

**PAKLİTAKSEL VE SİSPLATİN NÖROTOKSİSİTESİNİN
SIÇAN NÖRON KÜLTÜRÜNDE ANTIOKSİDAN
PARAMETRELERLE İLİŞKİSİ**

Damla ÇETİN

**Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
Tez Yöneticisi:
Doç.Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU**

Yüksek Lisans Tezi – 2011

**PAKLİTAKSEL VE SİSPLATİN NÖROTOKSİSİTESİNİN SIÇAN NÖRON
KÜLTÜRÜNDE ANTİOKSİDAN PARAMETRELERLE İLİŞKİSİ**

Damla ÇETİN

Tez Savunma Tarihi: 18.01.2011

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Fatma GÖÇER

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Halis SÜLEYMAN

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Zekai HALICI

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Abdülğani TATAR

Prof. Dr. İsmail CEYLAN

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR	III
ŞEKİLLER DİZİNİ	IV
TABLolar DİZİNİ	V
ÖZGEÇMİŞ	VI
ÖZET	VII
SUMMARY	IV
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Paklitaksel	4
2.1.1. Paklitakselin Kimyasal Yapısı	4
2.1.2. Paklitakselin Etki Mekanizması	5
2.1.3. Paklitakselin Diğer Özellikleri	6
2.1.4. Paklitakselin Yan Etkileri	7
2.2. Sisplatin	9
3.1. Antikanser İlaçların Neden Olduğu Nörolojik Komplikasyonlar	11
3.1.1. Periferel Nöropati	11
3.1.2. Nöropatik Ağrı	12
3.1.3. Periferel Nöron Dejenerasyonu	15
3.1.4. Periferel Nörotoksisite	16
4.1. Antioksidanlar	20
5.1. Beyin	23
5.1.1. Serebral Korteks	24
5.1.2. Nöron	25
3. MATERYAL VE METOD	27
3.1. Deney Hayvanları	27
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	27

İÇİNDEKİLER

3.3. Kullanılan Alet ve Cihazlar	28
3.4. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	29
3.5. Nöron Kültürünün Hazırlanması	29
3.6. Paklitaksel, Sisplatin ve Salisilik Asit Uygulanması	31
3.7. MTT Analizi	34
3.8. Antioksidan ve Oksidan Parametreler	36
3.9. İstatistiksel Analizler	38
4. BULGULAR	39
5. TARTIŞMA	46
6. KAYNAKLAR	54

TEŞEKKÜR

Tezimin oluşturulmasında, bilimsel tecrübe edinmem konusunda maddi manevi desteğini bir an olsun esirgemeyen ve engin tecrübesiyle yol gösteren, her konuda danışmanlığımı yapan, geleceğimi şekillendiren, öğrencisi olmaktan onur ve mutluluk duyduğum değerli hocam, Doç. Dr. Ahmet Hacımüftüoğlu'na,

Tez çalışmalarım süresince bilgi, deneyim ve her türlü desteklerinden beni esirgemeyen Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim dalı başkanı saygıdeğer hocam, Prof. Dr. Fatma Göçer; Anabilim dalı öğretim üyeleri kıymetli hocalarım Prof. Dr. Halis Süleyman, Doç. Dr. Zekai Halıcı ve Yrd. Doç. Dr. İsmail Kara'ya

Tez için yapılan laboratuvar çalışmalarında yardımları olan sevgili mesai arkadaşlarım başta Fatih Saruhan olmak üzere Nihal Çetin, Beyzagül Polat, İrfan Çınar, Berna Öztürk'e ayrıca Farmakoloji ABD. Bölüm sekreteri Musa Atasever ile bölüm çalışanları Sadık Dikbaş ve Ömer Önder'e,

Tezimin oluşturulmasında deneysel tecrübeleriyle yol gösteren Tıbbi Genetik ABD öğretim üyesi kıymetli hocam, Doç. Dr. Abdülgani Tatar' a ve tıbbi genetik anabilim dalında görev yapan tüm çalışanlara,

Tezimin deneysel çalışmaları sırasında desteklerini esirgemeyen Biyoloji bölümü öğretim üyesi değerli hocam Yrd.Doç.Dr. Hasan Türkez'e

Tezimin hazırlanmasında desteklerini esirgemeyen sevgili anneme, babama, kardeşime, ablama, Yavuz Selçuk'a ve tüm sosyal çevreme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ŞEKİLLER DİZİNİ	Sf.
Şekil 1: <i>Taxus brevifolia</i> – Porsuk ağacı	4
Şekil 2: Paklitakselin kimyasal yapısı	5
Şekil 3: Sisplatinin kimyasal yapısı	10
Şekil 4: Paklitaksel verilmiş ratlarda postoperatif 90. Günde yetersiz remiyalizasyon	16
Şekil 5: Nöronlar üzerine paklitakselin etkisi ve buna karşılık olesoksimin koruyucu etkisi	19
Şekil 6: Antioksidanların hücre membranı üzerine etkisi	23
Şekil 7: Korteksin kısımları	25
Şekil 8: Tam nöron diagramı	26
Şekil 9: Hücrelerin konulduğu 48 kuyucuklu plate'in üstten görünüşü	30
Şekil 10: MTT analizi sırasında plate'lerin görünümü	36

TABLolar DİZİNİ	Sf.
Tablo 1: 250-300 gr ağırlığında sprague dawley ratlarına intraperitoneal olarak bir gün arayla (0,2,4,6. günlerde) 2mg/kg doz paklitaksel enjekte edilmiş ve paklitaksel ile indüklenen allodini/hiperaljezi ölçülmüştür. Kaçınıcı gününde ne kadar cevap alındığı verilmiştir	14
Tablo 2.a: Çalışmada kullanılan ilaçların 1. plate içerisinde konulduğu kuyucukların numaraları	32
Tablo 2.b: Çalışmada kullanılan ilaçların 2. plate içerisinde konulduğu kuyucukların numaraları	33
Tablo 2.c: Çalışmada kullanılan ilaçların 3. plate içerisinde konulduğu kuyucukların numaraları	34
Tablo3: Paklitakselin oluşturduğu nörotoksisite sonucu hücre sayısı ile orantılı absorban değerleri (mtt analizi sonucu)	39
Tablo 4: Paklitakselin oluşturduğu nörotoksisite sonucu hücre kültür sıvısında yapılan total antioksidan kapasite testi değerleri	40
Tablo 5: Paklitakselin oluşturduğu nörotoksisite sonucu hücre kültür sıvısında yapılan total oksidan kapasite testi değerleri	41
Tablo 6: Sisplatinin oluşturduğu nörotoksisite sonucu hücre sayısı ile orantılı absorban değerleri (mtt analizi sonucu)	42
Tablo 7: Sisplatinin oluşturduğu nörotoksisite sonucu hücre kültür sıvısında yapılan total antioksidan kapasite testi değerleri	44
Tablo 8: Sisplatinin oluşturduğu nörotoksisite sonucu hücre kültür sıvısında yapılan total oksidan kapasite testi değerleri	45

ÖZGEÇMİŞ

2 Ekim 1986 yılında İzmir-Karşıyaka’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzurum’da tamamladı. 2004-2005 yılında Kafkas üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünü kazanarak kayıt yaptırdı. 2007-2008 yılında Kafkas Üniversitesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. Lisans eğitimi süresince çeşitli laboratuarlarda; Histoloji laboratuvarında 1 yıl süre ile histolojik preparat hazırlama metotları ve malzemelerin kullanımı üzerine çalışmalar yaptı. Ekoloji laboratuvarında 5 ay süreyle Kars platosundaki sivrisinek popülasyonu ve sıtma üzerine yapılan çalışmalarda görev aldı. Stanford Üniversitesi ve Kafkas Üniversitesi’nin iş birliği ile gerçekleştirilen Kars –İğdır Doğal Zenginlik Projesi bünyesindeki Temel Bitki resim kursu, kuş gözlem faaliyetleri ve Sarıkamış ormanındaki bozayı popülasyonu üzerine yapılan çalışmalarda görev aldı. Botanik laboratuvarında 1 yıl süreyle çalışarak bitirme tezini etnobotanik (bitkilerin ilaç, boya ve yiyecek olarak kullanılması) üzerine yaptı. Atatürk Üniversitesi Biyokimya laboratuvarında 15.07.2006-25.08.2006 tarihleri arasında staj yaptı. Yukarıda belirtilen tüm çalışmalarda gönüllü olarak çalışmıştır. 01.07.2008 tarihinden itibaren Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalında Doç. Dr. Ahmet-Hacımüftüoğlu ile tubitak destekli nöron hücre kültürü ve voltametri ile ilgili çalışmalarda araştırmacı olarak halen görev almaktadır. 15.09.2009 tarihinde Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı.

ÖZET

**PAKLİTAKSEL VE SİSPLATİN NÖROTOKSİSİTESİNİN SIÇAN NÖRON
KÜLTÜRÜNDE ANTİOKSİDAN PARAMETRELERLE İLİŞKİSİ**

Periferal nörotoksisite, kanser tedavisinde paklitaksel sisplatin gibi antikanser ilaçların kullanımını ve dozunu kısıtlayan bir yan etkidir. Bu çalışmada antikanser ilaçların oluşturduğu nedeni bilinmeyen nörotoksisitenin antioksidanlar kullanılarak tedavi edilip edilemeyeceği araştırılmıştır. Yapılan deneylerde yeni doğan *Sprague Dawley* cinsi ratlar steril ortamda dekapite edilerek serebral kortekslerinden nöron kültürü yapılmıştır. 10. Gün platelerdeki kuyucuklara 10^{-4} M ve 10^{-5} M antioksidan bir ajan olan salisilik asit eklendi. 16. gün ise 10^{-7} M ve 10^{-8} M paklitaksel ile 50 μ ve 100 μ sisplatin uygulandı. Hücre canlılık testi için mtt analizi yapıldı. Kontrol grubunun ortalaması 74 ± 33 iken sadece paklitaksel verilmiş gruplarda sırasıyla 47 ± 7 - 53 ± 14 , diğer plate'de kontrol grubunun ortalaması $84,83\pm3,43$ iken sadece sisplatin verilmiş gruplarda sırasıyla $70,50\pm2,07$ - $63,83\pm8,51$ olması nörotoksiste olduğu gösterdi. Toplam antioksidan kapasite testlerinde ise $1,23\pm0,32$ olarak elde edilen kontrol grupları ile sadece paklitaksel verilen gruplarda sırasıyla $1,12\pm0,27$ - $1,11\pm0,19$ çıkması antioksidan kapasitenin düştüğünü gösterdi. Toplam oksidan kapasite testlerinde ise $1,44\pm0,51$ olarak elde edilen kontrol grupları ile sadece paklitaksel verilen gruplar sırasıyla $1,68\pm0,48$ - $1,71\pm0,62$ çıkması oksidan kapasitenin arttığını gösterdi. Sonuç olarak bu çalışmada serbest radikallerin oluşumunda antioksidan olan salisilik asitin, antikanser ilaçların oluşturduğu nörotoksisteyi önleyebileceği görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Paklitaksel, sisplatin, nörotoksisite, nöron kültürü, antioksidanlar

SUMMARY

RELATIONSHIP BETWEEN ANTIOXIDANT PARAMETERS AND PACLITAXOL AND CISPLATIN IN RATS NEURON CULTURE

Peripheral neurotoxicity is a side effect that restrict the usages and doses of anti-cancer drugs such as paclitaxol cisplatin. In this study it was investigated whether neurotoxicity caused by anticancer drugs, reason for which is unknown can be treated with antioxidants. In the conducted experiments newborn *Sprague Dawley* rats were decapitated in steril atmosphere and neuron culture was made from their cerebral cortex. On the tenth day salicylic acid, a 10^{-4} M ve 10^{-5} M antioxidant agent, was added to culture flasks. On the sixteenth day 10^{-7} M ve 10^{-8} M paclitaxol and 50 μ ve 100 μ cisplatin were applied. MTT analysis was conducted for the test of cell vitality. The fact that group averages were consecutively 47 ± 7 - 53 ± 14 in the groups to which only paclitaxol was applied while it was 74 ± 33 in the control group and that group averages were consecutively $70,50\pm2,07$ - $63,83\pm8,51$ in the groups to which only cisplatin was applied while it was $84,83\pm3,43$ in the control group on the other plate showed that neurotoxicity appeared. In the total antioxidant capacity tests the control groups which were obtained as $1,23\pm0,32$ and $1,12\pm0,27$ - $1,11\pm0,19$ in the groups to which only paclitaxol was applied showed that antioxidant capacity decreased. In the total oxidant capacity tests the control groups which were obtained as $1,44\pm0,51$ and $1,68\pm0,48$ - $1,71\pm0,62$ in the groups to which only paclitaxol was applied showed that the capacity increased. As a result in this study it was seen that salicylic acid, an antioxidant for the formation of free radicals, can prevent the neurotoxicity caused by anticancer drugs.

Key words: Paclitaxol, cisplatin, neurotoxicity, neuron culture, antioxidants

1. GİRİŞ

Paklitaksel *taxus brevifolia* adlı ağacın kabuğundan izole edilen doğal bir alkaloiddir. Günümüzde over, meme ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri tümörlerini tedavi etmek için kullanılır¹. Paklitaksel, antineoplastik ilaçların doğal alkaloidler ve taksanlar grubuna ait bir ilaçtır. Bu grup ilaçlar mitoz bölünmenin metafaz evresine özgüdür. Paklitaksel özellikle β tübüline bağlanarak, mikrotübüllerin polimerizasyonunu artırır ve dolayısıyla metafaz sırasında mitotik iğcikleri stabilize eder. Böylece tümör hücrelerinin metafazdan geçmesini engelleyerek metafaz arestine yol açar². Paklitaksel genellikle iyi tolere edilir. Ancak tek bir ajan olarak kullanıldığında ya da kombine kemoterapi programlarında kullanıldığında saç dökülmesi, kas ağrıları ve bunlara ek olarak hipersensitivite reaksiyonları, periferik nöropati, kemik iliği baskılanması, stomatit gibi istenmeyen etkilere neden olabilir³. Bu istenmeyen etkiler paklitakselin tedavide kullanılan dozunu sınırlamaktadır. Periferik nörotoksisite akson filamentlerinin, nörotübüllerin ve mitoz iğ mihveri filamentlerinin biyokimyasal yapılarının benzemesinden kaynaklanmaktadır⁴. Periferik nörotoksisite kemoterapi sırasında gelişen, iyileşme süreci uzun süren ve hayat kalitesini düşürüp, hasta uyumunu azaltan önemli bir yan etkidir⁵.

Nörotoksisite sinir sisteminin normal aktivitesini değiştiren, nörotoksin adındaki doğal veya yapay toksik maddelere maruz kalındığında meydana gelir. Bu da sonuç olarak sinir sisteminin diğer kısımlarını ve beyinden gelen sinyallerin iletimini yapan nöronların ölümüne veya bozulmasına neden olabilir. Nörotoksisite bazı doğal maddelerin, kozmetiklerin, kimyasal çözücülerin, pektisitlerin, bazı yiyeceklerin ve ağır metallerin etkisiyle ayrıca organ nakli, belli ilaçların yanlış kullanımı, radyasyon

terapisi, ilaç terapisi ve kemoterapiye maruz kalınmasıyla ortaya çıkabilir. Semptomlar bu etkenlere maruz kalındıktan hemen sonra ya da çok sonra ortaya çıkabilir. Bu semptomlar ekstremitelerde zayıflık veya uyuşma, hafıza kaybı, kompulsif bozukluk, delüzyon, baş ağrısı, bilişsel davranış problemleri ve seksüel bozukluklardır⁶. Çeşitli nörotrofik faktörlerin, tiyollerin, nöron koruyucu ajanların ve antioksidanların taksan sınıfına ait ilaçların oluşturduğu nörotoksisiteye karşı koruyucu etki gösterdiğine inanılmaktadır⁷.

