bildirilmiştir (123). Oliveira ve ark. çalışmasında ise levetirasetamın erişkin sıçanlarda pilokarpinin indüklediği nöbetlerde hipokampüste lipid peroksidasyonunu ve oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir (124). Yine yapılan hayvan çalışmalarında levetirasetamın tedavi dozunun birkaç kat üstünde dahi nöron ölümüne neden olmadığı ve bu durumun fenobarbital, fenitoin, valproat gibi

geleneksel antiepileptik ilaçlara göre önemli bir üstünlük olduğu ileri sürülmüştür. Kim ve ark. status epileptikus oluşturulmuş yenidoğan sıçanlardaki çalışmasında levetirasetamın yüksek dozlarda beyin dokusunda apoptozisi önlediği histopatolojik olarak tespit edilmiştir (125). Ancak levetirasetamın hipoksik iskemik beyin hasarında (HİBH) geç dönem etkinliğini gösteren hayvan çalışması yoktur. Bu nedenle perinatal HİBH'nda geç dönem etkinliğini gösterecek deneysel hayvan çalışmalarına ihtiyaç vardır. Ayrıca son zamanlarda bazı merkezlerde yenidoğan nöbetlerinin tedavisinde kullanılmış ve önemli bir yan etkisi olmadan nöbetleri kontrol altına aldığı gösterilmiştir (126).

2.5.2. NEFİRASETAM

Orijinal olarak nootropikler grubunda sınıflandırılan pirolidon türevi ilaçlar kognitif-düzenleyici ajanlardır. Bu sınıftaki ilaçlardan pirasetam ve levetirasetam gibi bazı ajanlar hayvan modellerinde anti-nöbet etkiler de göstermişlerdir. Nefirasetam ise kognitif düzenleyici etkiler gösteren bir başka pirolidon türevi ilaçtır. Nootropik bir ilaç olarak nefirasetam normal ve beyin hasarlı hayvanlarda öğrenme ve bellek artırıcı etkiler göstermiştir ve bu veriler inme ve Alzheimer kaynaklı demansın potansiyel tedavisinde kullanılmak üzere klinik deneylerin başlamasına sebep olmuştur (127). Yakın zamanda yapılan çalışmalarda nefirasetamın en çok kullanılan hayvan modeller olan maximal elektroşok (MES), amigdala hasarı ve kimyasal indüklenmiş nöbet modellerinde nöbet eşiğini yükselterek nöbet aktivitesini hafiflettiği gösterilmiştir (128). Bu çifte fonksiyonundan ötürü nefirasetam, post-iskemik nöbet gelişimi ve kognitif disfonksiyon görülen hastalarda hem nöbet profilaksisi hem de nöroprotektif olarak potansiyel bir ilaç olarak görülmektedir (128).

Nefirasetam [N-(2,6-dimethylphenyl)-2-(2-oxo-1-pyrrolidinyl) acetamide, DM-9384] günümüzde pirolidon türevi nootropik ajanlar içinde Alzheimer hastalığı ile ilişkili ya da serebrovasküler hastalıklara sekonder gelişen

demansın tedavisinde kullanılır ve birçok hayvan modelinde kognisyon-artırıcı etkiler gösterdiği kanıtlanmıştır (128). Elektrofizyolojik ve nörokimyasal çalışmalar nefirasetamın N/L-tip Ca^{+2} kanallarını ve kolinerjik, monoaminerjik ve gama-aminobutirik asit (GABA)-erjik sistemleri aktive ettiğini göstermiştir (128). Bazı pirolidon türevlerinin antikonvülsan aktiviteleri olduğu rapor edilmiş ve ilk pirolidon türevi pirasetam ve onun etil analogu olan levetirasetam miyoklonus ve epilepsi tedavisinde kullanılmışlardır (128). Nefirasetamın da hayvan modellerinde antikonvülsan aktiviteler gösterdiği belirtilerek antiepileptik tedavide kullanılma potansiyeli ortaya konmuştur (128).

Daha önce belirttiğimiz gibi bazı çalışmalar nefirasetamın farmakolojik etkilerini temel olarak kolinerjik ve GABAerjik nörotransmitterlerin geri alımını ve salınımını artırdığını (129) ve nikotinik asetilkolin reseptörleri ile nöronal Ca^{+2} kanallarının aktivitesini artırmak suretiyle nöronal iletiyi artırdığını göstermektedir (129). Nefirasetamın anti-amnezik etkilerinin mekanizması hala tam olarak aydınlatılamamıştır (128). Nefirasetam kognitif fonksiyonları artırıcı veya serebral iskemi oluşturulduktan sonra ortaya çıkan kognitif disfonksiyonun ortaya çıkmasında iskemi sonrası bozulan AC/cAMP/PKA/CREB sinyal ileti yolağını düzeltici etkisi olduğu gösterilmiştir (128).

2.5.3. Nefirasetam, Levetirasetam ve Nöroprotektivite

Levetirasetam ve Nefirasetamın antiepileptik nootropik özellikleri haricinde apoptoz ile ilişkileri ve potansiyel nöroprotektif etkileri de birçok çalışmada aydınlatılmaya çalışılmıştır. Yapılan çalışmaların önemli bir bölümü hayvan modellerinde gerçekleştirilirken hatırı sayılır sayıda da nöronal hücre hattında çalışma mevcuttur.

Örneğin levetirasetamın iskemik beyin hasarında nöroprotektif etkileri gösterilmiştir (130). Yaşlılıkta yeni başlangıçlı epilepsi insidansı diğer tüm yaş gruplarına göre yüksektir ve çoğunda semptomatik epilepsi inme ile birliktelik gösterir. Genellikle yaşlı hastalar nispeten düşük dozlarda antiepileptik ilaç

dozlarına nöbetsiz hale gelebilirler. Fakat bu hastalarda eşlik eden hastalıkların ve tedavilerin çokluğu zararlı ilaç etkileşimleri açısından ürkütücü olabilmektedir (131). Yeni antiepileptiklerden özellikle levetirasetam inme sonrası nöbetlerin tedavisi için ilk tercih ilaç durumundadır (132). Vasküler beyin hasarları ile epilepsinin ortaya çıkardıkları sinaptik ve intrasellüler olayları benzerliği düşünülerek antiepileptik ilaçlar olası nöroprotektif etkileri bakımından inme hayvan modellerinde araştırılmışlardır (130).

Antiepileptik ilaçların içinde levetirasetam epilepsinin kontrol altına alınması ve nöroprotektif etkilerin görülmesi bakımından önemli bir yere sahiptir (132). Levetirasetamın bazı kısmi etki mekanizmalarının vasküler hasar sonrası nöroprotektif etkilerden sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Deneysel gözlemler levetirasetamın kainik asit gibi kimyasal etkenler tarafından oluşturulan nörotoksiteden direk koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermektedir (123). Levetirasetamın nöroprotektif etkileri, ratlarda tıkanmış orta serebral arter modelinde, merkezi serebral iskemi durumunda araştırılmıştır (132). Bu çalışmada levetirasetam uygulaması, sabit vücut sıcaklıklarında infarkt hacmini azaltmış, üstelik non-kompetitif N-metil-D-aspartik asit (NMDA) antagonistlerinin uygulamasından daha iyi sonuçlar alınmıştır (132).

Hücre içine kalsiyumun akışı hücreyi ölüme götüren olaylar kaskadının başlamasına sebep olur ve olasılıkla selektif olarak kalsiyum kanallarının blokajı nöroprotektif etki ortaya çıkarabilir. Farklı sayı ve tiplerde kalsiyum kanalları mevcuttur. N ve P/Q subtipleri nörotransmitterlerin salınımının kontrolünde görev alırlarken L tipi kanallar ise postsinaptik seviyede sinyal olaylarının düzenlenmesinde rol alırlar. Bu durum N ve P/Q subtiplerinin seçici şekilde düzenlenmesinin nöroprotektif stratejide etkili olabileceğini göstermektedir. Bu anlamda levetirasetam düşünülebilir. Çünkü T tipi kanalları değil, seçici şekilde N-tipi kanalları bloke ederek hücrelere kalsiyum girişini düzenler. Daha da ötesinde levetirasetamın hücre içindeki potasyum akışını azalttığı yönünde kanıtlar vardır. Bu yolla levetirasetam membran

depolarizasyonunu modüle eder ve geri dönüşsüz hücresel hasar meydana getirebilecek olayların önüne geçer (132).

Ayrıca, deneysel modellerde beyin iskemisi sırasında GABA nörotransmisyonunun güçlü şekilde deprese olduğu gösterilmiştir. Bu yüzden tüm presinaptik ve postsinaptik stratejilerde GABAerjik seviyelerin artırılmasının nöroprotektif bir etki ortaya çıkaracağı düşünülmektedir. Levetirasetam, direk olarak GABAerjik sistemi modüle ediyor olmasa da muhtemel farklı bir nöroprotektif etki olarak GABA devri (turnover) ve GABA-A antagonistlerinin etkileri ile ilişkili olabilir (132).

Eksitator transmisyonun negatif düzenlenmesi iskemiyeye karşı önemli bir korunma stratejisi olarak görülebilir. İyonotropik ve metabotropik (grup I) glutamaterjik reseptörlerin modülasyonu nöroprotektivitenin ana mekanizması olarak görülmelidir. Levetirasetam ile glutamat reseptörleri arasında direk bağlantı olduğuna dair bir kanıt bulunmamaktadır. Ancak santral sinir sistemi membranları boyunca spesifik bir hat boyunca eksitator iletimin negatif düzenlenmesi ile ilgili bir rol olduğu düşünülebilir. Özellikle levetirasetamın SV2A adlı bir sinaptik vezikül proteinine bağlandığı gösterilmiştir. Bu protein, sinaptik veziküllerde yerleşik integral transmembran proteinler ailesinin en çok eksprese olan üyesi olup üç farklı izoform olarak bulunmaktadır. SV2A'nın sinaptik morfolojide bir etkisi olmamasına rağmen vezikül fonksiyonlarının düzenlenmesinde çok önemli rolü vardır. Özellikle SV2A, sinaptik vezikülün kalsiyum bağımlı ekzositozunda düzenleyici birincil kalsiyum sensörü olan presinaptik sinaptotagmin proteini ile etkileşir. Böylece SV2A indirek olarak nörotransmitter salınımını düzenler. Bu yüzden levetirasetam SV2A fonksiyonunu düzenleyip eksitator iletimi engelleyerek nöroprotektif etki ortaya çıkarıyor olabilir (132).

Ayrıca levetirasetamın genetik transkripsiyon mekanizmalarını düzenleyerek direk nöroprotektif etkiler gösterdiği de öne sürülmektedir. Buna kanıt olarak da HeLa hücre hattında levetirasetamın majör metabolitinin histon deasetilazı bloke etmesi gösterilmektedir. Bu enzim, bazı proteinlerin lizin gruplarının hidrolizasyonunu katalize eder, kromatin yoğunlaşmasını (kondenzasyonunu) artırır ve gen transkripsiyonunu inhibe eder. Sonuç

olarak levetirasetam gibi histon deasetilaz inhibitörleri apoptoz için önemli genlerin ekspresyonunu düzenleyerek nöroprotektif etki gösterirler (132).

Nefirasetamın böyle ilgi çekici etkileri için de yapılmış çalışmalar mevcuttur. Nefirasetamın bilişsel düzenleyici etkilerinin nöronal iletimi düzenleyerek ortaya çıkardığı birçok çalışmada gösterilmiştir (133). Nefirasetamın morfin toleransı ve bağımlılığı gelişimini engellediği, hatta morfine duyarsız nöropatik ağrıda potent analjezik etki oluşturduğu gösterilmiştir. Bunun gibi nöromodülatör etkilerinin yanısıra nefirasetamın L ve N tipi Ca^{+2} kanallarının aktivasyonu vasıtasıyla nöroprotektif etkiler gösterdiği de bildirilmiştir. Nefirasetamın in vivo retinal iskemi reperfizyon modelinde ve in vitro olarak da nöroblastoma-retinal nöron hibrid hücre hattındaki iskemi reperfüzyon stress modelinde potent nöroprotektif etkileri gösterilmiştir. Bu modeller üzerinde nefirasetamın hem nekroz hem apoptoz gelişimini önlediği ve nöroprotektif etkiler gösterdiği gözlenmiştir (134).

Nefirasetam, levetirasetam ile aynı pirolidon kimyasal ailesinin bir üyesi olmasına rağmen bu iki ilaç amigdala hasarlı, MES veya pentilentetrazol (PTZ) nöbet modellerinde paralel olarak test edildiklerinde farklı anti-nöbet etkiler ortaya çıkarmışlardır ve bu durum altta yatan nöbet önleyici etkilerinin farklı olduğunu göstermektedir (128). Nefirasetamın nöbet önleyici etkileri fenitoin, karbamazepin, zonisamid, valproik asit ve diazepam gibi farklı klasik antiepileptik ilaçlarla da birçok epilepsi modelinde kıyaslanmıştır (128). Elde edilen sonuçlar özellikle GABA reseptör antagonisti kimyasal konvülzanların ortaya çıkardığı nöbetlerde etkili olduğunu ve olasılıkla nefirasetamın etkilerinin GABAerjik sistem üzerindeki etkilerle ortaya çıktığını göstermektedir. Ayrıca nefirasetamın voltaj bağımlı sodyum kanal blokörü antiepileptiklerle benzer etki profiline sahip olduğunun görülmesi de önemlidir (128). Nefirasetamın glutamat ile indüklenen nörotoksite modelinde oldukça başarılı şekilde etki göstermesi nefirasetam tedavisinin nöbet önleyici etkisinin primer mekanizmalarından birinin de glutamat antagonizması olabileceğini göstermektedir (135).

Nefirasetamın geleneksel antiepileptik ilaçlardan farklı olarak N/L tipi Ca^{+2} kanallarını etkileyip nörotransmitterlerin salınımını düzenleyerek nöronal

disfonksiyonu düzelttiği rapor edilmiştir. Nefirasetamın birçok iskemik modelde in vitro ve in vivo nöroprotektif etkileri olduğu bildirilmiştir. Kainik asit ile indüklenmiş epilepsi modelinde de nefirasetamın davranışsal nöbetlere çok az etkili ya da etkisiz olduğu, fakat hippokampüste histopatolojik değişiklikleri önemli derecede inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu durum nefirasetamın nöroprotektif etkilerinin nöbet önleyici etkilerle ilişkisiz olduğunu göstermektedir (128).