Antioksidanlar vücut hücreleri tarafından üretildiği gibi, gıdalarla da alınan bir grup kimyasal maddedir⁸. Antioksidanlar vücutta gerçekleşen ve oksidasyon denen bir grup kimyasal reaksiyon sonucunda ortaya çıkan serbest radikalleri, bilhassa DNA üzerinde hasara yol açarak yaklaşık 80 farklı hastalığa zemin hazırlayan oksidanları etkiler. Enfeksiyon dışı olan bu hastalıkların başında kalp ve beyin damarlarının tıkanmasına bağlı hastalıklar, kanserler ve artrit yer almaktadır. Reaktif oksijen türleri, vücutta metabolik yolla oluşabileceği gibi ultraviyole ışınlar, virüsler, radyasyon, çevre kirliliği, sigara dumanına maruz kalınması, enfeksiyon, stres, alkol ve bazı ilaçların alımı ile de oluşabilmektedir. Antioksidanlar açısından zengin olan beslenme şekli bazı hastalıkların görülme sıklığını düşürmektedir (örneğin; Fransızlarda kalp hastalığının, Güneydoğu Asya'da yaşayanlarda meme kanserinin az görülmesi gibi)⁹. Serbest radikaller vücutta gerçekleşen her işlemde, her aşamada doğal olarak meydana gelmektedir. Fakat normalde vücuttaki doğal antioksidan savunma sistemleriyle bu kararsız elektron yüklü kimyasallar büyük oranda yok edilmekte ya da uzaklaştırılmaktadır. Antioksidan savunma sistemi yeterince iyi çalışmıyorsa ve antioksidan gıdalar yeterli oranda yenilmiyorsa veya antioksidan özellikli desteklerden faydalanılmıyorsa serbest radikaller hücrelere zarar vererek birçok önemli rahatsızlığın

başlangıcına zemin hazırlar ve de erken yaşlanmaya sebebiyet verir. Serbest radikaller vücudun antioksidan aktivitesinden daha yoğun olduklarında bir dengesizlik meydana gelir ve hücrelerde oksidatif hasar oluşur. Devamlı olarak serbest radikallerin etkisine maruz kalan dokuların yenilenebilmesi için antioksidanlara ihtiyaç vardır. Antioksidanların bir kısmı vücut tarafından üretilir, bir kısmı da sebze ve meyvelerle alınması gerekir. Havadaki kimyasal maddeler, gıdalardaki katkı maddeleri, ilaç artıkları, güneş ışığı, egzoz dumanları gibi birçok kanserojen madde antioksidana olan gereksinimi artırır. Gerekli oranda antioksidan alınamadığı takdirde kanser ve kalp hastalıklarının meydana gelme olasılığı artar. Antioksidanların, kanser, kalp ve damar gibi ciddi hastalıklara karşı koruyucu ve tedaviye yardımcı olabileceğini gösteren deneysel çalışmalar vardır¹⁰.

Bu çalışmanın amacı, paklitaksel ve sisplatin gibi antikanser ilaçlarla oluşan, etyolojisi açıklanamayan ve tedavi edilemeyen nörotoksik etkinin oksidan-antioksidan parametrelerle ilişkili olup olmadığı ve antioksidan bir ajan olan salisilik asitin bu nörotoksik etkiye karşı nöroprotektif etkisinin olup olmadığını araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Paklitaksel

Kemoterapötiklerin antineoplastikler ilaçlar sınıfından olan paklitaksel, taksanlar bölümüne ait bir ilaçtır¹¹. Paklitaksel 1967 yılında U.S. Ulusal Kanseri Enstitüsü'nde Monroe E. Wall and Mansukh C. Wani tarafından pasifik porsuk ağacı bitkisinin kabuğundan izole edilerek bulunmuştur¹² (Şekil 1) .



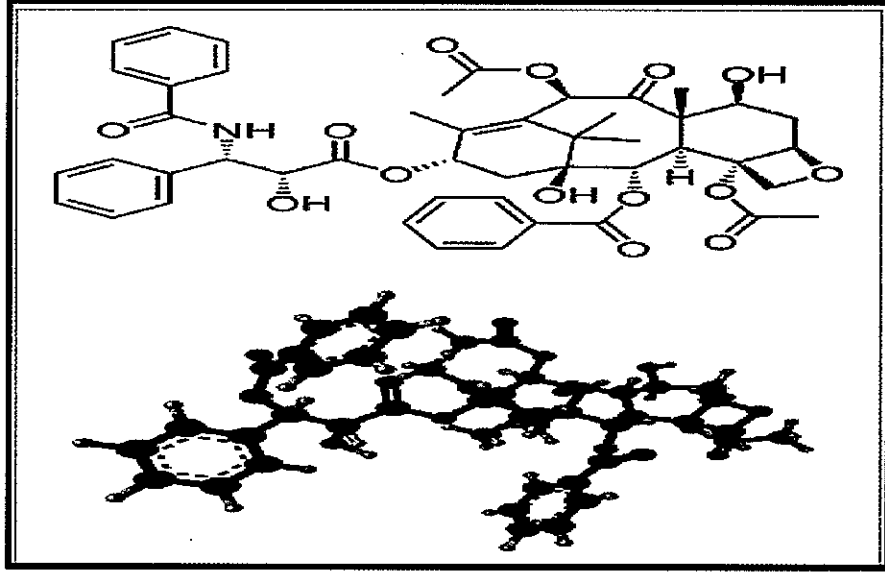
Şekil 1: *Taxus brevifolia* - Porsuk ağacı

Taksanlar çeşitli kanser türlerinin tedavisinde çok etkilidir. Prostat, over, küçük hücreli dışı akciğer ve meme kanseri tedavisinde kombine ya da tekli tedavi şeklinde çoğu ülkede kullanılmaktadır¹³. 1997 yılından beri ülkemizde çeşitli kanser tedavilerinde kullanılmaktadır¹⁴.

2.1.1. Paklitakselin Kimyasal Yapısı

Geçen birkaç yıl içerisinde yapılan kimyasal araştırmalar Taxol molekülünün temel yapı aktivite ilişkisini ortaya çıkarmış ve biyokimyasal çalışmalar için yeni türevlerinin sentezini sağlamıştır. Paklitaksel türevlerinin büyük bir kısmı 3'-N

pozisyonunun modifiye edilmesiyle elde edilmiştir ve bunlardan bazıları klinik deneme aşamasındadır¹⁵ (Şekil 2) .



Şekil 2: Paklitakselin kimyasal yapısı

Bitki alkaloidlerinden taksoid grubu ilaçlardan olan paklitaksel mitoz bölünme sırasında mikrotübüllerin β -tübülin alt grubuna bağlanarak, mikrotübüllerin tübülinlere dönüşmesini ve mitoz bölünme sırasında oluşan iğ ipliklerinin yıkımını engeller ve hücre bölünmesini durdurur. Memelilerde altı β -tübülin izotipi bulunmaktadır ve izotiplerin ekspresyonları dokulara özgündür¹⁶.

2.1.2. Paklitakselin Etki Mekanizması

Tüm taksanlar tümör hücrelerinde, tübülin sentezinin temel taşları olan oligomerik ya da poligomerik subsratlara bağlanarak tübülin polimerizasyonunu hızlandırarak tübülin sentezini artırır. Oluşan ilave mikrotübüllere bağlanarak onları

stabilize eder. Sonuçta tübülün-mikrotübül dengesi bozulur ve sitotoksik etki ortaya çıkar¹⁷. Taksanlar doğal kaynaklıdır ve metafaza özgüdür. DNA sentezini ve DNA yapısını etkilemezler¹⁸. Paklitaksel'in primer etkileri mitozun metafaz döneminde, mikrotübüllerden ibaret olan mitoz içciklerinin oluşmasının önlenmesidir. Mikrotübüllerin yapıtaşı olan tübülün moleküllerine bağlanarak onları çöktürürler ve mikrotübülleri oluşturmak üzere bir araya gelmelerini bozarlar. Sonuçta hücre bölünmesinin metafazda durmasına ve hücrenin ölümüne neden olurlar. Bu nedenle M dönemine özgü ilaçlardır. Bu ilaçlara mitoz, zehirleri, metafaz zehirleri gibi adlar da verilir. Nöronların da mikrotübüllerinin oluşmasını bozduklarından nörotoksik tesirleri bu sebeple oluşmuş olabilir. Fazla tahriş edici bileşiklerdir¹⁹.

Mikrotübüller, hücre bölünmesi, intraselüler transport ve hücre hareketi gibi hücre fonksiyonlarını içeren, hücre sitoskeletonunun temel bileşiklerinden biridir. Mikrotübüller α - ve β - tübülün heterodimer içeren dinamik polimerik yapıdadır²⁰.

2.1.3. Paklitakselin Diğer Özellikleri

Paklitaksel'in yarılanma süresi 5-8 saattir. Biyoyararlanımı % 6,5 (oral) dır. Proteinlere bağlanma oranı %90 civarlarındadır. intravenoz yolla verilir¹². Paklitakselin sistemik atılımı karaciğer sitokrom P450 enzimlerinden sitokrom P2C8 ve sitokrom P3A4 tarafından yapılır. Paklitaksel 6 α -hidropaklitaksel yapısından sitokrom P2C8 ve sitokrom P3A4 katalizörleri tarafından p-3'-hidropaklitaksel'e dönüştürülür²¹. Paklitaksel tedavisine verilen cevap ve farmakokinetiği büyük ölçüde bireyden bireye değişir ve bu farklılıklarda genetik değişkenliğin önemli bir faktör olduğu düşünülmektedir²².

Paklitaksel en çok rastlanan akciğer, meme ve prostat gibi solid tümörlerin tedavisinde platinum ajanlarıyla kombine edilerek veya platinum ajanlarından sonra uygulanmaktadır. Bir taksan ve platinum kombinasyonu genelde ilk seçilecek kanser tedavisidir ve taksan monoterapisi dirençli ve metastatik hastalık durumları için saklanmaktadır²³. Paklitaksel karboplatin veya sisplatin ile kombine edilerek kullanılabilir. Ancak karboplatin ile kombine edildiğinde toksisite, bulantı, kusma ve febril nötropeni önemli ölçüde daha az görülürken nöropati daha sık görülmüştür^{24,25}. Karboplatinin gemsitabin ile kombinasyonunda ise nötropeni daha az görülürken trombositopeni insidansı, bulantı, kusma, ateş ve diyare daha çok görülür²⁶.

Paklitaksel, vinkristin, gemsitabin gibi ajanlar sisplatin ile kombine edildiğinde; toksisiteye ve ağrıya neden olma oranı en çok paklitaksel ile sisplatin kombinasyonunda görülmüştür²⁷. Paklitakselin ayrıca ilaç direnci oluşturması, nörotoksisiteye neden olması, oral biyoyaralanımının düşük olması ve kan beyin bariyerini geçememesi gibi dezavantajları olması tedavideki kullanımını kısıtlamaktadır²⁸.

2.1.4. Paklitakselin Yan Etkileri

Paklitakselin yaygın yan etkileri bulantı ve kusma, iştah kaybı, tat almada değişiklik, saçların incelmesi ve kırılması, kol ve bacak eklemlerinde ağrı, el ve parmaklarda uyuşma, tırnaklarda renk değişikliğidir. Paklitakselin diğer yan etkileri ise overlerin zarar görmesinden dolayı kısırlık, göğüs ağrıları, ciltte kaşınma ve kabarmalar, nefes darlığı, ateş, baş dönmesi, yutma güçlüğü, boğaz iltihabı, üşüme ve öksürük, enjeksiyon yerinde yanma, şişme ve ağrıdır¹². Bu yan etkilerden saç dökülmesi, bulantı, bitkinlik, ağız boşluğu mukozasının enflamasyonu (stomatitis), ve

el- ayak sendromlarının görülme sıklığı %39 iken febril nötropeni %12 diare ise %8 oranında görülür²⁹. Ayrıca kemik iliği süpresyonu, alosepi ve hipersensitivite reaksiyonlarıdır. Hafif düzeyde kardiyotoksisite görülebilir. Yan etkileri en aza indirmek için hastalar kortikosteroidlerle ve H₁ antihistaminiklerle korunmalıdırlar².

Hipersensitivite reaksiyonları genelde paklitakselle birlikte bulunan Cremophor EL.'ye karşı geliştirilir. Ayrıca nötropeni, nörotoksisite ve periferik nöropati yan etkileri paklitakselle birlikte görülür¹. Periferik nörotoksisite paklitakselin dozunu kısıtlayan ciddi bir yan etkidir. Periferik nöropati hissizlik, karıncalanma, mekanik allodini, nesnel allodini ve ağrı gibi semptomlarla kendini gösterir³⁰. Günde 2 mg/kg 4 kez intraperitonel paklitaksel enjeksiyonu yapılan *sprague-dawley* ratlarda Von Frey filamanlarıyla yapılan ölçümlerde açıkça mekanik ve nesnel allodini ve hiperalejiye neden olduğu görülmüştür³¹. Paklitaksel gibi mikrotübülüsle müdahale eden kanser ilaçları, nörotoksisitede dahil olmak üzere, kemoterapiye ve ciddi yan etkilere neden olurlar³².

Paklitaksel kemoterapisini sınırlayan en önemli faktörlerden olan toksik periferik nöropatinin, glutamat ve glutamin amino asit ile azalacağına dair çalışmalar yapılmış fakat uzun dönem 500 mg, 3 doz/gün glutamat ilavesi yapılmış fakat nörotoksisite semptomlarında hiçbir iyileşme elde edilememiştir³³. Merkezi sinir sistemi harici tümörleri bulunan hastalarda beyin metastazı dışındaki primer nöro-görüntüleme bulguları neoplastik olmayan merkezi sinir sistemi belirtilerinin başlığına göre üç ana kategoriye ayrılır:

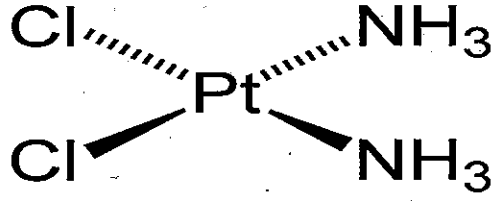
- 1) Terapötik ajanların direkt toksisitesi,
- 2) Doğrudan beyne değil ama bitişik dokulardaki tümörlere uygulanan radyoterapinin radyasyon etkisi,

3) Birincil tümörün uzak etkisi. Direkt toksisite beyaz cevher hastalığı, posterior geri dönüşümlü ensefalopati sendromu ve arteriyel kanama ile sonuçlanan vasküler etkileri içerir³⁴.

Kemoterapötiklerin oluşturduğu 3. ve 4. derecede toksisite tipleri; lökopeni %30, nötropeni %50, trombositopeni %20, anemi %10, bulantı ve kusma %10, sepsis veya enfeksiyon %5, renal %5, ağrı %15, hipersensitivite %5 oranında görülür³⁵. Paklitaksel tedavisi substantial nörotoksisiteye neden olabilir. Bu durumda gemesitabin ve karboplatin kombinasyonu uygulanması en uygunudur³⁶.

2.2. Sisplatin ve Özellikleri

Sisplatin, kanseri tedavi etmek için kullanılan bir ilaçtır. Sisplatin ya tek başına veya onaylı diğer kemoterapötik ajanlarla kombine tedavide endikedir: Metastaz olmuş testis ve over tümörleri. Sisplatin tek ajan olarak, daha önce sisplatin tedavisi görmemiş hastalarda ve standart kemoterapiye dirençli metastaz olmuş over tümörleri olan hastalarda ikincil tedavi olarak endikedir. Sisplatin, cerrahi müdahale ve/veya radyoterapi gibi lokal tedavilere artık cevap vermeyen tranzisyonel hücre mesane kanseri olan hastalarda tek ajan olarak endikedir³⁷ (Şekil 3). Nörotoksisite, nefrotoksisite, ototoksisite, kemik iliği depresyonu, alerjik reaksiyon, nöropatik ağrı kullanımında görülen yan etkilerdir. Ağrı yan etkisi, yeterli doz ve süre kullanımını kısıtlayabilir⁵.



Şekil 3: Sisplatin (cis-diamminedichloroplatinum(II)) kimyasal yapısı: $\text{Cl}_2\text{H}_6\text{N}_2\text{Pt}$

Sisplatin platin kombinasyon kompleksi grubu antikanser ilaçların ilk üyesidir, ancak ciddi toksik etkileri nedeniyle karboplatin geliştirilmiştir. Her iki ilacın da etkileri birbirine benzemekle beraber etki güçleri, farmakokinetik özellikleri ve kullanılan dozu sınırlayan istenmeyen etkileri birbirinden farklıdır. Sisplatin radyoterapi ve diğer kemoterapötik ilaçlarla sinerjistik sitotoksositeye sahiptir. Etki mekanizmaları alkilleyici ajanlara benzer. Plazmanın yüksek klorür konsantrasyonlarında sisplatin elektrik yükü taşımaz. Hücre içersine girerek DNA'nın N_7 guanine bağlanır. Böylece her bir DNA zincirinde veya çift sarmalı oluşturan zincirler arasında çapraz bağların oluşmasını sağlar. Oluşan bağlar sitotostik etkiden sorumludurlar ve DNA çoğalması ve RNA sentezini engellerler. En yüksek konsantrasyonlara karaciğer, böbrekler, barsaklar, testis ve over hücrelerinde ulaşır. Ancak beyin omurilik sıvısına çok düşük konsantrasyonda geçebilmektedir³⁸.

3.1. Antikanser İlaçların Neden Olduğu Nörolojik Komplikasyonlar

3.1.1. Periferik Nöropati

Nöropati periferik sinir sisteminin sinir hücrelerinin zarar görmesi sonucu meydana gelen bozuklukları kapsar. Genellikle sinir hücrelerinin aksonlarının dejenerasyonundan dolayı meydana gelir. Nöropati toksinlere maruz kalma, metabolik bozukluklar, diyabet, enfeksiyon, travmatik yaralanmalar sonucu meydana gelebilir. Nöropatinin semptomları çeşitli faktörlere bağlı gelişebilir³⁹. Semptomlar periferik sensörimotor kayıptan paralizik ileus ve sfinkter problemleri ile ilişkili otonomik disfonksiyona kadar değişebilir. Santral sinir sistemi tutulumu daha az sıklıkla görülür ama ataksi, kraniyal sinir felci, kortikal körlük ve nöbetler ile kendini gösterir. Kanser tedavisinin en sık görülen nörolojik komplikasyonu kemoterapi ile indüklenen periferik nöropatidir. Neredeyse tüm kemoterapi ile indüklenen periferik nöropatilerin doğal seyri, tekrarlayan kemoterapi kürleri ile giderek kötüleşen semptomların varlığıdır. Genellikle etkilenen bölgeler bilateral eldiven-çorap dağılımı şeklinde tanımlanabilecek alanlardır²³.

Periferik nöropatinin tipik semptomları duyuşal, motor veya otonomik sinir dokusunun anormal çalışmasıdır. Özellikle duyuşal semptomlar uyuşma, duyu kaybı ve ağrı gibi paretezileri içerir. polinöropatilerin çoğu proksimal işlem ve ekstremitelerde organdan uzakta olan kısımda başlayan semptomlarla başlar⁴⁰. Taksanlara bağlı gelişen nöropatinin mekanizması hala tam olarak bilinmemektedir. Taksanların hücre içi mikrotübüllerde agregasyonlar oluşturdıkları bilinmektedir. Nöronal hücrelerin mikrotübüllerinde oluşan bu anormal agregasyon sonucu nöropati oluşmaktadır⁴¹. Paklitakselin doza bağlı olarak polimerizasyon blokajı, mikrotübüllerin fonksiyonlarını

bozma ve t b linlere bağlanma yeteneğinin bir sonucu olarak genellikle duysal distal aksonopatiye neden olur. Paklitakselin kümülatif dozu $1000\text{mg}/\text{m}^2$ 'ı aştığında paklitaksel ile indüklenen periferel nöropati meydana gelir⁴². Paklitaksel tedavisinde meydana gelen polinöropati, paklitaksel tedavisinin 2. K r nde % 0.9 1. K r nde %9.3 oranında g r l r⁴³. Ratlarda paklitaksel ile indüklenen ağrılı periferel nöropati modelinde, allodini ve hiperaljezi 155 gün sürdüğü ve 27. Gün en yüksek seviyede olduğu g r lm řt r³⁰. Paklitakselin doz aralığı haftalık $60 - 70 \text{ mg}/\text{m}^2$ dır. $60 \text{ mg}/\text{m}^2$ den az paklitaksel terapisi uygulanan hastaların %5 inde erken nöropati g r lmemiřtir⁴⁴.

Yapılan araştırmalarda paklitaksel ile indüklenen periferel nöropatiyi önlemede nörotransmitter madde olan glutamatın etkili olduğu görülmüştür ve bu konuyla ilgili çalışmalar s rmektedir⁴⁵. Yapılan diğer araştırmalarda acetyl L- carnitin in de paklitaksel ile indüklenen periferel nöropatiyi azalttığı görülmüştür. şuan periferel nöropatiyi tam olarak tedavi edecek ya da azaltacak bir tedavi bulunamamıştır. Paklitaksel tedavisinin kesilmesinden aylar hatta yıllar sonra bile paklitaksel ile indüklenen periferel nöropati s rebilir⁴⁶. Paklitaksel ile albümün ile bağlı paklitaksel karşılaştırılmıştır. Yeni formülasyon %19'a karşı 533 gibi yüksek bir tümör yanıt oranı sağlarken %2 'ye %10 gibi daha yüksek bir nöropati oranı ortaya koymuřtur²³.

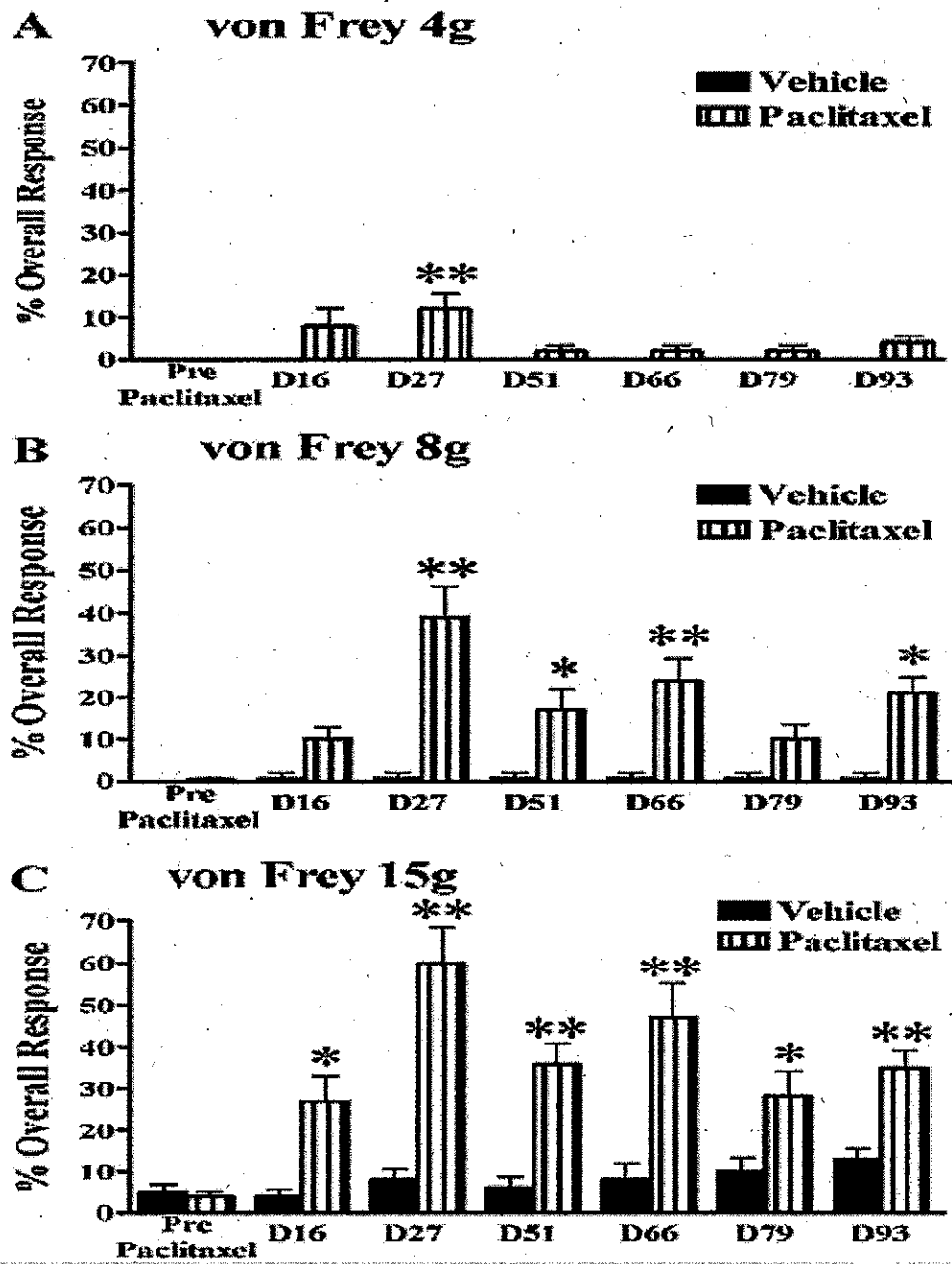
3.1.2. Nöropatik Ağrı

Nöropati ve nöropatiyi takip eden nöropatik ağrının insidansı; ilacın kümülatif dozuna ve diyabet, alkolizm ve diğer antineoplastik ajanlarla kombine tedavi gibi nörotoksik faktörlerin eşzamanlı varlığına baėlıdır⁴⁷. Zamanla şiddetlenen nöropatik ağrı çoğu kez yeterli paklitaksel dozunun yeterli süre uygulanmasını ve dolayısıyla tedavi başarısını engellemektedir⁷ (Tablo 1).

Allodini: Periferik ya da santral sinir sisteminde zedelenme olması nedeniyle meydana gelen nöropati sonucu ağrılı olmayan uyaranlara karşı ağrı oluşmasıdır. En küçük dokunmalar dahi ağrı olarak hissedilir⁴⁸. 4 g vonfrey flamentine verilen cevabın ölçüsü oluşan allodininin derecesini gösterir.

Hiperaljezi: Periferik ya da santral sinir sisteminde zedelenme olması nedeniyle meydana gelen nöropati sonucu ağrılı uyaranların etkisinin olduğundan daha fazla hissedilmesidir⁴⁹. 15 g vonfrey flamentine verilen cevabın ölçüsü oluşan hiperaljezinin derecesini gösterir.

Tablo 1: 250-300 gr ağırlığında spraque dawley ratlarına intraperitoneal olarak 1 gün arayla (0,2,4,6. günlerde) 2mg/kg doz paklitaksel enjekte edilmiş ve paklitaksel ile indüklenen allodini/hiperaljezi ölçülmüştür. Kaçınıcı gününde ne kadar cevap alındığı verilmiştir

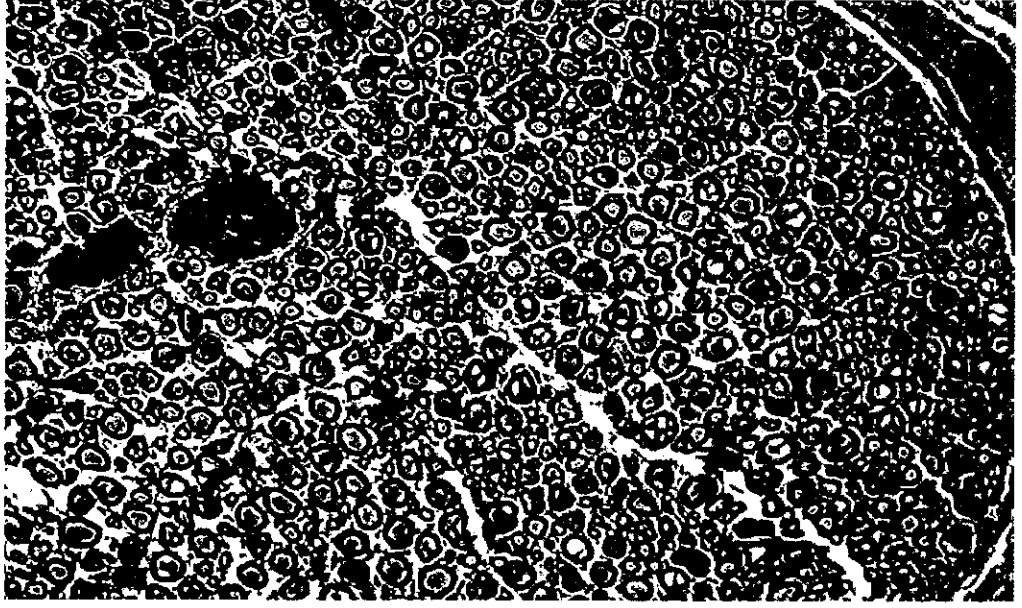


3.1.3. Periferik Nöron Dejenerasyonu

Paklitaksel; nöropati, nörotoksisite ve nöropatik ağrı gibi yan etkilerin yanında periferik sinir hücrelerinin, aksonların ve glia hücrelerinin yapısını bozarak fonksiyonlarını yerine getiremeyecek hale getirir⁴⁰. Periferik sinir hasarı nörotoksisitenin temeli olarak görülür⁷.

Nöronlar santral sinir sisteminin temel komponentleridir. Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı ve Hallervorden-Spatz sendromunu içeren bazı nörodejeneratif hastalıkların etiolojisinde önemli rol oynayan geri dönüşümsüz nöron dejenerasyonu ve santral sinir sistemi fonksiyonlarını onarmada önemli rol oynar⁵⁰. Paklitaksel ile indüklenen distal akson dejenerasyonunun aksonlar üzerinde direkt toksisite ile mi yoksa nöronal hücre üzerindeki toksisite sonucu olduğu tam olarak açık değildir. Yapılan çalışmalarda rekombinant insan eritropoetini aksonal toksisiteye karşı koruyucu olabileceği görülmüştür⁴⁰.

Paklitaksel verilen ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada paklitaksel alıp 1 hafta içinde opere edilen deneklerde, paklitakselin sinir rejenerasyonuna olumsuz etkisi görülmüştür. Ancak preoperatif uygulanan paklitakselin cerrahi erken yapılmadığı sürece periferik sinir rejenerasyonuna olumsuz etkisi olmadığı görülmüştür⁵¹ (Şekil 4). Nöron büyüme faktörünün paklitaksele bağlı toksisiteyi önleyebildiği fakat sisplatinle indüklenen nöron harabiyetine karşı koruyucu olmadığı görülmüştür⁵². Melatonininde nörodejeneratif bozukluklarda önleyici olduğu yapılan çalışmalarda görülmüştür⁵³.



Şekil 4: Paklitaksel verilmiş ratlarda postoperatif 90. günde yetersiz remiyelinizasyon

3.1.4. Periferel Nörotoksisite

Vücudun en karmaşık sistemi olan sinir sistemi, santral sinir sistemi (SSS) ve periferel sinir sistemi (PSS) olmak üzere iki bölümden oluşur. Beyin ve spinal kordadan oluşan SSS mental durum, bilinç düzeyi, motor gücü, serebeller ve kranial sinir fonksiyonlarından sorumludur. PSS üç fonksiyonel bölümden oluşur;

- Duyu sinirleri: dokunma, ağrı, sıcaklık, ayakta durmadan sorumludur.
- Motor sinirler: istemli hareket, kas tonusu ve koordinasyondan sorumludur.
- Otonom sinirler: barsak hareketleri, kan basıncı ve istemsiz kas hareketlerini kontrol eder.

Nörotoksisite santral sinir sistemi, periferik sinir sistemi, kranial sinirler ya da üçünün herhangi bir kombinasyonuna doğrudan ya da dolaylı hasar sonucunda ortaya çıkabilir⁵⁴.

Nörotoksisite tipleri;

Nöronopati: nöron hücre ölümü. Hücreler yerine konmaz.

Aksonopati: akson dejenerasyon. Geri dönüşümlüdür.

Myelinopati: myelin yapıda hasar.

İletim toksisitesi: nörotransmisyon bloke olur⁵⁵.

Kemoterapi temel olarak hem periferik nöropatiyi içeren periferik nörotoksisiteye hem de minör bilişsel yetersizlikten ensefalopati şekline değişik tablolarda görülen santral nöropatiye neden olur⁵⁶.

Nörotoksisite, bireyler arası önemli değişkenlik gösterir. Bu toksisite, haftalık uygulanan paklitaksel kürünün sıklığına ve dozuna bağlıdır. Yaş ve cinsiyet risk faktörleri ve azalan sinir plazma seviye faktörleri nörotoksisite üzerinde önemli rol oynayabilir⁵⁷. Periferik nörotoksisitenin altında yatan mekanizma nöronal DNA'ya doğrudan bağlanması aracılığıyla olabilir. Bu mekanizma periferik nörotoksisite boyunca olan aksonal transportun ve nöronal metabolizmanın bozulmasına bir cevap olabilir⁵⁸. Paklitaksel ratlar üzerinde duyuşal sinir iletim hızını azaltma ve tedavi edilen hastaların yüksek bir oranında periferik nörotoksisiteye neden olur fakat pNF-H immünoreaktif nöronların sayı ve büyüklüğü üzerinde bir etkisi yoktur. Paklitaksel nörotoksisitesinin mekanizması hücre yoğunluğundaki reaktif değişiklikleri, aksonal

zararla sonuçlanan mikrotübül polimerizasyonunun bozukluğunu ve mikrotübül bağlarını içerebilir⁵⁹.