2.6.NÖROTOKSİSİTE VE NÖROPROTEKTİVİTE DENEYLERİ

Sinir sisteminde nöronlar ve nöroglial hücreler vardır. Nöronların farkı akson ve dentritlere sahip olması ve bunlar aracılığı ile diğer nöron ve nöroglial hücreler ile haberleşmeyi sağlamasıdır. Dentritler ise nöron yüzeyini artırarak diğer hücrelerden input almayı kolaylaştırır. Nöronal hücre membranının yapısal komponentlerinin korunması için gerekli faktörleri üreterek, hücre fonksiyonunu korur. Bunlardan bir tanesi olan myelin, aksonun etrafını sarar. Böylelikle hücre algılama iletişim birleştirme ve saklama işlemlerini yürütür. Hücre toksik bir etkiye maruz kalırsa perikaryonun direkt etkilenmesi veya trofik faktörlerin kaybolmasına bağlı sinapsın bozulması ile yozlaşma başlar. Burada hasarı belirleyen toksisitenin şiddet ve süresi ile kalıcılığıdır. Dejenerasyon süreci oluşan mekanizmaya bağlı olarak hızlı veya yavaş gerçekleşebilir (136, 137). Geciken nörotoksik etki, nöropati target esteraz (NTA) enzim düzeyini kültür ortamında ölçerek gösterilebilir (138). Herhangi bir maddenin nöronda meydana getirdiği toksik etkileri azaltan veya yok eden moleküller için ise nöroprotektif etkilerden söz edilir.

Kültür ortamı için gerekli ve önemli şartlar vardır. Dış ortamdaki hücreler aynı vücuttaki gibi optimal sıcaklık, pH, O₂ ve besinleri kültür ortamında hiçbir eksik olmadan kullanır. Kullanılan medyum plazmaya yakın benzerdir. İnkübatör de hem sıcaklık optimuma getirilirken aynı zamanda hücre oksijenlenmesi sağlanmaktadır. Hücreler bu optimal koşullarda kültür tabaklarında (flask) çoğalırlar. Nörotoksik bileşikler ise bu süreçte kritik hücresel mekanizmaları etkileyerek (aksonal transport gibi) nörit

uzamasını inhibe ederler (139). Böylece nöron diğer hücreler ile temasını sağlayacak nöritlerden yoksun kalır. Bu süreci fare kaynaklı nöroblastoma NB2a hücre dizininde oldukça iyi ve hassas olarak gözlemleyip ölçebiliriz. Ancak şiddetli toksik etki hücre ölümüne yol açarken ılımlı veya hafif toksik etki ise etkinin şiddetine göre nörit uzamasını engeller. Kültürde nöronların farklılaşması sürecinde nörit uzatma (neurite Outgrowth) fizyolojik bir süreçtir ve bu süreç nöronun sağlıklı geliştiğini gösteren oldukça iyi bir indikatördür (140). Hücreyi öldürmeyen ancak nörotoksik etki gösteren moleküllerin belirlenmesinde bu ölçüm sıkça kullanıla gelen bir yöntemdir. Nörit uzamasının izlenmesi yeni moleküllerin nörotoksik aktivitelerini araştırmak için kullanılan bir yöntemdir. Bu inhibisyonun derecesi ile uygulanan maddelerin nörotoksik etki gücü paralellik gösterir. Nörotoksik etki çok güçlü ise nöron ölümü gerçekleşir.

2.6.1. Nörotoksisite Tarama Testi (NTT)

Nörotoksik maddelerin in vitro test tekniklerinde hücre üzerine etkisi selektif bir şekilde olmaktadır. Bu spesifik duyarlılık bileşiğin ekstrasellüler konsantrasyonuna da bağlıdır. Genellikle ana bileşiğe bağlı toksik etki meydana gelmekte ise de, bazı durumlarda metabolitlerin de toksik etkileri görülebilir. Toksik maddenin fizikokimyasal özelliklerinin toksik etkiyi direkt olarak etkilediği bilinmektedir. Hücre substratum ilişkisi toksik etkide önemlidir (141, 142, 143). İn vitro ortamda nöronların temel fonksiyonu olan nörit uzaması, aksonal transport gibi kritik hücresel olaylara bağlıdır. Nörit uzaması, mikrotubil birleştirici protein ve nörofilament proteini gibi nörit için özel yapısal elemanlara bağlı gelişir. Biyolojik, kimyasal ve çevresel toksik maddeler nörit uzamasını engeller. Nörit geliştiren faktör, nöronotrofik faktör ve glial maturasyon faktörü nörit uzamasının gelişim sürecinde rol oynarlar. Bu nedenlerle nörit uzamasının izlenmesi yeni moleküllerin nörotoksik aktivitelerini araştırmak için kullanılabilir (144, 145, 146, 147).

Bu çalışmada levetirasetam ve nefirasetamın fare nöroblastoma hücre dizininde (NB2a) nörotoksisite tarama testi ile nörotoksik veya nöroprotektif etkilerini görmek için uygulanan konsantrasyonlarda nöronlar üzerindeki

etkileri, çoğalma ve ölüm gibi davranış mekanizmaları, in vitro olarak araştırılmıştır.

2.6.2. MTT Boyama

İlk olarak Mosmann tarafından tanımlanan ve daha sonra Alley ve ark. tarafından geliştirilen 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromid (MTT) yöntemi, hücre canlılığının belirlenmesi için sıkça kullanılan kolorimetrik bir yöntemdir. Deneyin esası; formazan oluşumuna bağlı olarak hücre yaşayabilirliğinin ölçülmesidir (148). MTT, kültür ortamındaki mitokondriyal aktivitesi devam eden canlı hücrelerin kantitasyonunu sağlar. En sık kullanım alanları: Sitokinlerin, büyüme faktörlerinin medyum komponentlerinin hücreler üzerine etkilerinin araştırılması ve sitotoksik ajanların etkinliğinin test edilmesidir. MTT suda çözünen bir tetrazolium tuzu olup fenol kırmızısı içermeyen medium veya tuz solüsyonlarında hazırlandığında sarımtırak bir solüsyon oluşturur. Tetrazolium halkasının dehidrogenaz enzimlerince parçalanması sonucu MTT mor renkli çözünmeyen formazan'a dönüşür. Bu dönüşüm canlı hücrelerin mitokondrileri aracılığı ile olur. Oluşan bu formazan izopropanol veya başka bir çözücü yardımı ile çözünür hale getirilir ve oluşan renk reaksiyonu spektrofotometrik olarak okunup kantite edilir (149).

MTT, aktif olarak absorbe olur ve mitokondriyal redüktaz enzimi ile formazan'a indirgenir. Oluşan bu renkli çözeltinin miktarı 570 nm dalga boylarında ölçüm yapılarak hesaplanır. Bu olay sadece canlı hücrelerde gerçekleşebileceği için bu test, hücre canlılığının ölçütü olarak güvenle kullanılmaktadır (148).

2.6.3. TUNEL yöntemi

DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağlar. Apoptotik parçalanma sonucu DNA uçları, DNA polimeraz veya Klenow fragmenti kullanılarak işaretlenebilmektedir. Ancak terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) kullanılarak yapılan işaretleme göreceli olarak daha duyarlı bir yöntem olarak bulunmuştur. Konvansiyonel parafin kesitleri, TdT ve nonizotopik işaretli nükleotidler (sıklıkla biyotinli dUTP) kullanılarak yapılan in situ işaretleme ardından floresan veya enzimatik görüntüleme, apoptotik hücreleri diğerlerinden ayırmada yeterli olmaktadır. Bu yöntem yaygın olarak “TdT-dUTP nick-end-labelling” sözcüklerinin kısaltılması olan “TUNEL” yöntemi adıyla anılmaktadır (150, 151, 152).

3. MATERYAL VE METOD

Çalışma Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Ab. D.' da Hücre Kültürü Laboratuvarında tamamlanmıştır.

Hücre dizini; Fare nöroblastoma 2a hücreleri (NB2a)

3.1. Nörotoksite Tarama Yöntemi

Nöroblastoma hücreleri kültür ortamında (flask içinde) %5 fetal calf serum, %5 horse serum, %1 penisilin/streptomisin solüsyonu (10000 U/10mg) ve %0.1 gentamisin (50 mg/ml) içeren yüksek glukoz konsantrasyonlu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ile 37C° ve %5 CO₂ koşullarını sağlayan etüv içinde çoğaltıldı (139, 140, 148).

Proliferasyon medyumu:

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

Diferensiyasyon (farklılaşma) Medyumu:

%0.1 Penisilin/streptomisin solüsyonu + 1 mM d-cAMP + gentamisin solüsyonu üzerine 100 ml tamamlanacak şekilde yüksek glukozlu DMEM ilavesi ile elde edildi.

Nörotoksisite Tarama Testi

İlk gün, tüm kuyucuklara 500 µl hacimde proliferasyon medyumu içerisine her kuyucukta 15 000 hücre olacak şekilde NB2a hücresi kondu. 24 saat sonra ilk üç kuyucukta (well) proliferasyon medyumu (negatif kontrol) ve geri kalan tüm kuyucuklardan medyum çekilerek serum içermeyen DMEM içine dibütiril cAMP (1 mM) farklılaşma medyumu (diferensiyasyon medyumu) eklendi. Üç kuyucuğa herhangi bir madde eklenmedi (pozitif kontrol). Diğer

kuyucuklara her 3 kuyucuğa bir konsantrasyon olacak şekilde 1, 3, 10, 30 ve 100 µM konsantrasyonda levetirasetam ve 1, 3, 10, 30 ve 100 µM konsantrasyonda nefirasetam konuldu.

24 saat sonra hücreler 10 dakika %4 formaldehid (PBS içinde) fikse edildikten sonra 3 dakika Coomassie Blue boyasında (%0.6) bekletildi. Boyanmış örnekler daha sonra PBS ile yıkandı. Daha sonra ışık mikroskobu altında rasgele seçilen 10 farklı sahadan 100 hücredeki nörit uzunlukları görüntü analiz sistemi ile ölçüldü. Ölçülen nörit uzunluğu değerleri % inhibisyon ile değerlendirildi (149).

% inhibisyon: $\frac{\text{Pozitif kontrol nörit uzunluğu} - \text{ilaç nörit uzunluğu}}{\text{Pozitif kontrol nörit uzunluğu} - \text{negatif kontrol nörit uzunluğu}} \times 100$

Pozitif kontrol nörit uzunluğu - negatif kontrol nörit uzunluğu

Klorprifos İle Oluşturulan Nörotoksisite Üzerine NTT

İlk gün, tüm kuyucuklara 500 µl hacimde proliferasyon medyumu içerisine her kuyucukta 16 000 hücre olacak şekilde NB2a hücresi kondu. 24 saat sonra ilk üç kuyucukta (well) proliferasyon medyumu (negatif kontrol), geri kalan tüm kuyucuklardan medyum çekilerek serum içermeyen DMEM içine dibütiril cAMP (1 mM) farklılaşma medyumu (diferensiyasyon medyumu) ve klorprifos 25 µM konsantrasyonlarda eklenerek nörotoksisite oluşturuldu. Her 3 kuyucuğa, 1, 3, 10, 30 ve 100 µM konsantrasyonda nefirasetam ve 1, 3, 10, 30 ve 100 µM konsantrasyonda levetirasetam kondu. Kültür tabağındaki üç kuyucuğa herhangi bir madde eklenmedi (pozitif kontrol).

24 saat sonra hücreler 10 dakika %4 formaldehid (PBS içinde) fikse edildikten sonra 3 dakika Coomassie Blue boyasında (%0.6) bekletildi. Boyanmış örnekler daha sonra Phosphate-buffered saline (PBS) ile yıkandı. Sonra ışık mikroskobu altında rasgele seçilen 10 farklı sahadan 100 hücredeki nörit uzunlukları görüntü analiz sistemi ile ölçüldü. Ölçülen nörit uzunluğu değerleri % inhibisyon ile değerlendirildi (149).

% inhibisyon: Pozitif kontrol nörit uzunluğu- ilaç nörit uzunluğu x100

Pozitif kontrol nörit uzunluğu- negatif kontrol nörit uzunluğu

Klorprifosun Nörotoksik Etki Düzeyi

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

24 saat sonra hücreler 10 dakika %4 formaldehid (PBS içinde) fikse edildikten sonra 3 dakika Coomassie Blue boyasında (%0.6) bekletildi. Boyanmış örnekler daha sonra PBS ile yıkandı. Sonra ışık mikroskobu altında rasgele seçilen 10 farklı sahadan 100 hücre deki nörit uzunlukları görüntü analiz sistemi ile ölçüldü. % 100 Nörit inhibisyonu yapan konsantrasyonu araştırıldı (149). En etkin en düşük konsantrasyon olarak 25 µM tespit edildi.

% inhibisyon: Pozitif kontrol nörit uzunluğu- ilaç nörit uzunluğu x100

Pozitif kontrol nörit uzunluğu- negatif kontrol nörit uzunluğu

3.2. MTT Metabolizması

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

İlk gün, tüm kuyucuklara 300 µl hacimde proliferasyon medyumuna içerisinde her kuyucukta 16 000 hücre olacak şekilde NB2a hücresi konularak

24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra ilk kuyucuktan başlayarak sırasıyla negatif kontrol (proliferasyon medyum), 1, 3, 10, 30 ve 100 μ M konsantrasyonlarda olacak şekilde deney düzeneği oluşturuldu. Kuyucuklardan proliferasyon medyum çekilerek yerine serum içermeyen medyum ve bu medyumda içerisinde hazırlanan dibütiril-cAMP (1 mM) (farklılaşma medyum) eklendi. Negatif kontrol kuyucuklarına sadece proliferasyon medyum konuldu. Daha sonra farklı konsantrasyonlardaki nefirasetam ve levetirasetam eklenerek 24 saat inkübasyona bırakıldı. Üçüncü gün, nefirasetam ve levetirasetam içeren farklılaşma medyumları çekilerek hücrelerden uzaklaştırıldı ve her bir kuyucuğa 100 μ l taze medyum konuldu ve üzerine 10 μ l 12 mM MTT stok solusyonundan eklendi. İnkübatörde 4 saat 37°C'de bekletildi. İnkubasyon sonrası MTT içeren medyum pipetle çekilerek uzaklaştırıldı. Hücrelere 50 μ l DMSO (DMSO, A3672, Darmstadt, Germany) eklendi, oda ısısında 10 dk süreyle bekletildi. Absorbans 570 nm'de dalga boyu seçicisi sistemli mikropilaka okuyucu spektrofotometrede (ELx800UV, BioTek) tespit edildi. Her deney 3 kez tekrarlandı. Kontrol grubuna göre ölçülen absorbanslar karşılaştırılarak kimyasal verilen gruplardaki yaşam ve proliferasyon hakkında bilgi edinildi (149).

3.3. TUNEL Boyaması

Apopitotik hücre ölümünün belirlenmesinde **Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling** (TUNEL, S7101, Millipore, USA) boyama yöntemi kullanıldı. Hücreler her bir kuyucuğa yaklaşık 45.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilerek 24 saat inkübe edildi. Ertesi gün hücrelere farklı konsantrasyonlarda levetirasetam ve nefirasetam uygulanarak 24 saat bekletildi. 24 saat sonra hücrelere %4'lük paraformaldehid solüsyonu ile 30 dk fiksasyon işlemi uygulandı.