Yapılan klinik çalışmalarda nörotoksisiteye neden olan paklitaksel düşük dozda verilse bile aşağıdaki özellikler görülür;

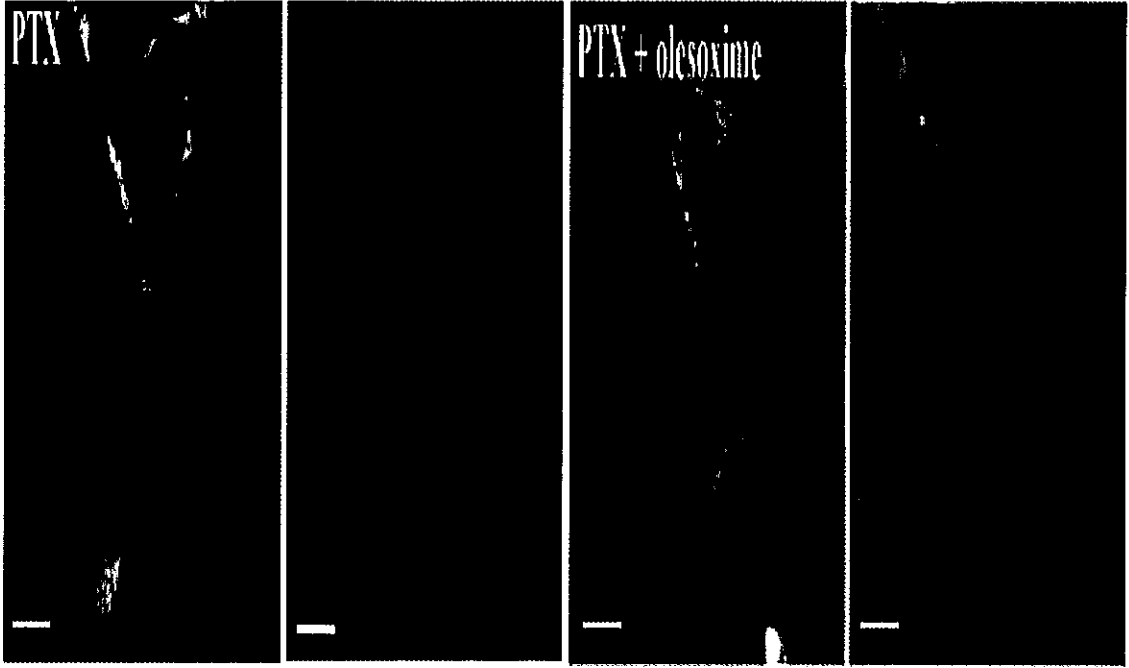
1- Hem büyük fiberler (titreşime duyarlı) ile küçük fiberler (ağrıya duyarlı) hem de duyu ile motor fiberlerin daha uzun süre tutulumu

2- Subjektif semptomlar (artaljezi, huzursuz bacak sendromu, miyaljeziyle ilgili olan distal pareteziler gibi) paklitaksel verildikten sonraki ilk birkaç saat içinde ortaya çıkar.

3- Nörofizyolojik belirtilerin artması

4- Ortaya çıkan nörotoksisitenin geri dönüşümünün mümkün olduğu görülmüştür⁴.

Terapiye başladıktan bir yıl sonra elde edilen bilgilere göre; nöropatinin duyusal komponenti çoğu hastada uzun süreli olabilir. Eğer sürekli kanser tedavisi hayatta kalmayı uzatırsa periferik nörotoksisite gibi yan etkilerden şikayet eden hasta sayısı artacaktır ve bu yan etkinin tedavi edilmesi daha da önemli hale gelecektir⁶⁰. Taksanlar ve vinka alkaloidlerin nörotoksisitesi hem canlı mikrotübüllerdeki hem de nöronal hücrelerdeki mikrotübüllerdeki bozukluklarla arasında ilişki bulunmuştur. Kolesterol gibi küçük bir bileşik olan olesoksim çeşitli nöron hücrelerinde nörotoksisiteye karşı koruyucu etkili olduğu görülmüştür⁶¹ (Şekil 5).



Şekil 5: Nöronlar üzerinde paklitakselin etkisi ve buna karşılık olesoksimin koruyucu etkisi

Çeşitli kemoterapi ilaçlarının akut ve kronik nörotoksisite profilleri arasındaki farklılıklar ve motor sinirlere karşı periferel duyular ile içerdikleri toksisitenin özgülüğü nörotoksisite ile ilişkili değildir. Paklitaksel ile kombine kullanılan platinüm ilaçlarının kronik ve akut nörotoksisite mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir. Ancak oksaliplatin, karboplatin ve sisplatinin kronik nöro duyusal toksisiteleri, platinümin nöronal birikmesinden dolayı olabilir⁶².

Şu ana kadar yapılan çalışmalarda plazmada ya da dokularda nörotropin seviyesindeki değişiklikler ve taksan nörotoksitesi arasında karşılıklı ilişki olamadığı kanıtlanmıştır. Ayrıca doğal bir bileşik olan acetyl-L carnitine (ALC) nin nöron koruyucu etkisi olduğu yapılan çalışmalarda görülmektedir⁶³. Oksidatif stresin azaltılmasının ve glutatyon peroksidaz aktivitesini artırmasının yanında antioksidan etkiler gösteren, hücre enerji metabolizmasında önemli olan alfa-lipoik asit (aLA) inde

paklitaksel nörotoksisitesine karşı koruyucu etkisi olduğu görülmüştür⁶⁴. Paklitaksel+sisplatin kombinasyon modeli, hem antineoplastik ilaçların etki mekanizmasını keşfetmek için hem de nöron koruyucuların etkilerinin saptanması için kullanılabilir⁶⁵.

Paklitaksel toksisitesini azaltmak için yapılan çalışmalarda chemophor kullanmadan çeşitli sulu çözeltiler yapılarak yeni formülasyonlar üretilmeye çalışılmıştır. Lipozomlar, yağ asitleri, antikor konjüгатları, nanokürecikler, makrokürecikler, siklodekstrin kompleksleri ve mukozaya yapışan jeller kullanılmıştır ve umut verici veriler elde edilmiştir⁶⁶.

4.1. Antioksidanlar

Antioksidanlar, diğer moleküllerin oksidasyonunu inhibe eden bir moleküldür. Oksidasyon, oksitleyici maddeden diğer maddeye elektron transfer eden kimyasal bir reaksiyondur. Oksidasyon reaksiyonları serbest radikaller üretebilir. Buna karşılık bu radikaller, hücrelere zarar veren zincir reaksiyonları başlatabilir. Antioksidanlar, suda veya lipide çözünenler olmak üzere iki geniş gruba ayrılırlar. Suda çözünen antioksidanlar hücre sıvısında veya kanda oksidanlarla tepkimeye girebilirler. Yağda çözünen antioksidanlar ise lipid peroksidasyonundan hücre zarını korurlar. Antioksidanlar vücutta sentezlenebildiği gibi, dışarıda yiyecekler vasıtasıyla da alınabilirler⁶⁷. Gıdalarla alınabilen en önemli antioksidanlar E, C vitamini ve betakarotendir. Soluduğumuz havadaki oksijen, vücut içinde serbest radikaller adı verilen ve zehirli etki gösteren bazı maddelerin oluşmasına neden olur. Demirin paslanması, balığın sudan çıktıktan sonra ölmesi oksijenin zararlı etkilerine örnektir⁸.

Antioksidanlar, kanser, koroner kalp rahatsızlığı gibi hastalıkların önlenmesinde diyetlere takviye olarak kullanılabilir. Ancak ilk çalışmalarda sağlığa faydalı olduğu görülse de daha sonra yapılan büyük çapta klinik çalışmalarında yararı tespit edilememiş ve aşırı takviyesinin zararlı olabileceği öne sürülmüştür. Diğer yandan meyve ve sebze ile beslenen insanların kalp hastalığı ya da nörolojik hastalıklara yakalanma riskinin düşük olduğu ve bazı kanser türlerine karşı koruyucu olduğuna dair kanıtlar vardır⁶⁷. Antioksidan bakımından zengin olan besinler ‘oksijen radikali emme kapasitesi’ (ORAC) yüksek olan besinler olarak tanımlanır. Meyve ve sebzelerin içerdikleri antioksidan kapasiteleri, sahip oldukları antioksidan etki bileşiklerinin miktarına ve türüne bağlı olarak farklılıklar gösterir. Yapılan araştırmalara göre günde yaklaşık olarak 3000-5000 ORAC değerine sahip yiyecek alındığında bedenin antioksidan kapasitesinin güçleneceği ve serbest radikal hasarından yeterince korunabildiği belirtilmektedir⁹.

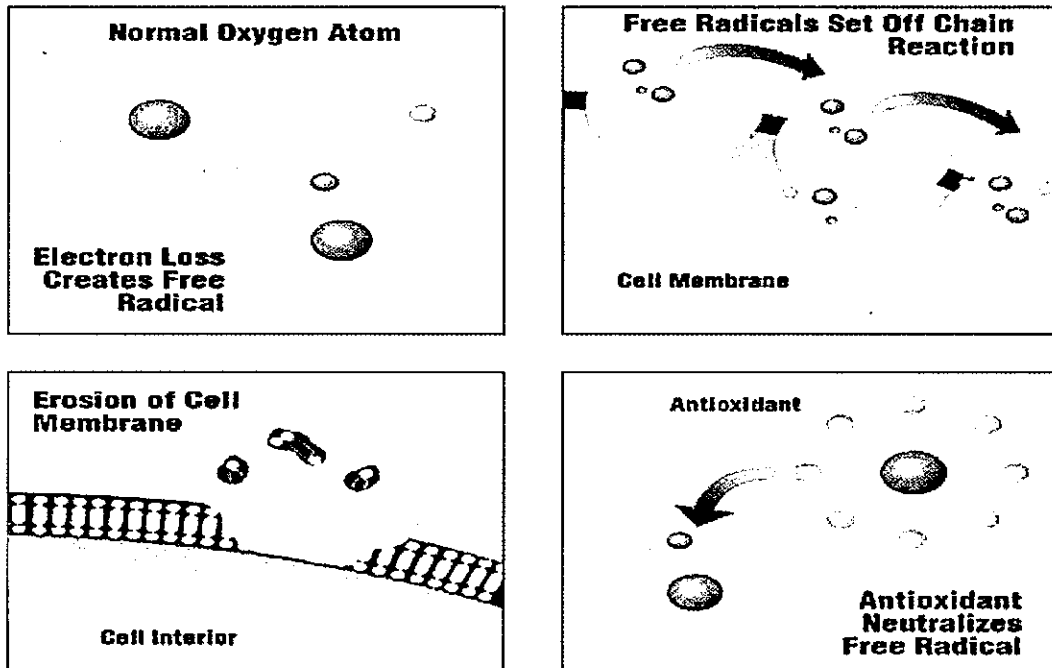
Yapılan çalışmalarda ise beyin yaralanmaları ve Parkinson, Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklar için olası bir tedavi olarak kullanılabileceği görülmüştür⁶⁷. Parkinson hastalığı hücre modellerindeki toksisiteye karşı antioksidan Rgl in nöroprotektif etkisi olduğu bildirilmiştir. Burada nörotransmitter madde olan dopaminin önemli rol oynadığı düşünülmektedir⁶⁸. Oksidatif strese karşı tedavi edici özelliği bulunan antioksidanların, mide kanserine karşı etkili olduğu görülmüştür⁶⁹.

Oksidanlar ve serbest radikaller endoplazmik retikulumdaki serbest kalsiyumu inhibe eder. ER Ca^{+2} ‘un oksidan toksisitesinde önemli bir rol oynar. Nörotoksin olan nitrik oksitin nörotoksisite ve nöroprotektik etkide ikili rol oynadığı bilinmektedir⁷⁰. Çeşitli nöroprotektif ajanların, nörotrofik faktörlerin ve antioksidanların taksanlarla

indüklenen periferel nöropatiyi önlemeye yardımcı olabileceği yapılan çalışmalarda görülmüştür⁷.

Vitamin D, vitamin E ve salisilik asit gibi antioksidanların serbest oksijen radikallerini baskılayabildiği yapılan çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir⁷¹.

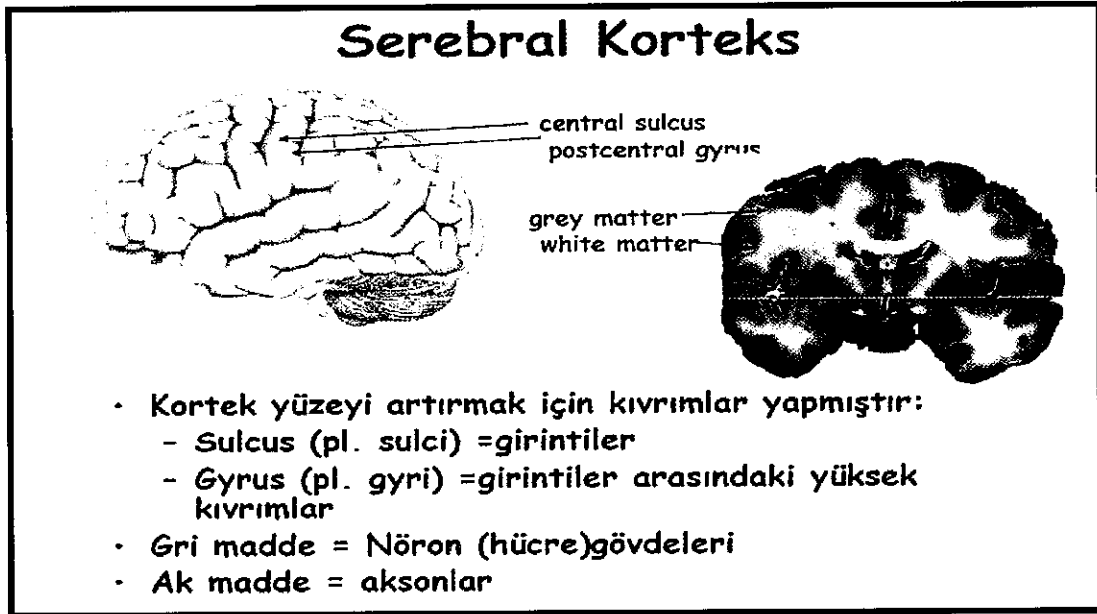
Son çalışmalar bitkiler, bazı böcekler, mantarlar ve mikrobik hastalıklardan kendilerini korumak için aspirinin etken maddesi olan salisilik asit ürettiği gösterilmiştir. Yeterli derecede sebze yiyen kişilerin vücutlarındaki salisilik asit oranının belirli bir doza yükseldiği görülmüş. Salisilik asit birçok meyve ve sebzenin yapısında bulunmaktadır. Salisilik asitin özellikle kolon poliplerinin kansere dönüşmesini engellediği bilinmektedir⁷² (Şekil 6).



Şekil 6: Antioksidanların hücre membranı üzerine etkisi

5.1. Beyin

Hayvan anatomisinde beyin veya ensefalon, merkezi sinir sisteminin yönetim merkezidir. Birçok hayvanda beyin, kafanın içinde, birincil duyu organlarının ve ağzın yakınında yerleşmiştir. Tüm omurgalılarda beyin olduğu gibi, omurgasızlarda da merkezileşmiş bir beyin veya birbirinden bağımsız ganglionlar topluluğu vardır. Örneğin insan beyni 100 milyar'dan fazla nöron içerir ve bu nöronların her biri, kendi gibi 10.000 tanesiyle bağ yapar⁷³ (Şekil 7). Beyin ve omurilik, birlikte, merkezi sinir sistemini oluştururken 12 kafa siniriyle 31 belkemiği siniri de çevresel sinir sistemini oluşturur. Beyin dokusunu mikroskop altında incelenirse, başlıca iki tür hücreden oluştuğunu görülür, bunlar, nöronlar (sinir hücresi) ve nöronlar için koruyucu bir çevre oluşturan nöroglialar yani destek hücreleridir.



Şekil 7: Beyin korteksinin kısımları.