Arkasından önce distile su ile 3 defa sonra 5'er dakika ara ile 3 kez PBS ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra PBS ile 1/500 oranında dilüe edilen 20- μ g/ml Proteinaz-K 37°C'de 15 dakika uygulandı. 5'şer dakika 3 kez PBS ile yıkamayı takiben 5 dk %3'lük hidrojen peroksit ile muamele edildikten

sonra yeniden 5'şer dakika 3 kez PBS ile oda ısısında yıkandı. Örnekler 5 dk Equilibration buffer ile oda ısısında tutulduktan sonra TdT-enzimi ile nemli atmosferik ortamda 37⁰C de 1 saat plastik slipler kesitleri kapatacak şekilde bekletildi. Süre bitiminde Stop Wash Buffer ile 10 dk bekletildikten sonra Antidioksigenin Peroksidaz Konjugatı ile 30 dk muamele edilen örnekler 5'şer dakika 3 kez PBS ile yıkandı. Ardından DAB (Diaminobenzidin) ile boyama yapıldı, birkaç kez distile su ile yıkandı.

Artalan boyaması Mayer's Hematoksileni ile yapıldı (Tablo 1). Kör yöntemle TUNEL pozitif hücreler saptandı. Daha sonra istatistiksel olarak gruplar değerlendirildi.



Tablo 1: TUNEL Boyama Protokolü

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

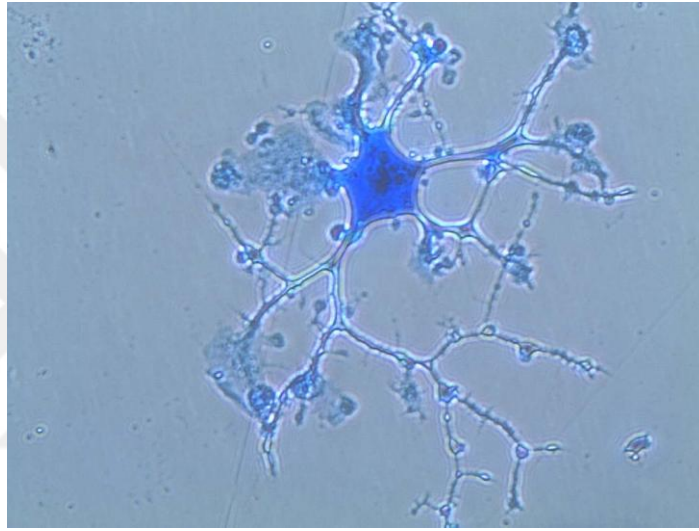
3.4. İstatistik

Veriler ortalama $\pm$ Standart hata ile belirtildi. Birden çok grubun olması nedeni ile tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey's B ile değerlendirildi. $P < 0,05$ değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Nörotoksisite Tarama Testi Sonuçları

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



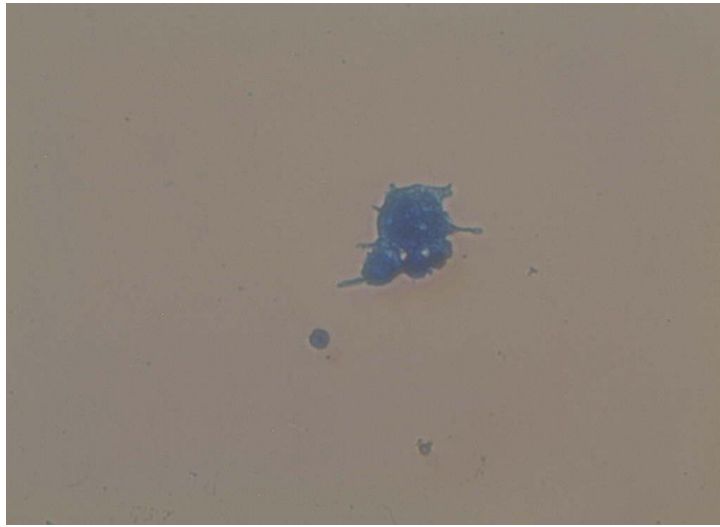
Resim 1: d-cAMP ile farklılaştırılan NB2a Kültür Hücresi görüntüsü x400

Yapılan NTT ile NB2a hücrelerinin nörit uzunlukları hesaplandı. Bu ölçümler sonrasında her iki ilacın tüm konsantrasyonlarda ılımlı nörotoksik etkileri görülmedi. Sadece 30 ve 100 μM konsantrasyonlarda nörit uzamasında hafif bir azalma görüldüyse de bu istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$).

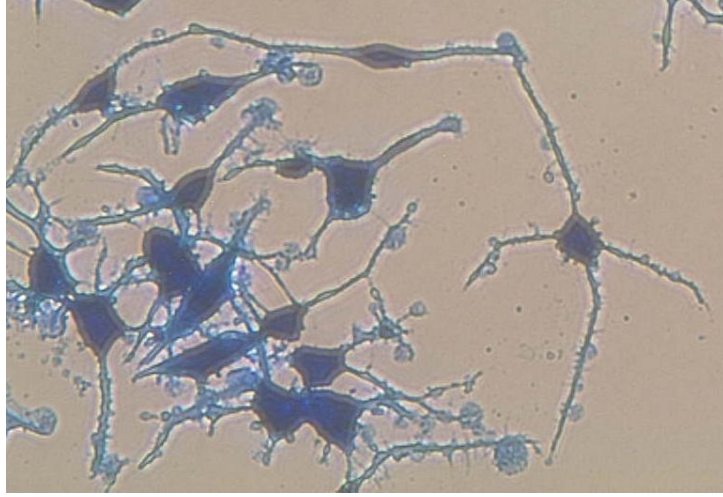
Çalışmamızın 2. Bölümünde ise klorprifos uygulanarak NB2a hücrelerinde nörotoksisite oluşturuldu (resim 2). Her iki ilaç değişik konsantrasyonlarda kültür tabağına eklendi. Klorprifos eklenerek yapılan NTT 1 ve 3 μM konsantrasyonlarda sırasıyla levetirasetamda % 98 ve % 87 oranında inhibisyon saptandı ($p<0.001$). Aynı şekilde nefirasetam için de

özellikle 1 ve 3 μM konsantrasyonlarda ileri derecede nörit inhibisyonu görüldü. Sırasıyla % 96 ve % 80 oranlarında nörit inhibisyonu yaptığı görüldü. Her iki bileşiğin 10 μM konsantrasyonlarından itibaren nörit inhibisyonunu azalttığı ve nöroprotektif etki gösterdiği tespit edildi. Levetirasetam 10 μM konsantrasyonunda %40, 30 μM konsantrasyonlarında %22 ve 100 μM konsantrasyonlarında ise %5 oranında nörit inhibisyonuna yol açtığı bulundu. kültür ortamında klorprifos ile azalan nörit inhibisyonu nefirasetamın 10 μM konsantrasyonunda %50, 30 μM konsantrasyonlarında %38 ve 100 μM konsantrasyonlarında ise %25 oranında nörit inhibisyonuna yol açtığı bulundu.

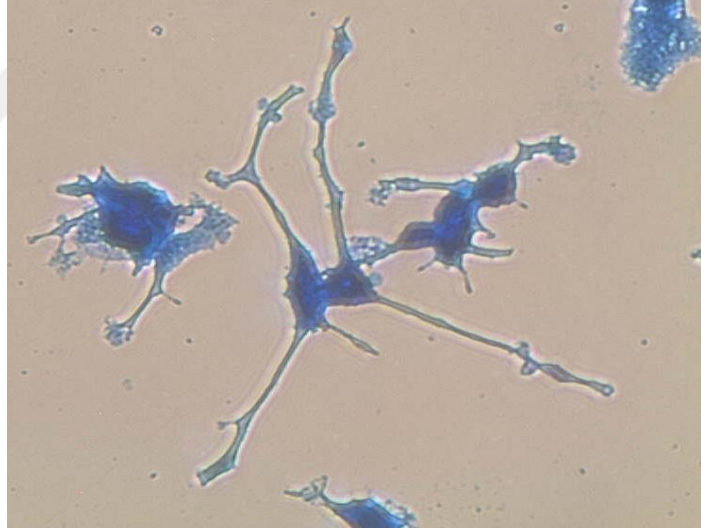
Özellikle klorprifos ile nörotoksisite oluşturulan NB2a hücrelerinde her iki ilacın 10 μM konsantrasyonlarından itibaren nörit inhibisyonunu azalttığı görüldü. Özellikle levetirasetam 30 μM ve 100 μM konsantrasyonlarında klorprifos ile oluşturulan ılımlı nörotoksik etkiyi geriye çevirirken nefirasetam uygulamasında bu etki ancak 100 μM konsantrasyonda görülmüştür. (Grafik 1, 2, 3)



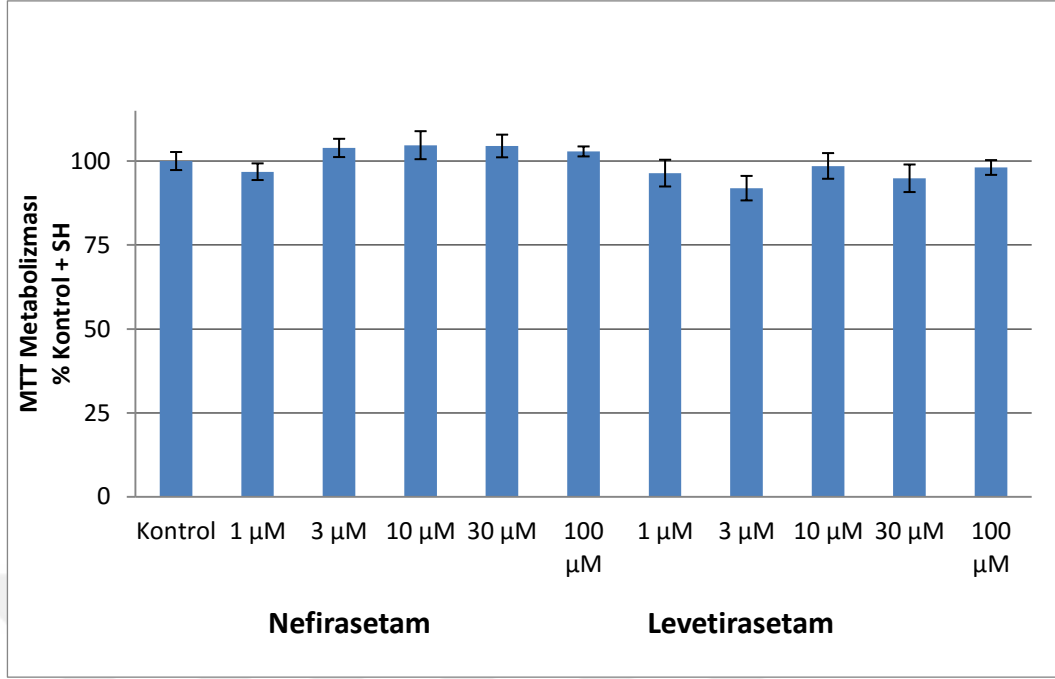
Resim 2: 25 μM klorprifos konsantrasyonu ile NB2a hücrelerinde oluşturulan nörit uzamasının inhibisyonu görüntüsü x400.



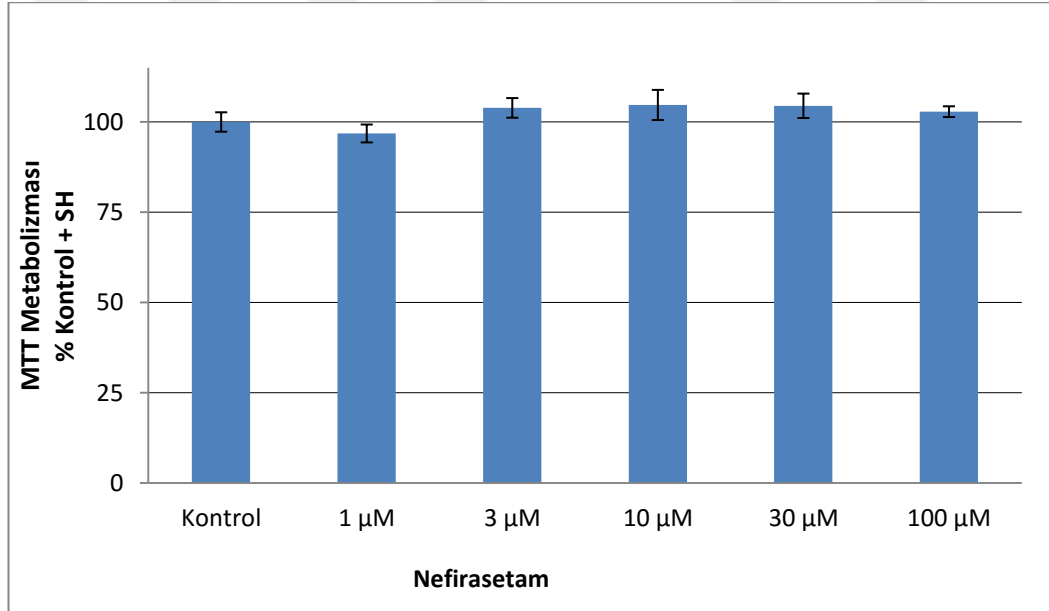
Resim 3: 25 μ M klorprifos konsantrasyonu ile NB2a hücrelerinde oluşturulan nörit uzaması inhibisyonunun 30 μ M konsantrasyonda levetirasetam ile geri döndürülmesi görüntüsü x400.



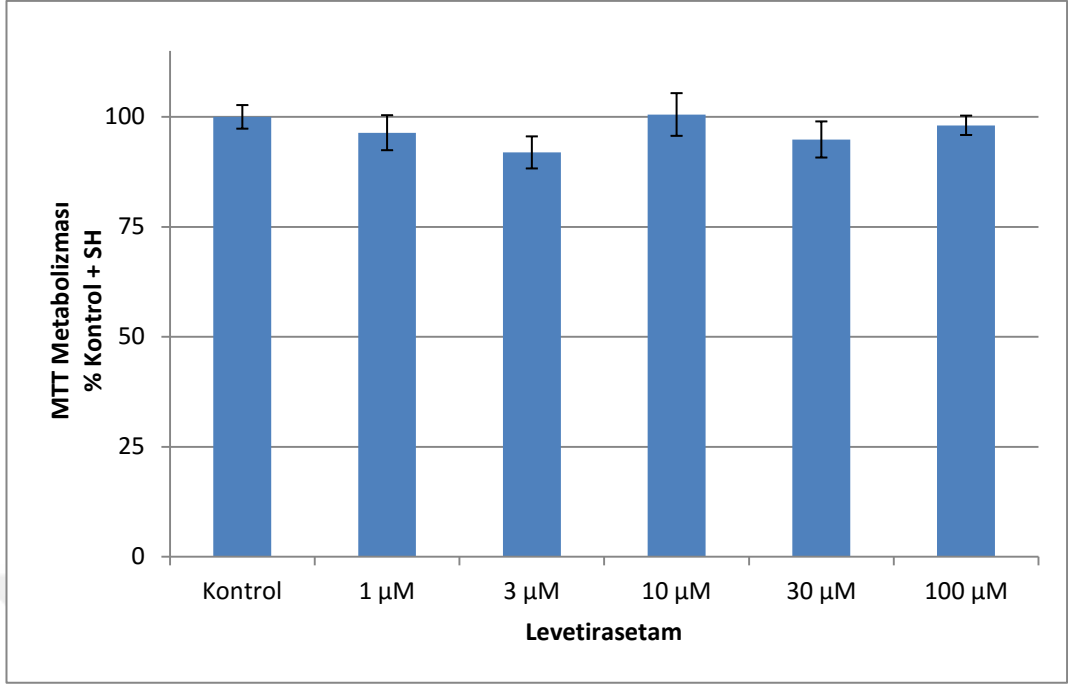
Resim 4: 25 μ M klorprifos konsantrasyonu ile NB2a hücrelerinde oluşturulan nörit uzaması inhibisyonunun 30 μ M konsantrasyonda nefirasetam ile geri döndürülmesi görüntüsü x400.