Beyin, arka (yamuk) beyin, orta beyin ve ön beyin olmak üzere kabaca üç bölüme ayrılır. Arka beyin, beyin sapı ve beyincik olarak ikiye ayrılır. Ön beyin ise ara beyin, talamus ve hipotalamus olarak üçe ayrılır.

1.Arka beyin	2. orta beyin	3. ön beyin
Beyin sapı		Talamus
Soğanilik		Hipotamus
Köprü		Arabeyin

5.1.1. Serebral Korteks

Beyin kabuğu (korteks), sinirlerin duyu organlarından (göz, kulak, deri, dil, burun) beyine getirdiği bilgilerin alındığı kısımdır. Kabuk aslında kaslara, salgı bezlerine ve vücudun çalışan diğer kısımlarına beyin tarafından verilen emirlerin çıkış yaptığı yerdir, bilindiği gibi bu emirler ilgili yerlere hareket sinirleri tarafından iletilmektedir.

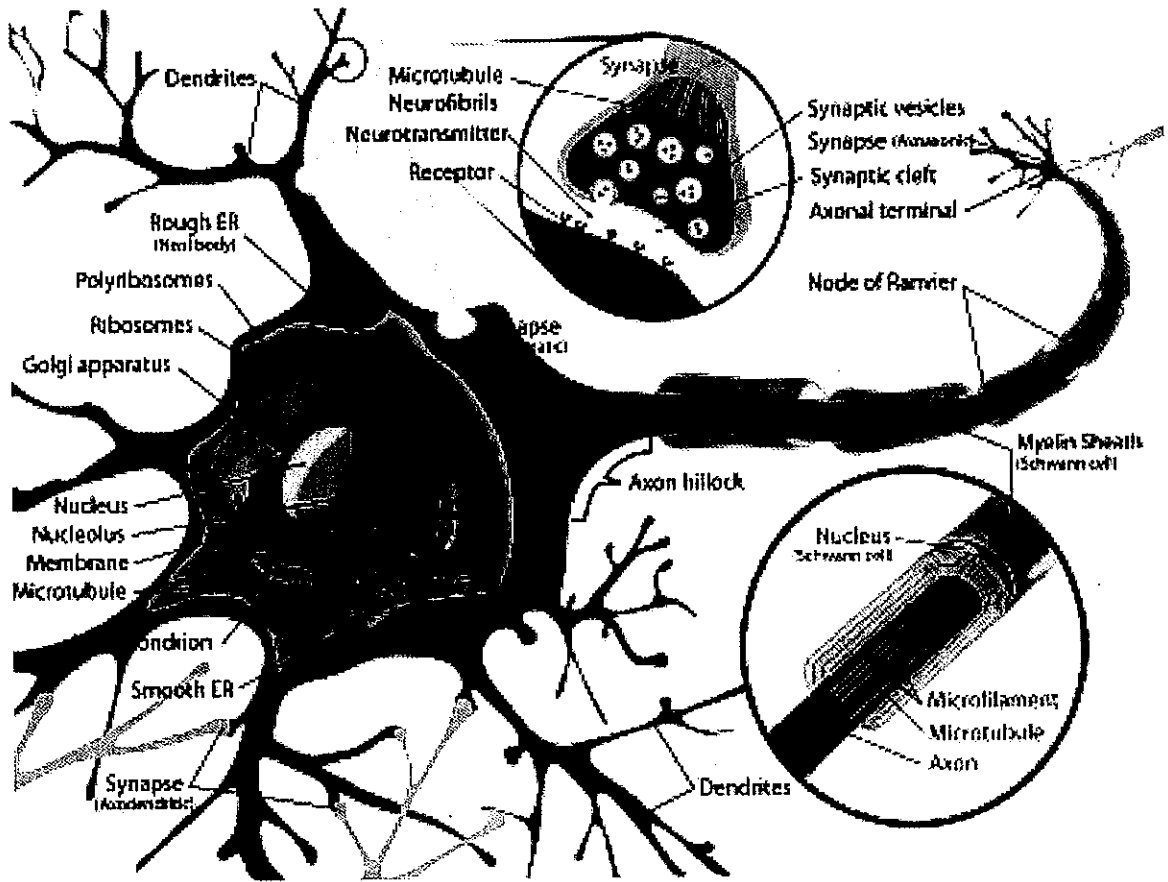
Beynin yüzeyini kaplayan madde, erişkinde ortalama 3,2 mm kalınlığındadır. Onun altında ise beyazımsı ve milyonlarca sinir elyafından oluşan ak madde vardır. Ak maddenin beyazımsı renkte olması miyelin adındaki yağlı bir maddeden ileri gelir, tıpkı elektrik kablolarının dış yüzeyindeki izole edici plastik kısımlar gibi miyelin de sinir liflerinin dış yüzeyini kaplar. İki yarım küreyi birbirine bağlayan ve kalın bir ipi andıran kısım çok sayıda sinir lifinin (elyafının) bir araya toplanmasıyla oluşmuştur. Bu birleştirme kablosuna beyin büyük birleşigi denir. Buna benzer fakat daha küçük sinir lifi demetleri, beyin kabuğunu orta beyin arka beyin ve omuriliğin çeşitli kısımlarını birleştirir, böylece beyin kısımlarının hem ayrı ayrı hem de ortaklaşa çalışması sağlanarak insan hayatının duygusal ve mantıksal mucizeleri gerçekleştirilir.

5.1.2. Nöron

Sinir hücresi, ya da nöron sinir sisteminin temel fonksiyonel birimidir. Çeşitli biçim ve büyüklüklerde olabilir. Sinirsel uyarıları elektriksel ve kimyasal yolla iletir. Hücre gövdesi büyüktür ve çekirdek burada yer alır. Kısa uzantıları dendrit, uzun uzantıları akson olarak adlandırılan sinir sistemini oluşturan hücrelerdir. Nöron çeşitlerine göre, nöron gövdesinden çıkan uzantıların sayısı ve şekli değişiktir. Akson ve dendrit denilen uzantıları vardır. Başka hücrelerden gelen uyarılar dendritlerin uçlarından alınır ve aksonların uçlarından diğer hücrelere iletilir. Nöron gövdesinden bir dendrit, bir akson çıktıktan sonra bir araya gelerek tek bir uzantı halinde hücreden ayrılıyorsa tek kutuplu görünürler. Dendrit ve akson, nöron gövdesinin birbirine karşı gelen iki bölgesinden çıkarlarsa nöron iki uzantılıdır, iki kutuplu nöron olarak adlandırılır. Nöron gövdesinden çok sayıda dendrit ve tek bir akson çıkıyorsa bu hücre çok kutuplu nöron adı verilir⁷⁴ (Şekil 8).

Görevlerine göre sinir hücresi tipleri;

- Duyu nöronları: Duyu reseptöründen aldığı uyarıları merkezi sinir sistemine (beyin ve omurilik) taşır.
- Ara nöronlar: Bunlar, merkezi sinir sisteminde bulunurlar. Duyu nöronlarıyla gelen bilgileri değerlendirirler ve sonuçlarını motor nöronlara aktarırlar.
- Motor nöronlar: Bunlar, merkezi sinir sistemindeki ara nöronlardan aldıkları bilgiyi kas ve salgı bezi gibi yapılara götürürler. Motor nöronların etkisiyle kas veya salgı bezleri faaliyete geçer.



Şekil 8: Tam nöron diagramı

Şekillerine göre nöron çeşitleri

- Tek kutuplu Nöronlar(Unipolar):Bu tip nöronda bir tane uzantı vardır. Gövdeden çıkan bu uzantı sonradan dallanma yapabilir. Omurgasız hayvanların motor nöronları tek kutupludur.
- İki Kutuplu Nöronlar(Bipolar):Bu tür sinir hücrelerinde akson ile dentritler hücre gövdesinin karşılıklı kutuplarından çıkarlar. Daha sonra bu uzantılar dallanabilir.
- Çok Kutuplu Nöronlar(Multipolar):Bu tip nöronların gövdesinden çok sayıda uzantı çıkar. Bu tip hücrelerde bir akson ile çok sayıda dendrit bulunur⁷⁵.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edilen yeni doğan (en fazla 3 günlük) *Sprague Dawley* cinsi toplam 9 adet (3 tekrar) deney hayvanları kullanıldı. Hayvanları etik kurallara uygun olarak dekapite edildi ve elde edilen nöronlar hücre kültürü ortamında yaşatıldı. Çalışmamızın bütün aşamalarının etik kurallara uygun olduğu "Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü Etik Kurulu" tarafından verilen 26 Ekim 2010 tarihli ve 30.2.ATA.0.01.00.00/00/2836 sayılı yazı ile ve "Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (AÜHADYЕК)" tarafından verilen 19 Ekim 2010 tarihli ve B.30.2.ATA.0.01.02/5515 sayılı yazı ile onaylanmıştır.

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Paklitaksel (Taxol® 6 mg/ml flakon, Bristol Myers Squibb, Brooklyn, New York, USA)
- Sisplatin (Cisplatin® 10 mg/ml flakon, Pharmachemie BV, Swensweg 5, Haarlem, Holland)
- Salisilik asit (Riedel-de haen, 27301 1kg, CAS-Nr: 69-72-7)
- 100 ml Trypsin EDTA-C (Multicell)
- 100 ml Fetal Calf Serum (PAN Biotech)
- PBS (fosfat buffer solution)
- DNAaz tip 1 (120 µ/ml, Sigma, St Louis, USA)
- Neuronal base medium

- 10 ml Pencillin-Streptomycin-A (PAN Biotech)
- B27 (GIBCO® B-27® Supplement)
- Hank's Blanced Salt Solution (HBSS) (Sigma)
- TAS (total antioxidant status) Rel Assay Diagnostics®
- TOS (total oxidant status) Rel Assay Diagnostics®

3.3. Kullanılan Alet ve Cihazlar

- CO₂ Incubator (NAPCO 6500 IR)
- mQuant spectrophotometer
- Buzdolabı (Arçelik 5231 NFY)
- Invert mikroskop (Olympus CKX41)
- Elektronik terazi (Precisa 160 M)
- Santrifüj
- 48 kuyucuklu plate, hücre kültür plağı (Costar)
- 12 ml hücre kültür tüpü (Grainer Bio-one CELLSTAR)
- 5 cc steril enjektör (HAYAT Tıbbi Aletler)
- Otomatik pipetler 100-1000 µL (SUCCOREX)
- Mikropipet uçları 100-1000 µL (Labtips)
- Plastik pastör pipeti
- 20 numaralı bistürü
- Makas
- Beyin kaşığı
- Steril gazlı bez
- Steril petri

3.4. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Hank's Blanced Salt Solution (HBSS) hazırlama;

CaCl	0,185 gr/L
MgSO ₄	0,097 gr/L
KCl	0,4 gr/L
KP (Monobazik)	0,06 gr/L
NaCl	8 gr/L

Yukarıda adı verilen kimyasal maddeler karşılarında belirtilen miktarların 1/10'u tartılarak bir cam behere konur ve üzerine 100 ml distile su konarak çözündürülür ve HBSS çözeltisi elde edilir.

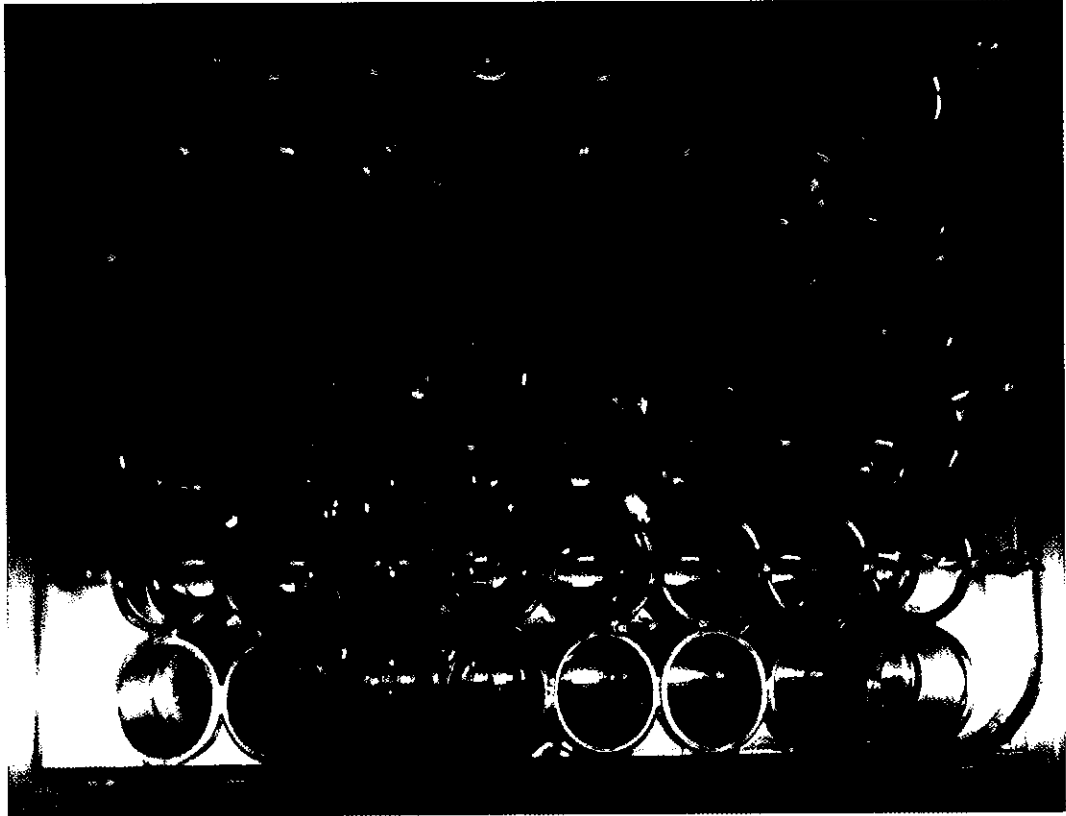
3.5. Nöron Kültürü Hazırlama

9 adet yeni doğmuş (24 saati doldurmamış) rat yavrusunu alındı. Batikonla yıkandıktan sonra steril ortamda dekapite edildi⁷⁶. Baş kısmında; önce derisi ve kafatası kaldırıldı, ince beyin zarını da ayırdıktan sonra beyinden korteks kısmı dikkatlice ayırıp alındı. İçinde HBSS solüsyonu bulunan tüplere korteks kısımları koyuldu. Tüpleri etüve bırakıldı. Sterilizasyona çok dikkat ederek etüvden alındı. Dibe çökmüş olan beyinlerin üzerindeki HBSS döküldü. Beyinleri steril petri kabına koyularak 20 numaralı steril bisturi ile doğrayarak makro parçalama yapıldı. Parçaladığımız beyin parçalarının üzerine 1,5 ml HBSS ile 0,3 tripsin eklendi(1/4 oranında). Enjektörle çekip 15 ml'lik tüpe koyuldu, Tripsinin mikro parçalama yapabilmesi için 35 dk etüvde bekletildi.

Tripsinin parçalayıcı etkisini durdurmak amacıyla DNaz I in bulunduğu kabın içine, tripsin ile muamele edilen korteksler eklendi⁷⁷. DNaz I in bulunduğu kabın içine %10 oranında Fotal Calf Serum eklendi. DN az I in parçalamayı durdurarak tripsini

dokulardan ayırması için 10 dk beklendi. Bu sıvının üzerine 6ml HBSS eklendi ve 800 devirde 10 dk santrifüj edildi. Dibe çöken beyinlerin üzerindeki HBSS döküldü ve üzerine 10 ml nöronal base medium koyuldu⁷⁸. Üzerine nöronal base medimun suplementi olan B27, 1/50 oranında eklendi. Üzerine 1/1000 oranında penicilin eklendi.

48'lik flaskların her odasına 180 µl kondu ve 37 °C'de, %5 CO₂ içeren etüve bırakıldı. 1 hafta sonra odalara yapışmış olan hücrelerin bulunduğu her odaya hacimlerinin 1/2 oranında nörobasal medium + B27 + antibiyotik den oluşan ekim ortamı eklendi ve nöron hücrelerinin flask tabanını kaplayacak ve mikroskop altında dallanma gösterecek kadar beklendi.



Şekil 9: Hücrelerin konulduğu 48 kuyucuklu plate'in üstten görünüşü

3.6. Paklitaksel, Sisplatin ve Salisilik Asit Uygulanması

Onuncu gün bazı kuyucuklara, farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış olan salisilik asit çözeltisi bir gün arayla konuldu. 10^{-4} M ve 10^{-5} M 'lık konsantrasyonlar uygulandı.