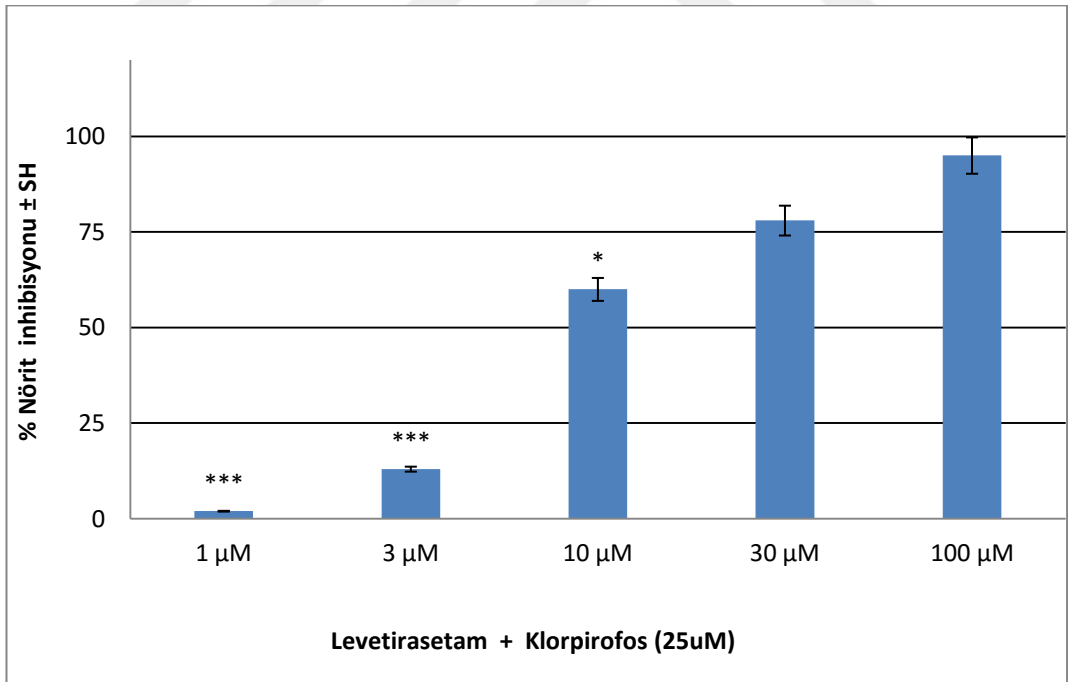
Grafik 1: NB2a hücrelerinde ilaçların farklı konsantrasyonlarında nörit inhibisyonu üzerine etkisi. $p>0.05$



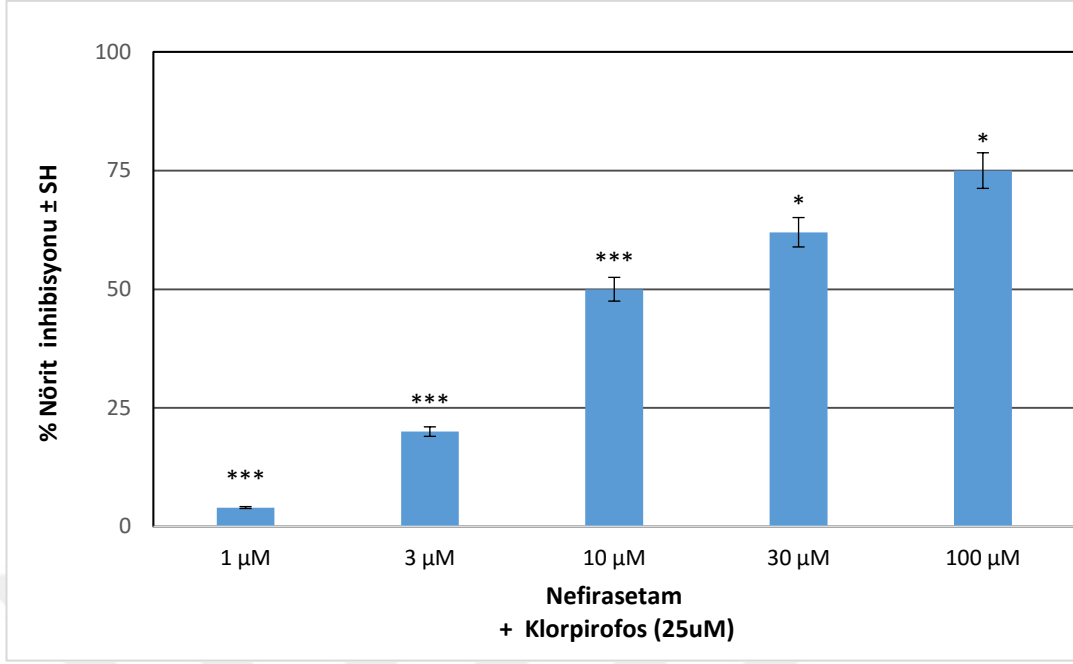
Grafik 2: NB2a hücrelerinde nefirasetamın farklı konsantrasyonlarında nörit inhibisyonu üzerine etkisi. $p>0.05$



Grafik 3: NB2a hücrelerinde levetiresetamın farklı konsantrasyonlarında nörit inhibisyonu üzerine etkisi. $p>0.05$



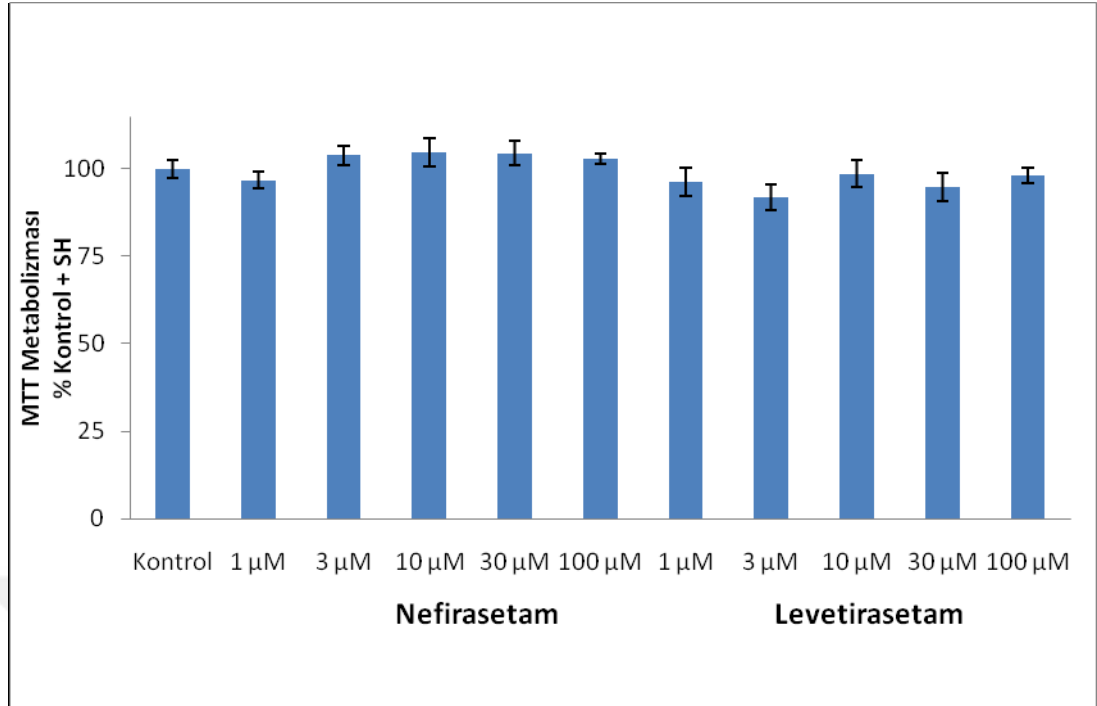
Grafik 4: 25 µM konsantrasyonda klorprifos uygulanan NB2a hücreleri üzerine levetiresetamın farklı konsantrasyonlarındaki nörit inhibisyonuna etkisi. *** $p<0.001$, * $p<0.05$



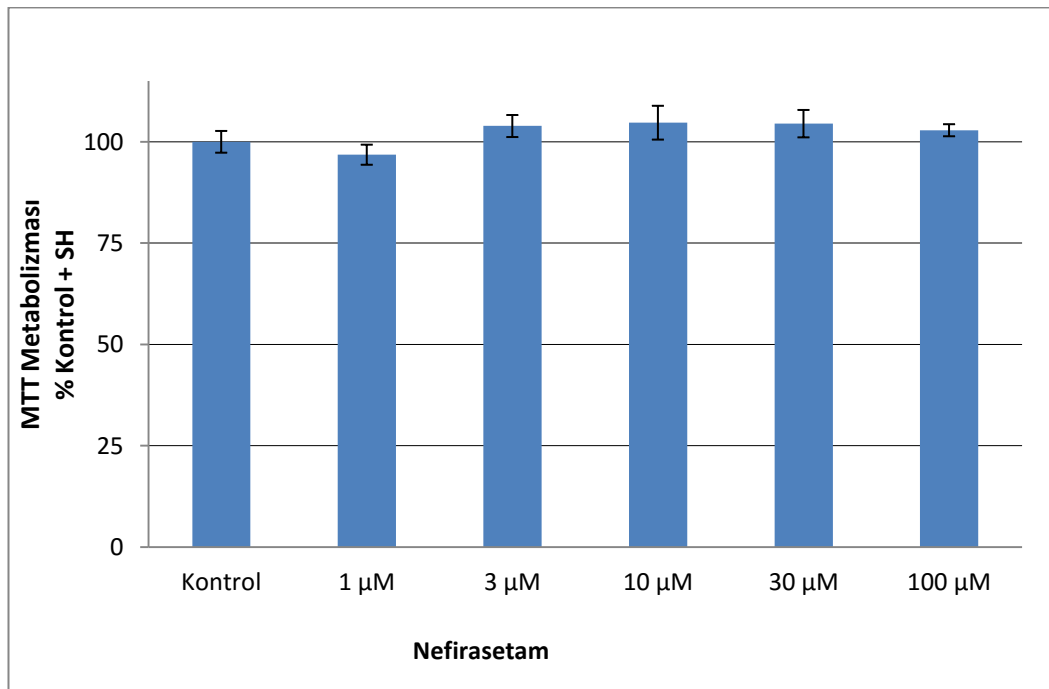
Grafik 5: 25 µM konsantrasyonda klorprifos uygulanan NB2a hücreleri üzerine nefirasetamın farklı konsantrasyonlarındaki nörit inhibisyonuna etkisi. *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$

4.2. MTT Metabolizması Sonuçları

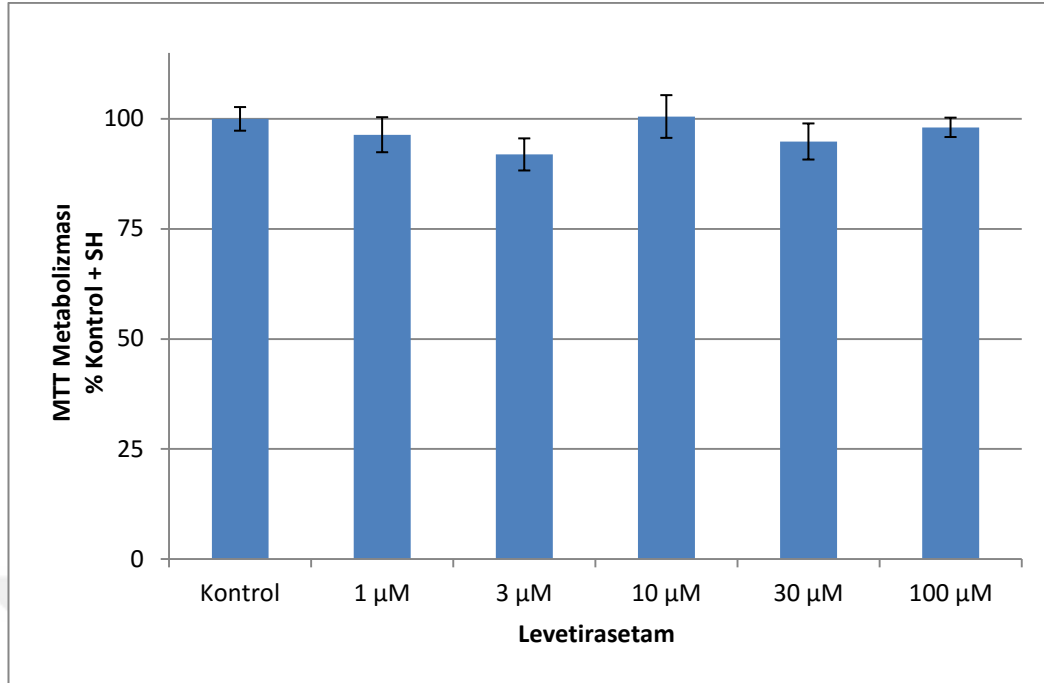
Nöroblastoma hücreleri levotirasetam ve nefirasetamın 1, 3, 10, 30 ve 100 µM dozları ile muamele edildikten sonra inkübe edilerek ilaç uygulanmayan bir kontrol grubu ile kıyaslanmak üzere MTT ölçümü yapıldı. Bu yöntem ile uyguladığımız ilaçların NB2a hücrelerin hücre çoğalması üzerine olası etkileri gözlenmeye çalışıldı. Üç tekrar yapılan ölçümlerde farklı konsantrasyonlarda uyguladığımız her iki ilacın hücre çoğalması üzerinde anlamlı bir etkiye sahip olmadıkları saptandı ($p > 0,05$). (Grafik 7, 8 ,9)



Grafik 6: Her iki ilacın farklı konsantrasyonlarında MTT metabolizması üzerine etkileri, $p>0.05$.



Grafik 7: Nefirasetamın farklı konsantrasyonlarında MTT metabolizması üzerine etkileri, $p>0.05$.

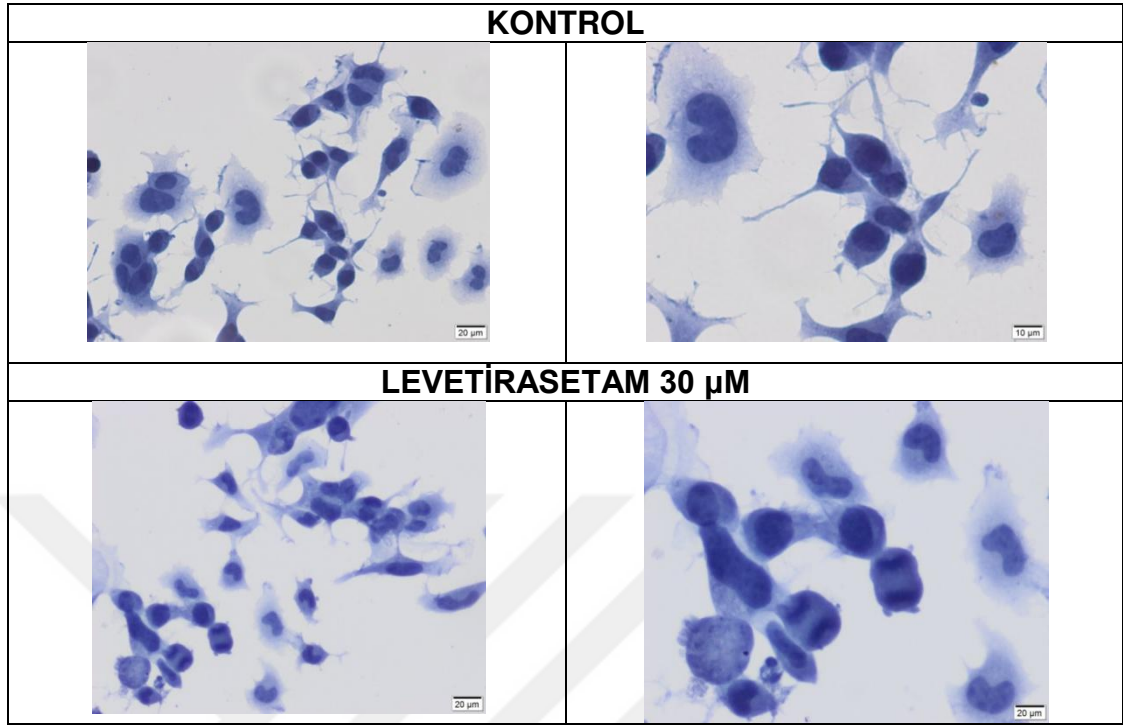


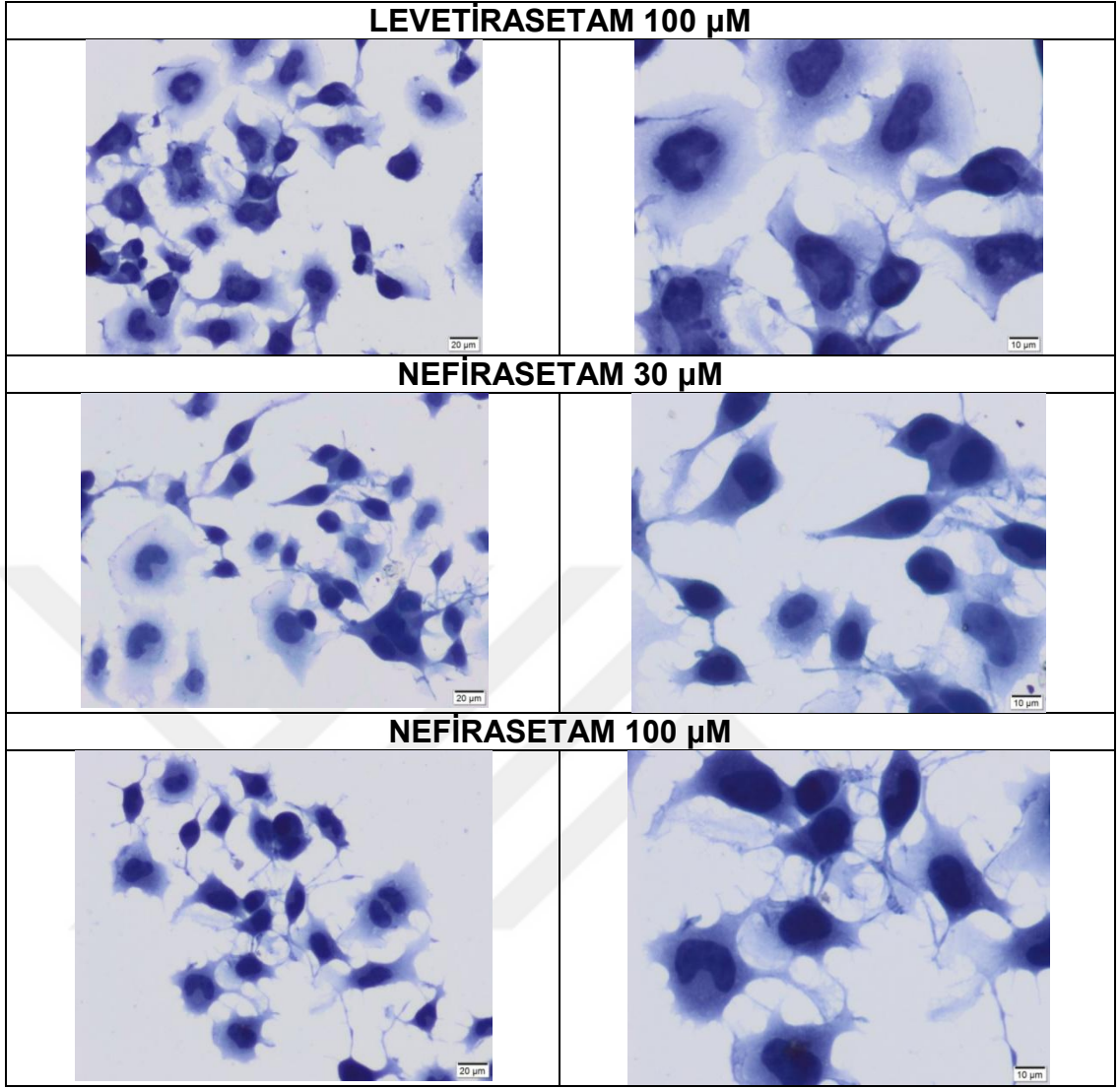
Grafik 8: Levetirasetamın farklı konsantrasyonlarında MTT metabolizması üzerine etkileri, $p>0.05$.

4.3. TUNEL Boyama Sonuçları

Nörolastoma hücre hattı ile levetirasetamın ve nefirasetamın 30 ve 100 μM dozları ile üç tekrar halinde TUNEL boyaması yapıldı. Yapılan boyamalarda ilaçların 2 farklı konsantrasyonunda toksik ve apoptotik etkileri gözlenmeye çalışıldı. Yapılan boyamalardan elde edilen gözlemlerde gelişen nöroblastoma hücrelerinin sağlıklı olduğu görüldü. Sağlıklı gelişen ve yapışan bu hücrelerin nörit uzattıkları da gözlemlendi. Görüntülenen NB2a hücreleri sağlıklı ve yapışan az miktarda nörit uzatmış hücreler olup toksik etki ve apoptoz gözlemlenmedi.

Fare kaynaklı nöroblastoma hücreler üzerinde levetirasetam ve nefirasetamın uygulanan 2 farklı dozunda TUNEL pozitif boyanan hücrelerin sayısı apoptotik indeks olarak hesaplandı. Levetirasetam ve nefirasetam için 30 ve 100 μM dozları ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi. ($p>0.05$) .





Resim 5. İlaç uygulama sonrası TUNEL boyaması görüntüleri.

5. TARTIŞMA

Levetirasetam tüm dünyada jeneralize epilepsilerin tedavisinde kullanılan antiepileptik ilaçlardan biridir. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde levetirasetam yalnızca parsiyel başlangıçlı epilepside ek tedavi ilacı olarak onay almıştır. Ülkemizde ise miyoklonik nöbetlerde ilave tedavi olarak ve sekonder jeneralize olan ya da olmayan parsiyel başlangıçlı nöbetlerin tedavisinde kullanılır. Levetirasetam Pirasetam'ın etil analogunun S-enantiomeridir. Levetirasetam vücutta değişmeden böbreklerden atılır. Hastaların çoğunun 1000 mg/gün dozda nöbetlerinin olmadığı gösterilmiştir ve bu dozdaki plazma değeri $6,5 \pm 2,4$ µg/mL ölçülmüştür (114). Levetirasetamın SV2A proteinine bağlanarak etki ettiği düşünülmektedir (118). İn vitro çalışmalarda N-tipi yüksek voltajlı aktive kalsiyum kanallarını kısmi olarak kapatarak hücre içi depolardan kalsiyumu azaltarak etki ettiği de gösterilmiştir. Aynı zamanda GABA ve glisin ile düzenlenen akımlardaki azalmayı kısmen tersine çevirebildiğini belirten yayınlar da vardır (118).

Levetirasetamla yapılan hayvan çalışmalarında nöbetleri kontrol altına almasının yanında nöronları koruyucu etkisinin de olabileceği bildirilmiştir (122). Levetirasetamın erişkin sıçanlarda pilokarpinin indüklediği nöbetlerde hipokampüste lipid peroksidasyonunu ve oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir (124).

Levetirasetamın epilepsi tedavisi için kullanılan dozunun birkaç kat üstünde dahi nöronların ölümüne neden olmadığı ve bu durumun fenobarbital, fenitoin, valproat gibi geleneksel antiepileptik ilaçlara göre önemli bir üstünlük olduğu ileri sürülmüştür (125). Bizim çalışmamızda da levetirasetam NB2a hücrelerinde nörotoksisite tarama testinde nörit inhibisyonu yapmamıştır. Ayrıca MTT testinde de kontrole göre ilaç uyguladığımız hücrelerimizde hücre proliferasyonunda anlamlı bir fark olmamıştır. Bu durum GABA ve glutamat üzerinden yaptığı olumlu etkiler ile veya levetirasetamın genetik transkripsiyon mekanizmalarını düzenleyerek direk nöroprotektif etkiler gösterdiği hipotezi ile açıklanabilir.

Kim ve ark. yaptıkları bir çalışmada status epileptikus oluşturulan yenidoğan sıçanlarda levetirasetamın yüksek dozlarda beyin dokusunda apoptozu önlediği histopatolojik olarak gösterilmiştir (125). Çalışmamızda 30 ve 100 µM konsantrasyonlarda uygulandığında apoptotik hücre sayısında herhangi bir artışa neden olmadığını saptadık. Levetirasetamın bu etkiyi histon deasetilaz inhibitörleri gibi apoptoz için önemli genlerin ekspresyonunu düzenleyerek yapabildiğini düşünmekteyiz.

Levetirasetamın sinaptik vezikül proteini 2A'ya (SV2A) bağlanarak etkisini gösterdiği de iddia edilmektedir (118). Nöronda SV2A proteinine bağlanarak, vezikülden glutamat salınımını engellediği böylece nöronprotektif etkisi gösterdiği düşünülmektedir. Bizim çalışmamızda da nöron koruyucu etkilerini glutamat salınımı engelleyerek ve antiapoptotik mekanizmalar ile hem ılımlı hemde hücre ölümlerine neden olabilen nörotoksik etkiyi geri çevirdiğini düşündük. Nefirasetam da levetirasetam gibi nöronları koruduğu ancak ona göre etkisinin daha düşük olduğunu gördük. Nefirasetamın koruyucu etkisinin ise GABA düzeyini artırıcı etkisi ile olabileceğini öngörmekteyiz.

Nefirasetam kognitif düzenleyici etkiler gösteren bir başka pirolidon türevi antiepileptik bir ilaçtır. Nefirasetam [N-(2,6-dimethylphenyl)-2-(2-oxo-1-pyrrolidinyl) acetamide, DM-9384] günümüzde pirolidon türevi nootropik ajanlar içinde Alzheimer hastalığı ile ilişkili ya da serebrovasküler hastalıklara sekonder gelişen demansın tedavisi içinde kullanılmaktadır. Yapılan deneysel çalışmalarda birçok hayvan modelinde kognisyon-artırıcı etkiler gösterdiği belirtilmektedir. Elektrofizyolojik ve nörokimyasal çalışmalarda nefirasetamın N/L-tip Ca^{+2} kanallarını ve kolinerjik, monoaminerjik ve g-aminobutirik asit (GABA)-erjik sistemleri aktive ettiğini göstermiştir Bu mekanizmalar aracılığı ile antiepileptik ve kognitif fonksiyonlarda iyileşmeye neden olduğu bildirilmiştir(128).

Nootropik bir ilaç olarak nefirasetamın normal ve beyin hasarlı hayvanlarda öğrenme ve bellek artırıcı etkileri bazı yayınlarda göstermiştir. Bu yayınların eşliğinde özellikle inme ve Alzheimer kaynaklı demansın

progresyonunun engellenmesi amacıyla bu hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere klinik çalışmaların başlamasına sebep olmuştur (127). Yaptığımız çalışmada nefirasetamın nörit uzamasına etkisi kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı değildi. Kontrol grubuna benzer düzeyde hücre proliferasyonu saptandı ve apoptotik hücre sayısında fark görülmedi. Nefirasetamın bu olumlu etkisini nöronların L ve N tipi Ca^{+2} kanallarının aktivasyonu vasıtasıyla nöroprotektif etki ile sağlayabildiği şeklinde açıklayabiliriz. Nefirasetamın antiapoptotik etkisi kalsiyum kanallarını geri dönüşlü olarak inhibe ederek hücrelerde apoptoz gelişimini önleyebilmesi üzerinden olabilir (134).

Organofosfatlı bileşikler dünya çapında tarım sektöründe yaygın olarak kullanılan ilaçlardır. En sık kullanılan türleri diazinon, malathion, klorprifos grubudur. Ülkemizde de yaygın olarak kullanılan bu ajanlardan her yıl dünya genelinde bir milyon kaza ile zehirlenme, iki milyon intihar amaçlı zehirlenme görülmekte ve sonuçta yaklaşık 100000 kişi hayatını kaybetmektedir. Bu nedenle önemli bir sağlık sorunu yaratmaktadırlar.

Klorprifos [0,0-diethyl-0-(3,5,6-trichloro-2-pyridinyl) phosphorothioate], bahçe, tarım ve orman zararlılarına karşı yaygın olarak kullanılan dolayısı ile insanların sıkça maruz kaldığı organofosfatlı bir insektisittir (101). Klorprifos bir kolinesteraz inhibitörüdür. Genel olarak insektisit olarak böcekleri telef etmek amacıyla kullanılır. İnsektisid olarak uygulaması sırasında memeliler üzerine de toksik etkilere neden olur. Tarımsal amaçlı kullanımlarında genellikle insanlarda uygulama sırasında veya kaza ile alındığında toksik etkiler özellikle de nörotoksik etki göstermektedir. Bu nedenlerle hem akut hemde kronik toksik etkileri insanlarda sıkça gözlenmektedir.