Salisilik asitin formülü: $C_7H_6O_3$; molekül ağırlığı (M_A): 138,12 g/mol 'dür. 138.12 gr, 1 litre (L) çözeltide 1 molar (M)'dır. 0.138 gr 1 L distile suda çözündürülerek 10^{-3} molar (M)'lık çözelti elde edildi. 0.0138 gr salisilik asit 10 ml distile suda çözündürülerek 10^{-2} molar (M)'lık çözelti elde edildi. Bu çözeltiden 1 ml alındı 9 ml distile suda çözündürülerek 10^{-3} molar (M)'lık çözelti elde edildi. Bu çözeltiden 1 ml alınarak üzerine 9 ml distile su eklendi ve bu çözeltiden kuyucuktaki sıvı miktarının 10 da 1'i kuyucuğa eklenerek kuyucukta 10^{-4} M'lık çözelti elde edildi. 10^{-3} molar (M)'lık çözeltiden 1 ml alınarak üzerine 9 ml distile su eklendi ve 10^{-4} M'lık çözelti elde edilmiş oldu. Bu çözeltiden kuyucuktaki sıvının 10 da 1'i kadar çözelti eklenerek kuyucukta 10^{-5} molar (M)'lık çözelti elde edildi (Tablo 2).

Onikinci gün bazı kuyucuklara, farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış olan paklitaksel çözeltisi bir kereye mahsus olmak üzere konuldu. Daha önceki bazı çalışmalarda paklitakselin en etkin olduğu konsantrasyonlar 10^{-7} M ve 10^{-8} M olarak rapor edilmiştir⁷⁹. Bu çalışmada da literatür ile uyumlu konsantrasyonlarda hazırlanan paklitaksel çözeltileri hücrelere uygulandı.

Paklitakselin formülü: $C_{47}H_{51}NO_{14}$ ³⁶; molekül ağırlığı (M_A): 853 gr'dır^{36, 37}. Bir ml'si 6 mg'a denk gelmektedir. 853 gr, 1 litre (L) çözeltide 1 molar (M)'dır. 853 mg 1 L etil alkolde çözündürülerek 10^{-3} molar (M)'lık çözelti elde edildi. 0,853 mg (0,14 ml paklitaksel) 10 cc etil alkolde çözündürülerek 10^{-4} molar (M)'lık çözelti elde edildi. Bu çözeltiden 0,1 ml alındı 10 cc etil alkolde çözündürülerek 10^{-6} molar (M)'lık çözelti elde

edildi. Bu çözeltiden 1 ml alınarak üzerine 9 ml etil alkol eklendi ve 10^{-7} M'lık çözelti elde edildi. Bundan da 1 ml alınarak üzerine 9 ml etil alkol eklendi ve 10^{-8} M'lık çözelti elde edilmiş oldu.

Paklitaksel uygulanacak olan her bir kuyucuğun içerdiği kültür miktarı otomatik pipetle ölçüldükten sonra tekrar eski yerine bırakıldı ve miktarı saptanmış olan kültürlerin üzerine kültür miktarlarının $1/10$ 'u kadar paklitaksel uygulandı (Tablo 2).

Tablo 2.a. Çalışmada kullanılan ilaçların 1. plate içerisinde konulduğu kuyucukların numaraları.

1. Plate

Grup 1	Grup 4	Grup 2	Grup 6	Grup 5	Grup 3	Grup 7	Grup 1
Grup 2	Grup 1	Grup 7	Grup 3	Grup 6	Grup 4	Grup 5	Grup 3
Grup 3	Grup 5	Grup 4	Grup 7	Grup 2	Grup 1	Grup 6	Grup 7
☐	Grup 7	Grup 1	Grup 6	Grup 5	Grup 3	Grup 2	Grup 4
☐	☐	Grup 3	Grup 6	Grup 2	Grup 4	Grup 5	Grup 1
☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

Grup 1= Kontrol

Grup 4= 10^{-7} P + 10^{-4} SA

Grup 7= 10^{-8} P + 10^{-5} SA

Grup 2= 10^{-7} P

Grup 5= 10^{-7} P + 10^{-5} SA

☐= Kontamine olmuş

Grup 3= 10^{-8} P

Grup 6= 10^{-8} P + 10^{-4} SA

P= Paklitaksel

SA= Salisilik asit

Tablo 2.b. Çalışmada kullanılan ilaçların 2. plate içerisinde konulduğu kuyucukların numaraları.

2. Plate

Grup 1	☐	☐	Grup 2	Grup 7	Grup 3	Grup 4	☐
Grup 2	Grup 5	Grup 3	Grup 1	Grup 6	Grup 7	Grup 6	Grup 3
☐	Grup 4	Grup 2	Grup 5	Grup 7	Grup 1	Grup 6	Grup 1
☐	Grup 7	Grup 1	Grup 4	Grup 2	Grup 3	Grup 5	Grup 6
Grup 6	Grup 5	Grup 3	Grup 6	Grup 1	Grup 4	Grup 2	☐
Grup 4	Grup 2	Grup 7	Grup 3	Grup 2	Grup 5	Grup 1	☐

Grup 1= Kontrol Grup 4= 10^{-7} P + 10^{-4} SA Grup 7= 10^{-8} P + 10^{-5} SA

Grup 2= 10^{-7} P Grup 5= 10^{-7} P + 10^{-5} SA ☐= Kontamine olmuş

Grup 3= 10^{-8} P Grup 6= 10^{-8} P + 10^{-4} SA

P= Paklitaksel

SA= Salisilik asit

Sisplatin ise 50 µl ve 100 µl dozlarında uygulanmıştır. Literatür taramasında en en toksik doz olarak bu aralık kullanılmıştır. paklitaksel ile salisilik asit deneyindeki gibi 7 grup oluşturulmuştur. n = 6 olarak belirlenmiştir (Tablo 2.c)

Tablo 2.c. Çalışmada kullanılan ilaçların 3. plate içerisinde konulduğu kuyucukların numaraları.

3. Plate

Grup 7	Grup 1	Grup 4	Grup 2	Grup 7	Grup 2	Grup 4	Grup 5
☐	Grup 3	Grup 5	Grup 3	Grup 6	Grup 7	Grup 6	Grup 3
☐	Grup 6	Grup 2	Grup 5	Grup 7	Grup 1	Grup 3	Grup 1
☐	Grup 7	Grup 1	Grup 4	Grup 2	Grup 3	Grup 5	Grup 6
Grup 6	Grup 5	Grup 6	☐	Grup 1	Grup 4	Grup 2	Grup 4
Grup 4	Grup 2	Grup 7	☐	Grup 4	Grup 5	Grup 1	Grup 3

Grup 1= Kontrol Grup 4= 50µM S+10⁻⁴ SA Grup 7= 100µM S+10⁻⁵ SA

Grup 2= 50 µM S Grup 5= 50µM S+10⁻⁵ SA ☐= Kontamine olmuş

Grup 3= 100 µM S Grup 6= 100µM S+10⁻⁴ SA

S= Sisplatin

SA= Salisilik asit

3.7. MTT analizi

MTT reaktifinin hazırlanması:

1 mL analiz tamponu(şişel #2) şişe #1 içerisine ilave edilip pipetle iyice karıştırılarak MTT Reaktifi(şişe 1 #) çözülür. Tampon şişe #2'ye geri alınır ve kalan Analiz Tamponu ile karıştırılır. Şişe #1'in bütün içeriği çözünene ve şişe #2'ye aktarılan kadar tekrarlanır. Sonuç çözeltinin rengi sapsarı olmalıdır. Eğer sulandırılmış MTT reaktifinin tamamı bir analizde kullanılmıyacaksa küçük parçalara ayrılıp -20°C'

de muhafaza edilmelidir. -20°C'de muhafaza edildiğinde hazırlanmış MTT reaktifi birkaç ay stabil kalır. Tekrarlanan dondurup çözme işleminden kaçınılmalıdır.

Analizin Uygulanması

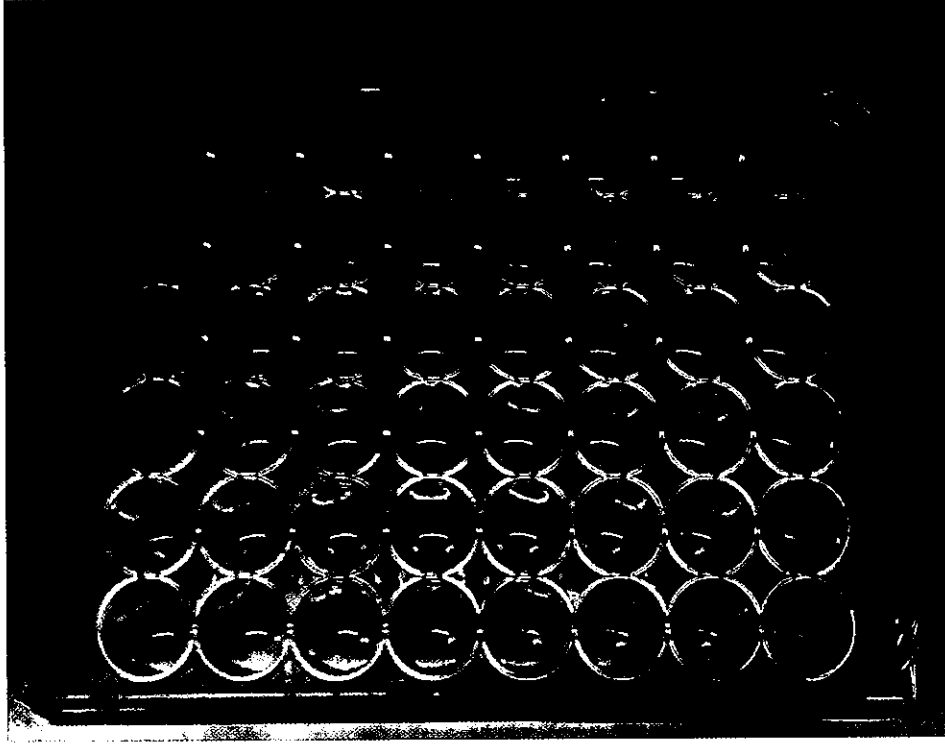
Plate düzenleme:

Plate bölmelerinin kullanımı için hazırlama şablonu yoktur. Tipik bir deney plate'i hücre bulunmayan bölmeler, deneysel bileşik ile muamele edilmiş hücre içeren bölmeler ve deneysel bileşik ile muamele edilmemiş hücreler içermelidir. Herbir muamelenin üç kez gerçekleştirilmesini ve her bir bölme için template içeriğini kaydetmenizi tavsiye ederiz.

Prosedür:

1. Hücreler 48'lik bir plate'e bölme başına 100 μ L kültür mediumu içerisinde 10^4 ($a=5$) hücre bulunacak şekilde, muamele edilecek bileşikle birlikte veya muamele edilecek bileşikten yoksun olarak ekilir. Hücrelerin CO₂ etüvünde 37°C'de 24-48 saat süre ile kültürü yapılır.
2. Her bir bölmeye pipet aracılığı ile 10'ar μ L MTT karışımı eklenir.
3. Dairesel karıştırıcıda bir dakika hafifçe karıştırılır.
4. Hücreler CO₂ etüvünde 3-4 saat 37°C'de inkübe edilir. İnkübasyondan sonra hücrelerde oluşan formazan bölmelerin dibinde koyu kristaller halinde görülür.
5. Kültür mediumu hücre tabakasını dağıtmadan dikkatli bir şekilde her bir bölmeden aspire edilir. Alternatif olarak dibe yapışmayan hücrelerin çökmesi için medium aspire edilmeden önce plate 400 x g'da 10 dk santrifüjlenir.
6. Her bir bölmeye 100 μ L Cistal Çözücü Solüsyon (şişe #3) eklenir. Bu solüsyon formazan kristalleri çözecek ve portakal renginde bir solüsyon oluşturacaktır.

7. Her bir numunenin absorbansı 570 nm'de microplate okuyucu kullanılarak ölçülür.



Şekil 10 : MTT analizi sırasında plate'lerin görünümü

3.8. Antioksidan ve oksidan kapasitelerin ölçülmesi

Toplam Antioksidan Kapasitesi (TAK)

TAK düzeyi tespitinde, ilk olarak Tomasch *et al.* (2001) tarafından uygulanan fotomerik yöntem kullanıldı. Bu yöntem 2-2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sülfonat = ABTS⁺) radikal kationunun oluşumunu inhibe edecek antioksidan kapasitenin tespitini temel almaktadır. Tespit işleminde Rel Assay Diagnostics®

firması tarafından üretilen TAS (total antioxidant status) ticari kitleri kullanıldı (Erel 2004).

Kit Bileşenleri

- Reaktif 1 Solüsyonu: 50 ml
- Reaktif 2 Solüsyonu: 10 ml
- Standard 1 Solüsyonu: 10 ml
- Standard 2 Solüsyonu: 10ml

30 µl örneğin bulunduğu platelere 500 µl Reaktif 1 solüsyonundan ilave edilerek 660 nm’de ilk absorbansı okundu. Daha sonra aynı küvete 75 µl Reaktif 2 solüsyonundan eklenerek oda sıcaklığında 10 dk. bekletildi. Bekleme sonunda 660 nm’de ikinci kez absorbansı okundu. Elde edilen absorbans değerleri aşağıdaki formülde uygun yerlere konularak mmol Trolox Equiv./L cinsinden TAK düzeyleri tespit edildi.

$$\text{TAK (mmol Trolox Equiv./L)} = [(\Delta \text{Standart 1'in absorbansı}) - (\Delta \text{Örneğin absorbansı})] / [(\Delta \text{Standart 1'in absorbansı}) - (\Delta \text{Standart 2'nin absorbansı})] * 20$$

Toplam Oksidan Durum (TOD)

TOD (total oksidan durum), tam otomatik kolorimetrik bir yöntemdir. İncelenen numunede bulunan oksidanlar ferroz iyon-*o*-dianisidin yapısını ferik iyonla oksitlerler. Bu reaksiyonu ortamda bulunan gliserol yaklaşık üç kat hızlandırmaktadır. Asidik ortamda ferrik iyonlar “xylenol orange” ile renkli bir kompleks meydana getirirler. Numunede bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin yoğunluğu

spektrofotometrik olarak ölçülerek değerlendirme yapılır. Araştırmamızda Rel Assay Diagnostics® firması tarafından üretilen TOS (total oxidant status) ticari kitleri kullanıldı.

Kit Bileşenleri

- Reaktif 1 Solüsyonu: 50 ml
- Reaktif 2 Solüsyonu: 10 ml
- Standard 1 Solüsyonu: 10 ml
- Standard 2 Solüsyonu: 10ml

75 µl örneğin bulunduğu platelere 500 µl Reaktif 1 solüsyonundan ilave edilerek 530 nm’de ilk absorbansı okundu. Daha sonra aynı küvete 25 µl Reaktif 2 solüsyonundan eklenerek oda sıcaklığında 10 dk. bekletildi. Bekleme sonunda 530 nm’de ikinci kez absorbansı okundu. Elde edilen absorbans değerleri aşağıdaki formülde uygun yerlere konularak mmol Trolox Equiv./L cinsinden TOD düzeyleri tespit edildi.

$$\text{TOD (mmol Trolox Equiv./L)} = (\Delta \text{Örneğin absorbansı} / \Delta \text{Standart 2'nin absorbansı}) * \text{Standart 2}$$

3.9. İstatiksel analizler

mQuant spektrofotometre ile elde edilen sayısal verilerin istatistiksel analizleri “SPSS® for Windows computing program, Version 15.0” ile gerçekleştirildi. İstatistiksel değerlendirme için One Way Anova Test’ini takiben Post Hoc LSD testi kullanıldı. İstatistiksel önemlilik düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Tablo 3: Paklitakselin oluşturduğu nörotoksisite sonucu hücre sayısı ile orantılı absorbans değerleri (570 nm de okunan mtt analizi sonucu).

Grup	n (kuyucuk sayısı)	Ortalama $\pm$ SD	P
Kontrol	11	74 $\pm$ 33	
10 ⁻⁷ Paklitaksel	11	47 $\pm$ 7*	<0,05
10 ⁻⁸ Paklitaksel	10	53 $\pm$ 14*	<0,05
10 ⁻⁴ Salisilik asit +10 ⁻⁷ Paklitaksel	10	52 $\pm$ 18	>0,05
10 ⁻⁵ Salisilik asit +10 ⁻⁷ Paklitaksel	10	47 $\pm$ 5	>0,05
10 ⁻⁴ Salisilik asit +10 ⁻⁸ Paklitaksel	10	43 $\pm$ 36	>0,05
10 ⁻⁵ Salisilik asit +10 ⁻⁸ Paklitaksel	7	52 $\pm$ 2	>0,05

* =p<0,05 (SA'in paklitaksel toksisitesini anlamlı şekilde döndürebilmesi)

Tablo 3'e göre yeni doğan sıçan nöron hücre kültürlerinde 74 $\pm$ 33 olarak elde edilen kontrol gruplarına göre 10⁻⁷ M ve 10⁻⁸ M paklitaksel hücre absorbans değerleri sırasıyla 47 $\pm$ 7* ve 53 $\pm$ 14* olarak anlamlı bulunmuştur. Kontrol grubuna göre 10⁻⁷ ve 10⁻⁸ M paklitaksel ile salisilik asit verilen gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel fark görülememiştir.

Tablo 4: Paklitakselin oluşturduğu nörotoksisite sonucu hücre kültür sıvısında yapılan 660 nm de spektrofotometrik olarak okunan total antioksidan kapasite testi değerleri.

Grup	n (kuyucuk sayısı)	Ortalama $\pm$ SD	P
Kontrol	11	1,23 $\pm$ 0,32	
10 ⁻⁷ paklitaksel	11	1,12 $\pm$ 0,27*	<0,05
10 ⁻⁸ paklitaksel	10	1,11 $\pm$ 0,19*	<0,05
10 ⁻⁴ Salisilik asit +10 ⁻⁷ Paklitaksel	10	1,21 $\pm$ 0,37	>0,05
10 ⁻⁵ Salisilik asit +10 ⁻⁷ Paklitaksel	10	1,18 $\pm$ 0,25	>0,05
10 ⁻⁴ Salisilik asit +10 ⁻⁸ Paklitaksel	10	1,18 $\pm$ 0,29	>0,05
10 ⁻⁵ salisilik asit +10 ⁻⁸ Paklitaksel	7	1,19 $\pm$ 0,18	>0,05

* =p<0,05 (SA'ın paklitaksel toksisitesini anlamlı şekilde döndürebilmesi)

Tablo 4'e göre yeni doğan sıçan nöron hücre kültürlerinde total antioksidan kapasite ölçüm değerlerine göre 1,23 $\pm$ 0,32 olarak elde edilen kontrol gruplarına total antioksidan kapasite ölçüm değerlerini 10⁻⁷ M ve 10⁻⁸ M paklitaksele muamele sonrası sırasıyla 1,12 $\pm$ 0,27* - 1,11 $\pm$ 0,19* olarak anlamlı şekilde değiştirmiştir. Kontrol grubuna göre 10⁻⁷ ve 10⁻⁸ M paklitaksel ile salisilik asit verilen gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel fark görülememiştir.

Tablo 5: Paklitakselin oluşturduğu nörotoksisite sonucu hücre kültür sıvısında yapılan 530 nm de spektrometrik olarak okunan total oksidan kapasite testi değerleri.

Grup	n (kuyucuk sayısı)	Ortalama $\pm$ SD	P
Kontrol	11	1,44 $\pm$ 0,51	
10 ⁻⁷ Paklitaksel	11	1,68 $\pm$ 0,48*	<0,05
10 ⁻⁸ Paklitaksel	10	1,71 $\pm$ 0,62*	<0,05
10 ⁻⁴ Salisilik asit +10 ⁻⁷ Paklitaksel	10	1,54 $\pm$ 0,47*	<0,05
10 ⁻⁵ Salisilik asit +10 ⁻⁷ Paklitaksel	10	1,50 $\pm$ 0,53	>0,05
10 ⁻⁴ Salisilik asit +10 ⁻⁸ Paklitaksel	10	1,43 $\pm$ 0,39	>0,05
10 ⁻⁵ salisilik asit +10 ⁻⁸ Paklitaksel	7	1,43 $\pm$ 0,44	>0,05

* =p<0,05 (SA'in paklitaksel toksisitesini anlamlı şekilde döndürebilmesi)

Tablo 5'e göre yeni doğan sıçan nöron hücre kültürlerinde total antioksidan kapasite ölçüm değerlerine göre 1,44 $\pm$ 0,51 olarak elde edilen kontrol gruplarına total oksidan kapasite ölçüm değerlerini 10⁻⁷ M ve 10⁻⁸ M paklitaksel ile muamele sonrası sırasıyla 1,68 $\pm$ 0,48* - 1,71 $\pm$ 0,62* olarak anlamlı şekilde değiştirmiştir. Kontrol grubuna göre 10⁻⁷ M ve 10⁻⁸ M paklitaksel ile salisilik asit verilen gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel fark görülememiştir.

Tablo 6: Sisplatinin oluşturduğu nörotoksisite sonucu hücre sayısı ile orantılı absorban değerleri (570 nm de okunan mtt analizi sonucu)

Grup	n (kuyucuk sayısı)	Ortalama $\pm$ SD	P
Kontrol	6	84,83 $\pm$ 3,43	
50 μ M Sisplatin	6	70,50 $\pm$ 2,07 [^]	<0,05
100 μ M Sisplatin	6	63,83 $\pm$ 8,51 [^]	<0,05
50 μ M Sisp+10 ⁻⁵ SA	6	78,5 $\pm$ 6,37*	<0,05
100 μ M Sisp +10 ⁻⁵ SA	6	69,66 $\pm$ 2,87*	<0,05
50 μ M Sisp +10 ⁻⁴ SA	6	81,16 $\pm$ 7,16*	<0,05
100 μ M Sisp+10 ⁻⁴ SA	6	70,0 $\pm$ 6,03*	<0,05

[^] = p<0,05 (Sisplatinin kontrole göre farklılığı)

* =p<0,05 (SA'in sisplatin toksisitesini anlamlı şekilde döndürebilmesi)

Tablo 6'ya göre yenidoğan sıçan beyin korteks hücre kültürlerinde antikanser ajan sisplatin, toksik dozları olan 50-100 μ M dozlarında denenmiş, antioksidan olarak salisilik asit (SA) bu toksisiteyi önleme amacıyla 10⁻⁴ M-10⁻⁵ M konsantrasyonlarında kullanılmıştır.

Tablo 6'ya göre yeni doğan sıçan nöron hücre kültürlerinde $84,83 \pm 3,43$ olarak elde edilen kontrol gruplarına göre 50, 100 μM sisplatinin hücre absorbans değerler sırasıyla $70,50 \pm 2,07$ - $63,83 \pm 8,51$ olarak anlamlı toksik bulunmuştur. Kontrol grubuna göre 50, 100 μM sisplatin ile salisilik asit 10^{-4} M birlikte verilen grupla 50, 100 μM sisplatin tek başına verilen gruplardaki hücre oranlarıyla karşılaştırınca sırasıyla $81,16 \pm 7,16$ - $70,0 \pm 6,03$ değerleri ile anlamlı koruyucu etki gözlenmiştir. Kontrol grubuna göre 50, 100 μM sisplatin ile salisilik asit 10^{-5} M birlikte verilen grupla 50, 100 μM sisplatin tek başına verilen gruplardaki hücre oranlarıyla karşılaştırınca sırasıyla $78,5 \pm 6,37$ - $69,66 \pm 2,87$ değerleri ile anlamlı koruyucu etki gözlenmiştir.

Tablo 7: Sisplatinin oluşturduğu nörotoksisite sonucu hücre kültür sıvısında yapılan 660 nm de spektrofotometrik olarak okunan total antioksidan kapasite testi değerleri.

Grup	n (kuyucuk sayısı)	Ortalama $\pm$ SD	P
Kontrol	6	1,23 $\pm$ 0,32	
50 μ M Sisplatin	6	1,11 $\pm$ 0,17 [^]	<0,05
100 μ M Sisplatin	6	1,06 $\pm$ 0,23 [^]	<0,05
50 μ M Sisp+10 ⁻⁵ SA	6	1,21 $\pm$ 0,19*	<0,05
100 μ M Sisp +10 ⁻⁵ SA	6	1,13 $\pm$ 0,26*	<0,05
50 μ M Sisp +10 ⁻⁴ SA	6	1,24 $\pm$ 0,31*	<0,05
100 μ M Sisp+10 ⁻⁴ SA	6	1,14 $\pm$ 0,29*	<0,05

[^] = p<0,05 (Sisplatinin kontrole göre farklılığı)

* =p<0,05 (SA'ın sisplatin toksisitesini anlamlı şekilde döndürebilmesi)

Tablo 7'ye göre yeni doğan sıçan nöron hücre kültürlerinde total antioksidan kapasite ölçüm değerlerine göre 1,23 $\pm$ 0,32 olarak elde edilen kontrol gruplarına total antioksidan kapasite ölçüm değerlerini 100 μ M ve 50 μ M sisplatin muamele sonrası sırasıyla 1,11 $\pm$ 0,17 - 1,06 $\pm$ 0,23 olarak anlamlı şekilde değiştirmiştir. Kontrol grubuna göre 100 μ M ve 50 μ M sisplatin ile salisilik asit verilen gruplardan 50, 100 μ M S +10⁻⁵ SA ve 50, 100 μ M Sisp+10⁻⁴ SA grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür.

Tablo 8: Sisplatinin oluşturduğu nörotoksisite sonucu hücre kültür sıvısında yapılan 530 nm de spektrometrik olarak okunan total oksidan kapasite testi değerleri.

Grup	n (kuyucuk sayısı)	Ortalama $\pm$ SD	P
Kontrol	6	1,44 $\pm$ 0,51	
50 μ M Sisplatin	6	1,66 $\pm$ 0,54 [^]	<0,05
100 μ M Sisplatin	6	1,78 $\pm$ 0,47 [^]	<0,05
50 μ M Sisp+10 ⁻⁵ SA	6	1,47 $\pm$ 0,38*	<0,05
100 μ M Sisp +10 ⁻⁵ SA	6	1,56 $\pm$ 0,61*	<0,05
50 μ M Sisp +10 ⁻⁴ SA	6	1,46 $\pm$ 0,52*	<0,05
100 μ M Sisp+10 ⁻⁴ SA	6	1,70 $\pm$ 0,58*	<0,05

[^] = p<0,05 (Sisplatinin kontrole göre farklılığı)

* =p<0,05 (SA'in sisplatin toksisitesini anlamlı şekilde döndürebilmesi)

Tablo 8'e göre yeni doğan sıçan nöron hücre kültürlerinde total antioksidan kapasite ölçüm değerlerine göre 1,44 $\pm$ 0,51 olarak elde edilen kontrol gruplarına total oksidan kapasite ölçüm değerlerini 100 μ M ve 50 μ M sisplatin ile muamele sonrası sırasıyla 1,66 $\pm$ 0,54 - 1,78 $\pm$ 0,47 istatistiksel olarak anlamlı şekilde değiştirmiştir. Kontrol grubuna göre 100 μ M ve 50 μ M sisplatin ile salisilik asit verilen gruplardan 50, 100 μ M Sisp +10⁻⁵ SA ve 50, 100 μ M Sisp+10⁻⁴ SA grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, günümüzde over, meme ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri tümörlerini tedavi etmek için kullanılan, *taxus brevifolia* adlı ağacın kabuğundan izole edilen doğal bir alkaloid olan paklitaksel ile platin kombinasyon kompleksi grubu antikanser ilaçların ilk üyesi olan ve etki mekanizmaları alkilleyici ajanlara benzeyen sisplatin kullanılmıştır. Sisplatin radyoterapi ve diğer kemoterapötik ilaçlarla sinerjistik sitotoksositeye sahiptir^{1,38}. Mitoz zehirleri de denilen paklitakselin primer etkileri mitozun metafaz dönemindeki mitoz içciklerinin oluşmasının önlenmesidir. Mikrotübüllerin yapıtaşı olan tübülün moleküllerine bağlanarak onları çöktürürler ve mikrotübülleri oluşturmak üzere bir araya gelmelerini bozarlar. Sonuçta hücre bölünmesinin metafazda durmasına ve hücrenin ölümüne neden olurlar. Bu nedenle metafaz dönemine özgü ilaçlardır¹⁹. Yapılan bu çalışmada paklitakselin en önemli yan etkilerinden olan nörotoksosite üzerinde durulmuştur. İn vivo olarak sıçanlarda paklitaksel ve sisplatinle oluşturulan deneysel ağırlı nöropati çalışmalarında siyatik sinir miyeline aksonlarında ve C-fiber mitokondrilerinde ultrastruktürel değişiklikler görülmüş ve aynı değişikliklerin in vitro nöron kültürlerinde antikanser ilaç uygulaması sonrası görüldüğü bildirilmiştir⁶⁴.

Taksanlar ve vinka alkaloidlerin nörotoksitesinin hem canlı mikrotübüllerdeki hem de nöronal hücrelerde bulunan mikrotübüllerdeki bozukluklarla arasında ilişki bulunmuştur⁶³. Paklitaksel nörotoksitesini azaltmak veya engellemek için yapılan çeşitli çalışmalarda kesin bir çözüm bulunamamıştır. Bu çalışmalarda doğal bir bileşik olan acetyl-L carnitine (ALC) ve oksidatif stresi azaltan, glutasyon peroksidaz aktivitesini artıran, antioksidan etkiler gösteren, hücre enerji metabolizmasında önemli olan alfa-lipoik asitin paklitakselin oluşturduğu nörotoksositeye karşı koruyucu etkisi

olduğu görülmüştür. Paklitaksel nörotoksisitesinin ciddiyeti de ALC kullanımıyla azalmıştır. Sisplatin toksisitesinde de bir antioksidan olan ALC'nin yararlı etkileri gösterilmiştir⁶³. Fakat bu çalışmalarda oksidasyon üzerindeki ve serbest radikal seviyelerindeki değişimler incelenmemiş sadece etkinin nöron büyüme faktörü artışı sayesinde geliştiği belirtilmiştir^{62,65}. Biz ise paklitaksel ve sisplatin toksisitesinin oluşumunun doğrudan oksidan parametre artışı ve antioksidan parametrelerin azalması sonucu geliştiğini bu çalışmayla gösterdik. Ayrıca sisplatin toksisitesi üzerinde antioksidan özellikleri olan salisilik asidin de toksisite önleyici etkisini de göstermiş olduk.

Paklitaksel ve sisplatin uygulaması sonrası 24 saat içinde nöron ve Shwan hücre mitokondri fonksiyonlarında azalma bildirilmiş, antioksidan ALC'nin paklitaksel ve sisplatin tedavisinden 3 saat önce uygulanmasının Shwan hücre mitokondri fonksiyonlarında kontrol grupta göre artışa yol açtığı gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada arka kök gangliyonu nöron kültürlerinde paklitaksel ve sisplatin uygulanımı sonrası vaküler dejenerasyon, şişmiş mitokondriler tesbit edilmiştir. ALC sisplatin ve paklitaksel toksisitelerinde paklitakselin verdiği zararlara karşı daha etkili bulunmuştur. Bizim çalışmamızda ise sisplatin ve paklitaksele karşı uygulanan salisilik asit 10^{-4} M ve 10^{-5} M konsantrasyonlarının sisplatine karşı daha faydalı olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 3 ve Tablo 6). Paklitaksel ve sisplatinin oluşturduğu nörotoksisitelerin farklı mekanizmalarla oluştuğunu iddia eden çalışmalar da bulunmaktadır. Paklitakselin esas olarak aksonal seviyede uzamayı önleyerek dejenerasyona yol açtığı; sisplatinin ise apoptotik hücre ölümüne ve aksonal hasara yol açtığı belirtilmiştir. Bir başka çalışmada nöron büyüme faktörünün paklitaksele bağlı toksisiteyi önleyebildiği fakat sisplatinle indüklenen nöron harabiyetine karşı koruyucu olmadığı görülmüştür⁵². Bu bilgi bizim

elde ettiğimiz sonuçlarda salisilik asitin niye paklitaksele nazaran sisplatine karşı daha etkili olduğunu anlamamız için bir açıklama olabilir.