Klorprifosun kolinesteraz inhibisyonundan bağımsız olarak kendisinin nörotoksisite oluşturduğuna dair bulgular bulunmaktadır. Çeşitli deney hayvanları ve hücre hatlarında yapılan çalışmalarda klorprifosun gelişimsel nörotoksik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (107). Klorprifosun gelişimsel nörotoksik etkisinin asetilkolinesteraz inhibisyonu aracılığıyla olmayabileceği yapılan bazı çalışmalarında kolinerjik reseptör antagonistleri uygulandığında

oluşan bu nörotoksik etkiyi geri döndüremedikleri görülmüştür. (110). Bazı in vivo ve in vitro çalışmalar ile de ilacın bu etkisinin kolinesteraz inhibisyonundan bağımsız olduğuna dair sonuçlar elde edilmiştir. Das ve Barone yaptıkları bir çalışmada klorprifosun PC12 hücre hattında nörit uzamasını asetilkolinesteraz inhibisyonu olmadan da inhibe ettiğini göstermişlerdir (111). Bu nedenle Amerika'da Çevre Koruma Ajansı'nın klorprifos kullanımını sınırlamasına sebep olmuştur (108). Carr ve arkadaşları organofosfat ve karbamatların alternatif kolinerjik mekanizmaları olarak serotonerjik, dopaminerjik ve endokannabinoid yolları ya da sistemleri etkileyerek veya sistemlerde değişiklikler yaparak nörotoksik etkiye katkıda bulunuyor olabileceğini belirtmişlerdir (79). Ayrıca klorprifosun nöronal proliferasyonu inhibe ettiğine (109, 111, 144) ve kognitif fonksiyonları bozduğuna dair bir çok çalışma bulunmaktadır (107, 108).

Klorprifosun nöronlarda meydana getirdiği hasar sonrasında nörit uzamasının durması ile birlikte hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve bununla birlikte nekrotik ve apoptotik süreçlerin başladığı tespit edilmiştir. Klorprifosa maruz kalan kişilerde nörotoksik etkiler sıkça görülmektedir. Bu nedenle klorprifosa maruz kalıp nörotoksisite görülen kişilerde tedavi olanakları da pek bulunmamaktadır. Bu durum önemli sağlık sorunlarını beraberinde getirmektedir.

Birçok çalışmada 25 μ M konsantrasyonunda uygulanan klorprifosun nöroblastoma veya diğer nöral doku hücre hattında ılımlı nörotoksik etkinin bir göstergesi olan nörit uzamasının inhibisyonuna neden olduğu ortaya konmuştur (111, 144). Bizim çalışmamızda da fare kaynaklı nöroblastoma hücre hattı olan NB2a hücre dizini kullanılmıştır. Klorprifosun etkili konsantrasyonu olarak 25 μ M konsantrasyonu tespit ederek NB2a dizin hücrelerine bu konsantrasyonda klorprifos uyguladığımızda hücrelerin nörit uzatmasını tamamen inhibe ettiği saptandı (Resim 6).



Resim 6: 25 μ M klorprifos konsantrasyonu ile NB2a hücrelerinde oluşturulan nörit uzamasının inhibisyonu görüntüsü x400.

Organofosfat ve karbamatların akut nörotoksisite oluşturmada klasik asetilkolinesterazın inhibe edilmesi önemli bir mekanizması olduğu düşünülmektedir (144). Bu durum gelişimsel nörotoksik etkileri oksidatif stresin indüklenmesi ve DNA sentezinin önlenmesi ile de mümkün olabilir (112). Bu bulgular bizim çalışmamız ile uyumludur.

Klorprifos uygulayarak oluşturduğumuz ılımlı nörotoksik etkinin geri dönüştürülüp dönüştürülemediğini saptamak amacıyla deneylerde levetirasetam ve nefirasetam değişik konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Levetirasetam ve nefirasetamın her ikisinin de 10 μ M konsantrasyondan itibaren doz bağımlı olarak hücrelerde klorprifosun tek başına uygulandığında ortaya çıkan ılımlı nörotoksik etkiyi geriye çevirdiği, levetirasetamın 100 μ M konsantrasyonda ise bu nörotoksik etkiyi tamamen ortadan kaldırdığı ve NB2a hücreleri koruduğu gözlemlendi. Daha önce klorprifos uygulanarak toksik etki oluşturulduktan sonra levetirasetam ve nefirasetam uygulamasının toksik etkiyi engellediğini gösteren bir çalışmaya literatürde rastlanılmadı.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak çalışmamızda her iki ilacın antiepileptik etkilerinin dışında kullanıldığı NB2a hücrelerinde herhangi bir şekilde ılımlı veya ciddi toksik etki göstermediği saptandı. Hücrelerimizde klorprifos ile oluşturulan ılımlı nörotoksik etkinin, bu ilaçların yüksek konsantrasyonlarının geriye çevirebildiğini ve böylece bu iki ilacın nöroprotektif etkilerinin olabileceğini öngörmekteyiz. Bununla birlikte kullandığımız yöntem, akut toksisite üzerine ilaçların etkisini gösteren bir yöntemdir. Bu yöntem kronik toksisite durumlarında ilaçların nasıl bir etkisi olacağını göstermediği için kronik toksisite üzerine etkilerinin de sonraki çalışmalarla araştırılmalıdır. Bizim bulgularımız daha sonra yapılacak ileri düzey çalışmalar ile desteklenirse önemli bir halk sağlığı sorununu da çözüme kavuşacaktır. Böylece birçok organofosfat toksisitesine maruz kalmış veya benzeri problem yaşayan kişilerin sağlıklarına kavuşabilme olanağı sağlanabilecektir. Bununla beraber halen antiepileptik ve nootropik olarak reçete edilen bu ilaçların nörotoksik etkilerinin olmadığı, aksine nöroprotektif etkiler gösterdiklerine dair literatür bilgisine katkı sağlanmıştır. Ancak bu çalışmanın in vitro ortamda olması nedeniyle in vivo ortamda nasıl bir etki olacağı konusunun ya da diğer hücreler üzerindeki etkilerinin araştırılarak elde ettiğimiz bulguların desteklenmesi gerekmektedir.

7. ÖZET

Levetirasetam ve Nefirasetamın NB2a Hücre Kültür Hattındaki Etkileri

Bu projenin amacı, Rasetam grubu içerisinde yer alan 2 antiepileptik ilaç levetirasetam ve nefirasetamın fare nöroblastoma hattı (NB2a) kanser hücre dizininde olası nörotoksik veya nöroprotektif etkilerinin araştırılmasıdır.

Son yıllarda yaşlı bireylerin sayısının giderek artmasıyla birlikte nörodejeneratif hastalıklarda da bir artış söz konusudur. Bu hastalıkların tedavisi genellikle semptomatiktir. Ancak hastalığın progresyonu devam eder. Bu nedenle yeni ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır. Rasetam grubu içerisinde yer alan; levetirasetam ve nefirasetam bu amaçla kullanılabilecek yeni ilaçlardan olabilir.

Levetirasetam ve nefirasetam bazı çalışmalarda nöroprotektif bazılarında ise az da olsa nörotoksik etkisi olabileceği bildirilmektedir. Çalışmamızda ilk olarak bu ilaçların nörotoksik etkileri olup olmadığı fare kaynaklı Nöroblastoma (NB2a) dizin hücrelerinde araştırıldı. Bu amaçla ilaçların toksik etkileri Nörotoksisite Tarama Testi (NTT) ile, apoptotik etkileri TUNEL yöntemi ile ve hücre canlılık testi MTT yöntemi ile incelendi. NTT testinde ılımlı nörotoksik etkileri saptanmadı. Nörotoksik etkili klorprifos ile NB2a hücreleri kültür ortamında nörotoksisite oluşturularak levetirasetam ve nefirasetamın nöroprotektif etkileri yüksek konsantrasyonlarda gözlemlendi.

Bu koruyucu etki sıkça görmeye başladığımız organofosfat toksisitesine maruz kalmış veya benzeri nörodejeneratif problemler yaşayan kişilerin sağlıklarına kavuşabilme olanağı sağlayabilecektir. Böylece nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde önemli bir halk sağlığı sorunu ortadan kaldırılabilir.

Anahtar Kelimeler : Nörotoksisite, in vitro, levetirasetam, nefirasetam, NB2a, MTT, nöroprotektif, klorprifos



8. SUMMARY

Effects of Levetiracetam and Nefiracetam on the NB2a Cell Culture Line

The aim of this project is to investigate possible neurotoxic or neuroprotective effects of two antiepileptic drugs levetiracetam and nefiracetam, members of racetam group, on mouse neuroblastoma cancer cell lines (NB2a).

Physicians diagnose neurodegenerative diseases more often in recent years, mainly due to the increase in the number of elderly people. Treatments of these diseases are usually symptomatic and diseases usually progress. Therefore, new medications are required. Among the racetam group, levetiracetam and nefiracetam are newly-developed drugs that can be used for this purpose.

Levetiracetam and nefiracetam have been reported to be neuroprotective by some researchers while others argued that they may have slight neurotoxic effects. In the present study, we examined whether these drugs have neurotoxic effects using neuroblastoma cell line of mouse origin (NB2a). For this aim, the toxic effects and apoptotic effects of the drugs have been tested by Neurotoxicity Screening Test (NST) and TUNEL method and MTT cell viability test, respectively. There were no moderate neurotoxic effects on NST test. In NB2a cell culture neurotoxicity was induced by chlorpyrifos which has neurotoxic properties and neuroprotective effects of levetiracetam and nefiracetam was observed at high concentrations.

This protective effect may provide help patients with neurodegenerative problems or those who are exposed to organophosphate toxicity. By this way neurodegenerative diseases, which is a significant health issue can be eliminated.

Keywords : Neurotoxicity, in vitro, levetiracetam, nefiracetam, NB2a, MTT, neuroprotective, chlorpyrifos

9. KAYNAKLAR

1. Keierszenbaum, A. L., 2006. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi*, Palme Yayıncılık. Ankara.18.
2. Kandel E., Schwartz J. H., Jessell T. M., 2000. Principles of Neural Science. 4 edition. McGraw-Hill, Health Professions Division. 1414.
3. Öztürk G., 1999. Axonal regeneration and expression of neuropeptides and neurofilaments in primary sensory neurons in vitro.(doktora tezi). University of London, Physiology Department Biomedical Sciences Division King's College London, London.
4. Weitz B., 1998. Atlas der Anatomie. Organsysteme und Strukturen . Augsburg, Almanya.
5. Setou M., Hayasaka T., Yao I., 2003. Axonal transport versus dendritic transport. J. Neurobiol., 58(2):201-6.
6. Hoffman P.N., Griffin J.W., Price D.L., 1984. Control of axonal caliber by neurofilament transport. J. Cell Biol., 99(2):705-14.
7. Schlaepfer WW., 1987. Neurofilaments: structure, metabolism and implications in disease. J. Neuropathol Exp Neurol., 46(2): 117-29.
8. Stephens R.E., Edds K.T., 1976. Microtubules: structure, chemistry, and function. Physiol. Rev., 56(4):709-77.
9. Schwab M., Thoenen H., 1977. Retrograde axonal and transsynaptic transport of macromolecules: physiological and pathophysiological importance. Agents Actions., 7(3):361-8.
10. Hirokawa N., 1998. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. Science, 279:519-526.
11. Jaquet J.B., Luijsterburg A.J., Kalmijn S., Kuypers P.D., Hofman A., Hovius S.E., 2001. Median, ulnar and combined median–ulnar nerve

injuries: functional outcome and return to productivity. *J. Trauma*, 51: 687–692.

12. Rosberg H.E., Carlsson K.S., Dahlin L.B., 2005. Prospective study of patients with injuries to the hand and forearm: costs, function, and general health. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg.* 39: 360–369.
13. Fu Y.S., Gordon T., 1997. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Molecular Neurobiology*. 14(1): 67-116.
14. Navarro X., Vivo M., Valero-Cabre A., 2007. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Progress Neurobiology*. (4): 163-201.
15. Reyes O., Sosa I., Kuffler D.P., 2005. Promoting neurological recovery following a traumatic peripheral nerve injury. *P. R. Health Sci. J.*, 24: 215–223.
16. Kaas J.H., 1991. Plasticity of sensory and motor maps in adult mammals. *Annu. Rev. Neurosci.* 14: 137–167.
17. Wall J.T., Xu J., Wang X., 2002. Human brain plasticity: an emerging view of the multiple substrates and mechanisms that cause cortical changes and related sensory dysfunctions after injuries of sensory inputs from the body. *Brain Res. Rev.*, 39:181–215.
18. Kaas J.H., Collins C.E., 2003. Anatomic and functional reorganization of somatosensory cortex in mature primates after peripheral nerve and spinal cord injury. *Adv. Neurol.*, 93: 87–95.
19. Arvidsson J., Ygge J., Grant G., 1986. Cell loss in lumbar dorsal root ganglia and transganglionic degeneration after sciatic nerve resection in the rat. *Brain Res.*, 373:15–21.

20. Ygge J., 1989. Neuronal loss in lumbar dorsal root ganglia after proximal compared to distal sciatic nerve resection: a quantitative study in the rat. *Brain Res.*, 478:193–195.
21. Vestergaard S., Tandrup T., Jakobsen J., 1997. Effect of permanent axotomy on number and volume of dorsal root ganglion cell bodies. *J. Comp. Neurol.*, 388: 307–312.
22. Groves M.J., An S.F., Giornetto B., Scaravilli F., 1999. Inhibition of sensory neuron apoptosis and prevention of loss by NT-3 administration following axotomy. *Exp. Neurol.*, 155: 284–294.
23. Tandrup T., Woolf C.J., Coggeshall R.E., 2000. Delayed loss of small dorsal rootgangl ion cells after transection of the rat sciatic nerve. *J. Comp. Neurol.*, 422:172–180.
24. Beuche W., Friede R.L., 1986. Myelin phagocytosis in Wallerian degeneration of peripheral nerves depends on silica-sensitive bg/bg negative and Fc-positive monocytes. *Brain Res.*, 378:97-106.
25. Perry V. H., Brown M.C., 1992. Macrophages and nerve regeneration. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 2: 679–682.
26. Stoll G., Muller H.W., 1999. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration. *Basic Insights Brain Pathol.*, 9: 313-325.
27. Hilliard A.M., 2009. Axonal degeneration and regeneration: a mechanistic tug of war. *Journal of Neurochemistry*, 108:23-32.
28. Coleman M., 2005. Axon degeneration mechanisms: Commonality amid diversity. *Nature*, 6:889-898.
29. Conforti L., Adalbert R., Coleman M. P., 2007. Neuronal death: where does the end begin? *Trends Neurosci.*, 30:159–166.

30. Navarro X., Vivo M., Valero-Cabre A., 2007. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Progress Neurobiology*. (4): 163-201.
31. Lunn E.R., Perry V.H., Brown M.C., Rosen H., Gordon S., 1989. Absence of Wallerian degeneration does not hinder regeneration in peripheral nerve. *Eur. J. Neurosci.*, 1:27–33.
32. Kerschensteiner, M., M.E. Schwab, J.W. Lichtman, and T. Misgeld. 2005. In vivo imaging of axonal degeneration and regeneration in the injured spinal cord. *Nat. Med.* 11:572–577. <http://dx.doi.org/10.1038/nm1229>.
33. Tsao, J.W., M.C. Brown, M.J. Carden, W.G. McLean, and V.H. Perry. 1994. Loss of the compound action potential: an electrophysiological, biochemical and morphological study of early events in axonal degeneration in the C57BL/Ola mouse. *Eur. J. Neurosci.* 6:516–524. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.1994.tb00295>.
34. Lubińska, L. 1982. Patterns of Wallerian degeneration of myelinated fibres in short and long peripheral stumps and in isolated segments of rat phrenic nerve. Interpretation of the role of axoplasmic flow of the trophic factor. *Brain Res.* 233:227–240. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(82\)91199-4](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(82)91199-4)
35. Griffin, J.W., E.B. George, S.T. Hsiesh, and J.D. Glass. 1995. Axonal degeneration and disorders of the axonal cytoskeleton. In *The Axon: Structure, Function and Pathophysiology*. S.G. Waxman, J.D. Kocsis, P.K. Sytys, editors. Oxford University Press, NY. 3750–3790.
36. Glass, J.D., T.M. Brushart, E.B. George, and J.W. Griffin. 1993. Prolonged survival of transected nerve fibres in C57BL/Ola mice is an intrinsic characteristic of the axon. *J. Neurocytol.* 22:311–321. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01195555>

37. Araki, T., Y. Sasaki, and J. Milbrandt. 2004. Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. *Science*. 305:1010–1013. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1098014>
38. Wang, J., Q. Zhai, Y. Chen, E. Lin, W. Gu, M.W. McBurney, and Z. He. 2005. A local mechanism mediates NAD-dependent protection of axon degeneration. *J. Cell Biol.* 170:349–355. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200504028>
39. Lubińska, L. 1977. Early course of Wallerian degeneration in myelinated fibres of the rat phrenic nerve. *Brain Res.* 130:47–63. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(77\)90841-1](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(77)90841-1)
40. George, R., and J.W. Griffin. 1994. Delayed macrophage responses and myelin clearance during Wallerian degeneration in the central nervous system: the dorsal radicotomy model. *Exp. Neurol.* 129:225–236. <http://dx.doi.org/10.1006/exnr.1994.1164>
41. George, E.B., J.D. Glass, and J.W. Griffin. 1995. Axotomy-induced axonal degeneration is mediated by calcium influx through ion-specific channels. *J. Neurosci.* 15:6445–6452.
42. Tsao, J.W., E.B. George, and J.W. Griffin. 1999. Temperature modulation reveals three distinct stages of Wallerian degeneration. *J. Neurosci.* 19:4718–4726.
43. Conforti, L., A. Tarlton, T.G. Mack, W. Mi, E.A. Buckmaster, D. Wagner, V.H. Perry, and M.P. Coleman. 2000. A Ufd2/D4Cole1e chimeric protein and overexpression of Rbp7 in the slow Wallerian degeneration (WldS) mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:11377–11382. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.97.21.11377>
44. Stirling, D.P., and P.K. Stys. 2010. Mechanisms of axonal injury: internodal nanocomplexes and calcium deregulation. *Trends Mol. Med.* 16:160–170. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2010.02.002>

45. Verkhratsky, A. 2005. Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons. *Physiol. Rev.* 85:201–279. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00004.2004>
46. Kirichok, Y., G. Krapivinsky, and D.E. Clapham. 2004. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature.* 427:360–364. <http://dx.doi.org/10.1038/nature02246>
47. Perocchi, F., V.M. Gohil, H.S. Girgis, X.R. Bao, J.E. McCombs, A.E. Palmer, and V.K. Mootha. 2010. MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca^{2+} uptake. *Nature.* 467:291–296. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09358>
48. Ouardouz, M., M.A. Nikolaeva, E. Coderre, G.W. Zamponi, J.E. McRory, B.D. Trapp, X. Yin, W. Wang, J. Woulfe, and P.K. Stys. 2003. Depolarization-induced Ca^{2+} release in ischemic spinal cord white matter involves L-type Ca^{2+} channel activation of ryanodine receptors. *Neuron.* 40:53–63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2003.08.016>
49. Nikolaeva, M.A., B. Mukherjee, and P.K. Stys. 2005. Na^{+} -dependent sources of intra-axonal Ca^{2+} release in rat optic nerve during in vitro chemical ischemia. *J. Neurosci.* 25:9960–9967. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2003-05.2005>
50. Rigaud, M., G. Gemes, P.D. Weyker, J.M. Cruikshank, T. Kawano, H.E. Wu, and Q.H. Hogan. 2009. Axotomy depletes intracellular calcium stores in primary sensory neurons. *Anesthesiology.* 111:381–392. <http://dx.doi.org/10.1097/ALN.0b013e3181ae6212>
51. Atalay Öz F., Üstün H., 2004. Neuronal degeneration, regeneration in peripheral nervous system and new treatment modalities in neurodegenerative diseases. *Fiziksel Tıp*, 7(3): 157-162.
52. Schwab M., Thoenen H., 1977. Retrograde axonal and transsynaptic transport of macromolecules: physiological and pathophysiological importance. *Agents Actions.*, 7(3):361-8.

53. Brimijoin WS., 1982. Abnormalities of axonal transport: are they a cause of peripheral nerve disease? *Mayo Clin. Proc.*, 57(11):707-14.
54. Chevalier-Larsen E., Holzbaur EL., 2006. Axonal transport and neurodegenerative disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1762(11-12):1094-108.
55. Almenar-Queralt A., Goldstein L. S.B., 2001. Linkers, packages and pathways: new concepts in axonal transport. *Current Opinion in Neurobiology*, 11:550–557.
56. Perlson E., Maday S., Fu M., Moughamian A.J., Holzbaur E.L.F., 2010. Retrograde axonal transport: pathways to cell death? *Trends in Neurosciences* 33: 335–344.
57. Trushina E., Dyer R.B, Badger II J.D., Ure D., Eide L., Tran D.D., Vrieze B.T., Legendre-Guillemin V., McPherson P.S., Mandavilli B.S., Van Houten B., Zeitlin S., McNiven M., Aebersold R., Hayden M., Parisi J.E., Seeberg E., Dragatsis I., Doyle K., Bender A., Chacko C., McMurray C.T., 2004. Mutant Huntingtin impairs axonal trafficking in mammalian neurons .in vivo and in vitro. *Molecular And Cellular Biology*, 24: 8195–8209.
58. Ligon L.A, LaMonte B.H., Wallace K.E., Weber N., Kalb R.G., Holzbaur E.L., 2005. Mutant superoxide dismutase disrupts cytoplasmic dynein in motor neurons. *Neuroreport.*, 16(6):533-6.
59. Dompierre J.P., Godin J.D., Charrin B.C., Cordelie `res F.P., King S.J., Humbert S., Saudou F., 2007. Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation. *The Journal of Neuroscience*, 27(13):3571–3583.
60. Konishi Y., Setou M., 2009. Tubulin tyrosination navigates the kinesin-1 motor domain to axons. *Nat. Neurosci.*, 12(5):559-67.

61. Hadano S., Hand C.K., Osuga H., Yanagisawa Y., Otomo A., Devon R.S., Miyamoto N., Showguchi-Miyata J., Okada Y., Singaraja R., Figlewicz D.A., Kwiatkowski T., Hosler B.A., Sagie T., Skaug J., Nasir J., Brown R.H.Jr., Scherer S.W., Rouleau G.A., Hayden M.R., Ikeda J.E., 2001. A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. *Nat. Genet.*, 29(2):166-73.
62. McCray B.A., Skordalakes E., Taylor J.P., 2010. Disease mutations in Rab7 result in unregulated nucleotide exchange and inappropriate activation. *Human Molecular Genetics*, 19(6):1033–1047.
63. Pilling A.D., Horiuchi D., Lively C.M., Saxton W.M., 2006. Kinesin-1 and dynein are the primary motors for fast transport of mitochondria in drosophila motor axon. *Molecular Biology of the Cell*, 17: 2057–2068.
64. Ravikumar B., Acevedo-Arozena A., Imarisio S., Berger Z., Vacher C., O'Kane C.J., Brown S.D., Rubinsztein D.C., 2005. Dynein mutations impair autophagic clearance of aggregate-prone proteins. *Nat. Genet.*, 37(7):771-6.
65. Ravikumar B., Vacher C., Berger Z., Davies J.E., Luo S., Oroz L.G., Scaravilli F., Easton D.F., Duden R., O'Kane C.J., Rubinsztein D.C., 2004. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat. Genet.*, 36(6):585-95.
66. Beal M.F., Lang A.E., ve Ludolph A.C. (2005), *Neurodegenerative Diseases: Neurobiology, Pathogenesis and Therapeutics*, Cambridge University Pres, Cambridge.
67. Topçuoğlu, E.S. ve Selekler, K. (1998), "Alzheimer Hastalığı", *Geriatri* 1 (2): 63-67.
68. Weiner, W.J., Shulman, L.M. ve Lang, A.E. (2006), *Parkinson's Disease: A Complete Guide for Patients and Families*, The Johns Hopkins University Pres, Baltimore.

69. Şahin, G. ve Akbostancı, M.C. (2008), Parkinson Hastalığı, Veri Medikal Yayıncılık, İstanbul.
70. Miller, R.G., Gelinas, D. ve O'Connor, P. (2004), Amyotrophic Lateral Sclerosis, Demos Medical Publishing, New York.
71. Karabudak, R. (2006), Ms İle Yaşamak, Aşina Kitapları, İstanbul.
72. Quarrell, O. (2008), Huntington's Disease, Oxford University Pres, Oxford.
73. Fiskum, G. (2009), Neurodegenerative Diseases, Springer, New York.
74. Duranyıldız D., Oğuz H., Çamlıca H., Yasasever V., Topuz E. Malign Melanomalı Hastalarda Serum BCL-2 düzeyleri. Türk Onkoloji Dergisi, 2004;19: 4,131–133
75. Turgut B, Demir T, Çeliker Ü. Oftalmolojide Apoptoz. Fırat Tıp Dergisi 2006; 11: 6-11.
76. Kiechle FL, Zhang X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. Clin Chim Acta 2002; 326: 27-45.
77. Çolakoğulları M., BCL-2 Proteinin apoptoz yolları üzerine etkisinin incelenmesi. (Doktora Tezi) Uludağ Üniversitesi, 2007.
78. Lester SC. Cellular responses to stress and toxic insults: adaptation, injury, and death. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC (editors). Pathologic Basis of Disease. 8 th edition. Philadelphia, PA. Elsevier Saunders 2010; 1: 3-42.
79. Carr NJ. M30 Expression demonstrates apoptotic cells, correlates with in situ end-labeling, and is associated with Ki67 expression in large intestinal neoplasms. Arch Pathol Lab Med 2000; 124: 1768-1772.
80. Kang HJ, Sol ME, Park DY, Lee SH, Shin DH, Kim JY, et al. Assessment of apoptosis by M30 immunoreactivity and the relationship with the MSI

status and the clinicopathological characteristic of colorectal carcinomas. Korean J Pathol 2006; 40: 319-325.

81. Abbasoğlu ÖE, Hoşal BM. Apoptosis: It's place in eye diseases. T Klin J Ophthalmol 2001; 10: 115-120.
82. Güleğ Ö, Eren Ü. Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. Y.Y.Ü Veteriner Fakültesi Dergisi 2008; 2: 73-78.
83. Ulukaya E. Apoptozis Ders Notları, Ankara, 2003.
84. Nagata S. (1997) Apoptosis by death factor, Cell. 7;88(3):355-65
85. Riedl S. J. And Y. Shi, (2004) Molecular Mechanisms of Caspase Regulation During Apoptosis, Nat. Rev. Mol. Cell Biol., Vol. 5, pp. 897-907
86. Altieri DC (2010) Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms, Biochem J. 1;430(2):199-205
87. Scatena R. (2012). Mitochondria and cancer: a growing role in apoptosis, cancer cell metabolism and dedifferentiation. Adv Exp Med Biol.;942:287-308
88. Türktekin M. Kolon kanseri hücre hattında apigenin flavonoidinin apoptoz yolaklı gen ifade edilmesine olan etkilerinin araştırılması. (Yüksek Lisans Tezi) Gazi Üniversitesi; 2009
89. Gültekin N., Karaoğlu K, Küçükateş E. Hücrede apoptoz ve sağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi ve yeni potansiyel tedavi stratejileri, Türk Kardiyol Dern Arş, 2008; 36:120-130
90. Öztürk F. Apoptoz. Gönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2002; 9: 142-148.
91. Lanneau, D., Brunet, M., Frisan, E., Solary, E., Fontenay, M., Garrido, C. Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2008; 12: 43–61.

92. Li, P., Nijhavan, D.I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., Wang, X., Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade, *Cell*, 1997; 91: 79-89.
93. Tömekçe N.B., Apoptozla ilişkili genler BCL2L12 ve PDCD4'ÜN lösemi hastalarındaki ekspresyon analizi. (Yüksek Lisans Tezi) İstanbul Üniversitesi; 2008
94. Thornberry N.A., Lazebnik Y. Caspases: Enemies Within. *Science*, 1998;281 (5381):1312–1316
95. Luo, X., , Budihardjo I., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X., Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 1998; 94: 81–90
96. Pehlivan S., Kolorektal tümörlerde telomeraz aktivitesi ve apoptozis ile ilişkisi. (Doktora Tezi) Fırat Üniversitesi, 2008
97. Kasar Z., Geldanamycin uygulanmış kolon kanseri hücre dizilerinde apoptozis mekanizmasının araştırılması. (Yüksek Lisans Tezi) Celal Bayar Üniversitesi, 2013.
98. Sreedhar A.S., Csermely P. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy A comprehensive review. *Pharmacology Therapeutics*, 2004;101:227–257.
99. Öktem S., Özhan M.H., Özol D. Apoptozisin Önemi, *Toraks Dergisi*, 2001; 2(1):91-95
100. http://media.cellsignal.com/www/pdfs/science/pathways/Apoptosis_Overview.pdf
101. Hunter DL. , Lassiter TL., Padilla S. Gestational exposure to chlorpyrifos : comparative distribution of trichloropyridinol in the fetus and dam. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1999;158(1) : 16-23.

102. Muscarella DE, Keown JF, Bloom SE. Evaluation of the genotoxic and embryotoxic potential of chlorpyrifos and its metabolites in vivo and in vitro. *Environ Mutagen*. 1984; 6(1) : 13-23.
103. Li WF, Furlong CE, Costa LG. Paraoxonase protects against chlorpyrifos toxicity in mice. *Toxicol Lett* 1995;76(3): 219-26.
104. Bigbee JW, Sharma KV, Gupta JJ, Dupree JL. Morphogenetic role for acetylcholinesterase in axonal outgrowth during neural development. *Environ Health Perspect*. 1999; 1:81-8.
105. Kazanç M.B. Antioksidan vitaminler. *Sendrom*. Temmuz, 1997;14-23
106. Stephen B, Kyle L, Yong X, Cynthia A, Donald E, Earl F, James E. Role of oxidative stress in the mechanism of dieldrin's hepatotoxicity. *Annals of Clinical and Laboratory Science*. 1997; 27(3) : 196-208.
107. Jett, D. A.; Navoa, R. V.; Beckles, R. A.; McLemore, G. L. Cognitive Function and Cholinergic Neurochemistry in Weanling Rats Exposed to Chlorpyrifos. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 2001, 174 (2), 89-98.
108. Schuh Rosemary A, Lein Pamela J, Beckles Rondell A, Jett David A. Noncholinesterase mechanisms of chlorpyrifos neurotoxicity: altered phosphorylation of Ca²⁺/cAMP response element binding protein in cultured neurons. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2002 Jul 15;182(2):176–185.
109. Sachana M, Flaskos J, Nikolaidis E, Hargreaves A, Alexaki-Tzivanidou E. Inhibition of rat platelet 5-hydroxytryptamine uptake by chlorpyrifos and carbaryl. *Pharmacol Toxicol*. 2001 Oct;89(4):195–200.
110. Garcia Stephanie J, Seidler Frederic J, Qiao Dan, Slotkin Theodore A. Chlorpyrifos targets developing glia: effects on glial fibrillary acidic protein. *Brain Res Dev Brain Res*. 2002 Feb 28;133(2):151–161.
111. Das KP, Barone S. Neuronal differentiation in PC12 cells is inhibited by chlorpyrifos and its metabolites: is acetylcholinesterase inhibition the site of action? *Toxicol Applied Pharmacol*. 1999;160:217–230

112. Slotkin TA, Seidler FJ. Developmental neurotoxicity of organophosphates targets cell cycle and apoptosis, revealed by transcriptional profiles in vivo and in vitro. *Neurotoxicol Teratol*. 2012;34:232–41.
113. Malykh AG, Sadaie MR. Piracetam and piracetam-like drugs: from basic science to novel clinical applications to CNS disorders. *Drugs*. 2010 Feb 12;70(3):287-312. doi: 10.2165/11319230.
114. Abou-Khalil B. Levetiracetam in the treatment of epilepsy. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2008 Jun;4(3):507-23.
115. Patsalos PN, Perucca E. Clinically important drug interactions in epilepsy: interactions between antiepileptic drugs and other drugs. *Lancet Neurol*. 2003 Aug;2(8):473-81.
116. Radtke RA. Pharmacokinetics of levetiracetam. *Epilepsia*. 2001;42 Suppl 4 :24-7.
117. Klitgaard H, Matagne A, Gobert J, Wülfert E. Evidence for a unique profile of levetiracetam in rodent models of seizures and epilepsy. *Eur J Pharmacol*. 1998 Jul 24;353(2-3):191-206.
118. Gu J, Lynch BA, Anderson D, Klitgaard H, Lu S, Elashoff M, Ebert U, Potschka H, Löscher W. The antiepileptic drug levetiracetam selectively modifies kindling-induced alterations in gene expression in the temporal lobe of rats. *Eur J Neurosci*. 2004 Jan;19(2):334-45.
119. Bazil CW. New antiepileptic drugs. *Neurologist*. 2002 Mar;8(2):71-81 146.
120. Motamedi M, Nguyen DK, Zaatreh M, Singh SP, Westerveld M, Thompson JL, Mattson R, Blumenfeld H, Novotny E, Spencer SS. Levetiracetam efficacy in refractory partial-onset seizures, especially after failed epilepsy surgery. *Epilepsia*. 2003 Feb;44(2):211-4. 147.

121. Rossetti AO, Bromfield EB. Levetiracetam in the treatment of status epilepticus in adults: a study of 13 episodes. *Eur Neurol.* 2005;54(1):34-8. Epub 2005 Aug 10.
122. Patsalos P.N. Clinical Pharmacokinetics of Levetiracetam. *Clin Pharmacokinet* 2004; 43:707-724.
123. Hanon E, Klitgaard H. Neuroprotective properties of the novel antiepileptic drug levetiracetam in the rat middle cerebral artery occlusion model of focal cerebral ischemia. *Seizure.* 2001; 10:287-93.
124. Oliveira AA, Almeida JP, Freitas RM, et al. Effects of levetiracetam in lipid peroxidation level, nitrite-nitrate formation and antioxidant enzymatic activity in mice brain after pilocarpine-induced seizures. *Cell Mol Neurobiol.* 2007; 27: 395-406.
125. Kim JS, Kondratyev A, Tomita Y, Gale K. Neurodevelopmental impact of antiepileptic drugs and seizures in the immature brain. *Epilepsia.* 2007;48 Suppl 5:19-26.
126. Abend NS, Gutierrez-Colina AM, Monk HM, Dlugos DJ, Clancy RR. Levetiracetam for treatment of neonatal seizures. *J Child Neurol.* 2011; 26:465-70.
127. S, Fukatsu T, Miyake-Takagi K, Takagi N, Niimura M, Nagakura A, et al. Persistent effects of delayed treatment with nefiracetam on the water maze task in rats with sustained cerebral ischemia. *J Pharmacol Exp Ther* 2003a;304:513–23.
128. Kitano Y, Komiyama C, Makino M, Takasuna K, Takazawa A, Sakurada S. Anticonvulsant properties of the novel nootropic agent nefiracetam in seizure models of mice and rats. *Epilepsia* 2005c;46:811–8.
129. YOSHII, M., WATABE, S., SAKURAI, T. & SHOTANI, T. (1997). Cellular mechanisms underlying cognition-enhancing actions of nefiracetam (DM-9384). *Behav. Brain Res.*, 83, 185 ± 188.

130. Calabresi P, Cupini ML, Centonze D, Pisani F, Bernardi G. Antiepileptic drugs as a possible neuroprotective strategy of brain ischemia. *Ann Neurol* 2003;53:693–702.
131. Ryvlin P, Montavont A, Nighoghossian N. Optimizing therapy of seizures in stroke patients. *Neurology* 2006;67:S3–9.
132. Vincenzo B, Laura P, Nicola T. Levetiracetam in brain ischemia: Clinical implications in neuroprotection and prevention of post-stroke epilepsy. *Brain & Development* 33 (2011) 289–293.
133. Zhao Q, Gadagbui B, Dourson M (2005). Lower birth weight as a critical effect of chlorpyrifos: a comparison of human and animal data. *Regul Toxicol Pharmacol* 42(1): 55–63
134. Mutsumi U, Ryousuke F, Takehiko K, Hiroshi U. The Cognition-Enhancer Nefiracetam Inhibits Both Necrosis and Apoptosis in Retinal Ischemic Models in Vitro and in Vivo. *THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS* Vol. 309, No. 1; JPET 309:200–207, 2004.
135. Xi-Chun May Lu *, Jitendra R. Dave, Zhiyong Chen, Ying Cao, Zhilin Liao, Frank C. Tortella. Nefiracetam attenuates post-ischemic nonconvulsive seizures in rats and protects neuronal cell death induced by veratridine and glutamate. *Life Sciences* 92 (2013) 1055–1063.
136. Harry GJ, Billingsley M, Bruinink A, Campbell IL, Classen W, Dorman DC, Galli C, Ray D, Smith RA, Tilson HA. In Vitro Techniques for the Assessment of Neurotoxicity. *Environ Health Perspect* 106: 131-158, 1998.
137. Brat DJ, Brimijoin S. A paradigm for examining toxicant effects on variability, structure, and axonal transport of neurons in culture. *Mol Neurobiol*, 6:125-136, 1992.

138. Ehrich M, Correll L, Veronesi B. Neuropathy target esterase inhibition by organophosphorus esters in human neuroblastoma cells. *Neurotoxicology*, 15(2):309-13, 1994.
139. McLean WG, Holme AD, Janneh O, Southgate A, Howard CV, Reed MG. The effect of benomyl on neurite outgrowth in mouse NB2A and human SH-SY5Y neuroblastoma cells in vitro. *Neurotoxicology*, 19:629-32, 1998.
140. Flaskos J, McLean WG, Fowler MJ, Hargreaves AJ. Tricresyl phosphate inhibits the formation of axon-like processes and disrupts neurofilaments in cultured mouse N2a and rat PC12 cells. *Neurosci Lett*, 242(2):101-4, 1998.
141. Veronesi B, Ehrich M. Differential cytotoxic sensitivity in mouse and human cell lines exposed to organophosphate insecticides. *Toxicol Appl Pharmacol*, 120:240-246, 1993.
142. Bottenstein JE, Sato G. *Cell Culture and the Neurosciences*. New York: Plenum Press, 1985.
143. Kimes B, Tarikas H, Schubert D. Neurotransmitter synthesis by two clonal nerve cell lines: changes with culture growth and morphological differentiation. *Brain Res*, 79:291-295, 1974.
144. Harry GJ, Billingsley M, Bruinink A, Campbell IL, Classen W, Dorman DC, Galli C, Ray D, Smith RA, Tilson HA. In Vitro Techniques for the Assessment of Neurotoxicity. *Environ Health Perspect* 106: 131-158, 1998.
145. Abdulla E.M., Campbell I.C.,. Use of neurite outgrowth as an in vitro method of assessing neurotoxicity. *Ann NY Acad Sci*, 679:276–279, 1993.

146. Stone JD, Peterson AP, Eyer J, Oblak TG, Sickles DW. Neurofilaments are nonessential to the pathogenesis of toxicant-induced axonal degeneration. *J Neurosci*, 21(7):2278-2287, 2001.
147. Shea TB. Selective stabilization of microtubules within the proximal region of developing axonal neurites. *Brain Res Bull*, 48(3):255-61, 1999.
148. Sjogren G, Sletten G, Dahl JE. Cytotoxicity of dental alloys, metals and ceramics assessed by Millipore filter, agar overlay and MTT tests. *J Prosthet Dent* 2000; 84: 229-236.
149. Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983; 65:55-63
150. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992). "Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation". *J Cell Biol*. 119 (3): 493–501. doi:10.1083/jcb.119.3.493. PMC 2289665 free to read. PMID 1400587.
151. Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R (1995). "In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note". *Hepatology*. 21 (5): 1465–8. doi:10.1002/hep.1840210534. PMID 7737654.
152. Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, Drouet C, Robert C, Guillermet C, Brambilla C, Brambilla E (1996). "In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations". *J Histochem Cytochem*. 44 (9): 959–68. doi:10.1177/44.9.8773561. PMID 8773561

10. ÖZGEÇMİŞ

Dr. Ertan DARIVERENLİ, 1968 yılında Denizli’ de doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Denizli’ de tamamladı. Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesinden 1994 yılında mezun oldu. Eylül 1994 ve Ocak 2002 yılları arasında Sağlık Bakanlığı’na bağlı sağlık ocaklarında pratisyen hekim olarak görev yaptı. 2004 – 2008 yılları arasında Pamukkale üniversitesi Tıp Fakültesi’nde Biyokimya ve Halk Sağlığı bölümlerinde asistan olarak çalıştı. Temmuz 2009 yılında Celal Bayar Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalında uzmanlık eğitime başladı. Kasım 2012 tarihinde Pamukkale üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya bölümündeki uzmanlık eğitime geri döndü. Celal Bayar Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalındaki uzmanlık eğitime Ocak 2015 tarihinde kaldığı yerden devam etti. Geri kalan Uzmanlık eğitimi süresini 2016 yılında tamamladı.

11. EKLER

T.C.
Celal Bayar Üniversitesi
Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu
Karar Formu

KARAR TARİH / NO	19/ 08 / 2015 / 20478486 - 315		
ARAŞTIRMANIN ADI	Levetirasetam ve Nefirasetam'ın Nb2a Hücre Kültür Hattındaki Etkileri		
SORUMLU ARAŞTIRMACI	Doç. Dr. Kamil VURAL - CBÜ. Farmakoloji AD		
ARAŞTIRMA EKİBİ	Arş. Gör. Dr. Ertan Darıverenli,- Uz. Bio. Işıl Aydemir,- Arş.Gör. Bedirhan Ay		
ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	UZMANLIK TEZİ ☒	YÜKSEK LİSANS--DOKTORA TEZİ ☐	AKADEMİK AMAÇLI ☐
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	29 / 06 / 2015 / Tarih ve 241 sayılı; araştırma dosyası		
KARAR BİLGİLERİ	Araştırma dosyası incelenmiş, bilimsel ve etik açıdan UYGUN olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir		
Ünvanı/Adı/Soyadı	Araştırma ile ilişkisi Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye	Ünvanı/Adı/Soyadı
Prof. Dr. Cengiz KIRMAZ Alerji İmmünoloji BD	☐	☐	Prof. Dr. Necip KUTLU Fizyoloji AD
Prof. Dr. Pelin ERTAN Çocuk Sağlığı Hastalıkları AD	☐	☐	Prof. Dr. Ece ONUR Tıbbi Biyokimya AD
Prof. Dr. Erhun KASIRGA Çocuk Sağlığı Hastalıkları AD	☐	☐	Prof. Dr. Canan TIKIZ F. T. R Algoloji AD
Prof. Dr. Artuner DEVECİ Psikiyatri AD	☐	☐	Prof. Dr. Gönül Tezcan KELEŞ Anestezi ve Reanimasyon AD
Doç. Dr. Peyker TEMİZ Patoloji AD	☐	☐	Prof. Dr. F. Sırrı ÇAM Tıbbi Genetik AD
Doç. Dr. Murat TAŞ BESYO	☐	☒	Doç. Dr. Beyhan Cengiz ÖZYURT Halk Sağlığı AD
Yrd. Doç. Dr. Selim ALTAN Tıbbi Etik AD	☐	☐	Doç. Dr. Kamil VURAL Farmakoloji
Yrd. Doç. Dr. Dilek ÇEÇEN Cerrahi Hemşireliği AD	☐	☐	Yrd. Doç. Dr. Tarık ULUÇAY Adli Tıp AD
Nazlı KÜEY Avukat	☐	☒	
Etik Kurulumuzun kararı yukarda belirtilmiştir. Araştırma Başvuru Formunun Taahhütname – Bölüm E kısmında belirtilmiş olan hususların dikkate alınarak istenilen bilgilerin Etik Kurulumuza zamanında iletilmesi konusunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim. Doç. Dr. Peyker TEMİZ Başkan			