Diğer yandan paklitakselin toksisitesini azaltmak için yapılan çalışmalarda chemophor kullanmadan çeşitli sulu çözeltiler yapılarak⁶⁶ (Lipozomlar, yağ asitleri, antikör konjüгатları, nanokürecikler, makrokürecikler siklodekstrin kompleksleri ve mukozaya yapışan jeller kullanılmıştır.) yeni formülasyonlar üretilmeye çalışılmıştır fakat nörotoksik etkinin asıl etken madde olan taksol ve sisplatinden kaynaklanması bu çözelti değişikliklerinin özellikle nörotoksosite yan etkisini ortadan kaldırmada etkisiz bulunmuştur. Paklitaksel ile indüklenen distal akson dejenerasyonun aksonlar üzerinde direkt toksisite ile mi yoksa nöronal hücre üzerindeki toksisite sonucumu olduğu tam olarak açık değildir.

Vitamin D, vitamin E ve salisilik asit gibi antioksidanların serbest oksijen radikallerini baskılayabildiği yapılan çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir⁶⁷. Yaptığımız korteks nöron kültürü çalışmalarında paklitakselin nörotoksosite oluşturduğu dozlar kullanılmıştır. Oluşturulan nörotoksositeye karşı koruyucu etkisi olduğu düşünülen salisilik asitin çeşitli dozları uygulandı. Salisilik asit saliks alba ağacından elde edilen antioksidan özelliği olan organik bir asittir. Bunun yanında birçok sebze, kabuklu yemişler, tohumlar, çeşitli bitkiler ve meyvede özellikle çilek kiraz gibi meyvelerde bol miktarda bulunur. Salisilik asitin kolon ve meme kanseri türlerinde koruyucu olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir^{81,82}. Bu bilgi bizim için önemlidir. Çünkü antikanser ilaçlarla salisilik asidin birlikte kullanımını nörotoksik etkinin ortadan kaldırılması için önereceksek, salisilik asidin kanser hücrelerine koruyucu etki göstermemesi gerekmektedir. Aksi halde antikanser ilacın etkisinin azalması gündeme gelebilecektir. Yani literatür bilgileri salisilik asitinde antikanser etkili olduğunu göstermektedir.

Nörodejeneratif bozukluklarda da salisilik asitin koruyucu etkisi olduğu görülmüştür⁸³. Dejeneratif beyin hastalıkları ile oksidatif hasar arasında ilişkinin tespit edilmiş olması, son yıllarda araştırmacıların, nöronal patolojide serbest radikallerin zararlı etkilerini antioksidan ilaçların koruyucu ve terapötik etkileri vasıtasıyla gidermeye karşı ilgilerini giderek arttırmıştır⁸⁴. Salisilik asitler prostaglandin sentezini azaltırlar siklooksijenaz izoenzimlerini nonselektif olarak inhibe ederek farmakolojik etkilerini gösterirler. Enzimleri geri dönüşümsüz olarak inhibe ettiği için etkileri yeni enzim sentezlenene kadar devam etmektedir. Yeni enzim sentezleyemeyen hücrelerde ise etki, hücrelerin tümüyle yenilenmesine kadar sürmektedir. Salisilik asitin antioksidan özelliğinin dışında bu özellikleri de paklitakselin neden olduğu nörotoksisiteye karşı koruyucu etkisi olabileceğini düşündürmüştür.

Antikanser ilaçların oluşturduğu ağrı yan etkisinde ve nörotoksik etkisinde

glutamatın sinaptik aralıktan uzaklaştırılma hızının etkili rol aldığı gösterilmiştir^{86,87}. Glutamatın oluşturduğu nörotoksisite için iki ayrı yolak bildirilmiştir. Bunlar eksitotoksik yolak ve oksidatif yolaktır. Oksidatif yolak, glutamat-sistin antiport sistemini bozar, glutatyon seviyelerini azaltır ve nörotoksik olan aşırı reaktif oksijen oluşumuna yol açar.

Post sinaptik NMDA reseptörlerinin aktivasyonu, intraselüler kalsiyumun birikimine neden olabilir ve nitrik oksit üretimini içeren çeşitli sekonder ileti sistemlerini stimüle eden, proteazları aktive eden ve mitokondri zararı ile çeşitli nöronal kayıplara neden olabilir. OH-tutucu bir ajan olan salisilik asit, ratlarda serebellar granüler hücre kültüründe kainik asit ve glutamat ile indüklenen nörotoksisite üzerinde doza bağımlı olarak nöron koruyucu etki göstermiştir. Aynı çalışmada salisilik asitin en

etkili dozu 10^{-5} M dir. Bizim çalışmamızda ise sisplatinle indüklenen nörotoksisitede en etkili doz 10^{-4} M salisilik asit olarak bulunmuştur. Başka bir çalışmada serbest radikal üretiminde non-NMDA reseptörlerin rolü araştırmak için kainik asit (KA) toksisitesinde salisilik asiti test edilmiştir. Yüksek dozlara rağmen (glutamat konsantrasyonu 1000 kat) glutamat granüler serebellar nöronların %38.58 ini öldürürken, KA sadece %21.4 ünü öldürebilmiştir. Bu sonuç, glutamat reseptörlerinin tüm tipleri glutamat ile indüklenen toksisitesinde varken KA toksisitesinde glutamat reseptörlerinin tek alttipin sorumlu olduğu gösterilmiştir. Salisilik asit 10^{-5} ve 10^{-4} M konsantrasyonlarda, KA toksisitesinde yüksek derecede etkili bulunmuştur. Bu sonuçlar gösteriyor ki, NMDA gibi KA reseptör stimulanları serbest radikal üretimi üzerinden nöronal hücre ölümünü indükler ve salisilik asit, faydalı etkisini KA reseptörü üzerinden de göstermiş olabilir. Bir nitrik oksit sentez inhibitörü olan 7- nitroindazol, sadece AMPA değil KA'inde NMDA 'nın intrastriatal enjeksiyonu ile üretilen lezyon azalmaları rapor edilmiştir. Nimodipin, kainatın indüklediği nörotoksisitede de doza bağımlı nöroproteksiyon yapmaktadır. Salisilik asitin, OH^- radikali yakalayıcı olarak kainik asit toksisitesinde çok etkili bulunması NMDA gibi KA'nın da serbest radikal oluşturarak hücre ölümü yaptığını göstermektedir.

1998'de Araquae ve arkadaşları astrosit stimülasyonunun astrosit ve nöron kültürü içeren karma kültürlerdeki presinaptik metabotropik glutamat reseptörlerinin seçici aktivasyonu ile eksitator ve inhibitör iletimi azalttığını göstermiştir. Bu çalışma neticesinde glutamat konsantrasyonunun bir eşik değerini geçtiğinde astrositik glutamat taşıyıcılarının aktiflendiğini ve fizyolojik nöron iletimi için temel olan hücre dışı glutamat konsantrasyonunun azaldığı düşünülmektedir. Astrosit fonksiyonlarındaki hasar beyin yaralanma fizyopatolojisinde önemli bir rol oynar. Takasaki ve arkadaşları

beyindeki yaralanma bölgesinde glutamat seviyelerinin 10^{-4} M seviyelerine çıktığını görmüştür⁹⁰. Fakat yaralanan bölgenin 3 mm uzağında glutamat değerleri, 10^{-5} M'in altında bulunmuştur. Ve glutamat düzeylerindeki normale dönüş 200 dakika alırken, 3 mm uzaktaki bölgede glutamat seviyeleri 25 dakikada geriye dönmüştür. Hasar bölgede glutamatın uzaklaştırılmasının uzun sürmesi ve seviyelerin daha yüksek seyretmesi nörotoksisite oranını artırmıştır.

Kontrol gruplarında elde edilen 84,83 'lük hücre ortalamaları 50-100 μ M sisplatin dozlarında doza bağımlı olarak düşmüş, en toksik doz uygulanan yüksek sisplatin dozunda bulunmuştur (Tablo 6). Her iki dozda istatistiksel olarak anlamlı şekilde nörotoksisite oluşturmuştur. Paklitaksel toksisitesinin de doza bağımlı olarak yükseldiği gözlemlenmiştir. Markman M'nin 2003 yılında yapmış olduğu çalışmada paklitakselin oluşturduğu nöropatinin paklitakselin pik konsantrasyonu ve tedavinin toplam süresiyle ilişkili olduğunu göstermiş olması bizim çalışmamızdaki verileri destekler mahiyettedir.

Antioksidan ajan olarak 10^{-4} M ve 10^{-5} M salisilik asit 2000 yılında Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalında yapılan bir çalışmada ortaya konan koruyucu dozlardır ve 50-100 μ M sisplatinin oluşturduğu nörotoksisitenin geri döndürülebilmesi için denenmiştir. 10^{-4} M salisilik asit her iki sisplatin doz toksisitesini geri çevirebilmiş, 10^{-5} M salisilik asit ise sadece 50 μ M sisplatinin oluşturduğu nörotoksisiteyi geri çevirebilmiştir. Kontrol grubu açısından kendisine en yakın grup 50 μ M sisplatinin oluşturduğu nörotoksisiteye 10^{-4} M salisilik asit uygulaması sonucu ulaşılabilmiştir.

Paklitaksel, toksisite oluşturan dozlarında total antioksidan kapasite anlamlı olarak düşmüştür (Tablo 4). Paklitaksel toksisitesi salisilik asit ile önlenemediği için total oksidan ve antioksidan kapasitede de değişiklik görülmemiştir. Bu durum oksidan ve antioksidan parametrelerle hücre canlılık oranlarının ilişkili olduğunu göstermektedir. Tablo 5’de ise toksik dozlarda oksidan kapasitenin arttığı görülmüştür.

Tablo 6’daki çalışmamızda antioksidan salisilik asit, sisplatin nörotoksitesini özellikle 10^{-4} M konsantrasyonda azaltmıştır. Paklitaksel kemoterapisini sınırlayan en önemli faktörlerden olan toksik periferik nöropatinin, glutamat ve glutamin amino asit ile azalacağına dair çalışmalar yapılmış fakat uzun dönem 500 mg 3 doz/gün glutamat ilavesi yapılmış nörotoksik semptomlarında hiçbir iyileşme elde edilememiştir. Tablo 7’deki çalışmamızda sisplatin nörotoksitesinde total antioksidan kapasite testi yapılmış ve 50, 100 μ M sisplatin nörotoksitesine karşı salisilik asitin her iki dozunda da anlamlı değişiklik görülmüştür. Tablo 8’deki çalışmamızda sisplatin nörotoksitesinde total oksidan durum testi yapılmış ve 50, 100 μ M sisplatin nörotoksitesine karşı salisilik asitin her iki dozununda anlamlı değişiklik görülmüştür.

Sonuçta serbest radikallerin oluşumunda glutamatın katkısı olsun veya olmasın antioksidan olan salisilik asit in, antikanser ilaçların oluşturduğu nörotoksiteyi önleyebileceği bu çalışmada görülmektedir.

Sonuç olarak deney sonuçları incelendiğinde;

- Paklitakselin ve sisplatinin her iki dozunda nörotoksik etki göstermiştir.
- Paklitaksel ve sisplatin nöron hücrelerinde antioksidan dengesi bozmuştur.

- Salisilik asit paklitaksel nörotoksisitesinde total antioksidan kapasiteyi eski düzeyine getirememiş fakat yaklaştırmıştır.
- Salisilik asit 50 μ M ve 100 μ M sisplatin ile oluşturulan nörotoksisitede total antioksidan kapasiteyi eski düzeyine yani kontrol grubuna çok yaklaştırmıştır.
- Salisilik asit paklitaksel nörotoksisitesinde serbest oksijen radikallerinin miktarını 10^{-4} M konsantrasyonda korumuş ancak 10^{-5} M konsantrasyonda doz düşük kalmış ve yeteri kadar koruyamamıştır.
- Salisilik asit 50 μ M ve 100 μ M sisplatin ile oluşan nörotoksisitede serbest oksijen radikallerinin miktarını eski düzeyine yani kontrol grubuna çok yaklaştırmıştır.
- Paklitaksel nörotoksisitesinde salisilik asitin iyileştirici düzeyde etkisi olmasa da nörotoksisiteye karşı pozitif yönde etkisi olduğu söylenebilir.
- Sisplatin toksisitesinde salisilik asitin iyileştirici etkisi olduğu görülmüştür.

Destekleyen kurumlar:

Bu çalışma Tübitak 107S 067 projesi tarafından desteklenmiştir.

6. KAYNAKLAR

1. Rodriguez-Antona C. Pharmacogenomics of paclitaxel. Pharmacogenomics 2010; 11(5); 661-663.
2. Van-Boxtel CJ. 'Antineoplastik ajanlar', Çevrimiçi
<http://www.e-kutuphane.teb.org.tr>. 7 Aralık 2010.
3. Markman M. Managing taxane toxicities. Support Care Cancer 2003; 11; 144-147.
4. Pace A, Bove L, Aloe A, et al. Paclitaxel neurotoxicity: clinical and neurophysiological study of 23 patient. Ital J Neurol Sci 1997; 18; 73-79.
5. Turan T, Bozkurt Ü, Özgül N, et al. Jinekolojik onkolojide first-line kemoterapide kullanılan paklitaksel/karboplatin kombinasyonu ile paklitaksel/sisplatin kombinasyonunun toksisite profillerinin karşılaştırılması. Türk Jinekolojik Onkolojik Der 2006; cilt 9; sayı 1; sayfa 6-13.
6. <http://en.wikipedia.org/wiki/Neurotoxicity> 7 Aralık 2010. Çevrimiçi.
7. Argyriou A, Kolzenburg M, Polychronopoulos P, et al. Peripheral nerve damage associated with administration of taxanes in patients with cancer. Crit Rev Oncol/Hematol 2008; 66; 218-228.
8. Tüzmen G. 'Antioksidan', Çevrimiçi
<http://www.genetikbilimi.com/genbilim/antioksidan.htm> 10 Aralık 2010.

9. Tereli D. 'Antioksidan çılgınlığı: Antioksidan nedir, Antioksidan çeşitleri nelerdir?', endokrinoloji ve metabolizma hastalıkları, İzmir, Çevrimiçi. <http://www.tavsiyeedivorum.com/makale/802.htm> 08 Aralık 2010.
10. Köse T. 'Antioksidanlar' Çevrimiçi <http://www.doktorsitesi.com/yazi/1205/Antioksidanlar?a id=16>. 02 Aralık 2010.
11. Anatomical Therapeutic Chemical, 'Antineoplastik ve immünomodülatör ajanlar', Çevrimiçi <http://www.ilacabak.com/etkengoster.php?Id=L01CDO1> 20 Kasım 2010.
12. <http://pl.wikipedia.org/wiki/Paklitaksel> 19 Kasım 2010 Çevrimiçi.
13. Costanzo F, Gasperoni S, Rotella V, et al. Targeted delivery of albumin bound paclitaxel in the treatment of advanced breast cancer. Onco Targets Ther 2009; 2; 179-188.
14. Mandel NM. Over kanseri tedavisinde taxatere ders notu, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Medikal Onkoloji Anabilim Dalı.
15. Karlıağa B, Talınlı N. 3'tiyokarbomat paklitaksel türevlerinin sentezi ve biyolojik aktivite çalışmaları. İtü Der/c Fen Bil Kasım 2004; cilt 2; sayı 1; 25-30.
16. Demirel-Kars M, Darcansoy Ö, Arpacı F, et al. Meme kanseri MCF-7 hücre hattında paklitaksel ve vinkristine karşı gelişmiş çoklu ilaç direnci mekanizmalarının mikrodizin analizi ile belirlenmesi. Türk Onkol Der 2009; 24(4); 153-158.

17. Levent E. Akciğer kanserinde uygulanan kemoterapotiklerin farmakodinamisi ders notu. Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı.
18. Aydın S. 'Antineoplastik ilaçların farmakolojisi ders notu' Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Eskişehir.
19. Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji 10.baskı, Ankara, Hacettepetaş 2002; 380-415.
20. Tuna MC, Malikzay A, Ouyang X, et al. Antitumor activity of IMC -038525, a novel oral tubulin polymerization inhibitor. Transl Oncol 2010; vol. 3; no 5; 318-325.
21. Turay ÜY, Biber Ç, Ergün P, et al. İleri evre küçük hücreli dışı akciğer kanserinde paklitaksel sisplatin kombine terapisi. Solunum Hastalıkları 2002; 13; 106-112.
22. Green H, Söderkvist P, Rosenberg P, et al. Pharmacogenetic studies of paclitaxel in the treatment of ovarian cancer. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2008; 104; 130-137.
23. Kannarkat G, Lasher EE, Schiff D, Kemoterapi ajanlarının nörolojik komplikasyonları. Curr Opin Neurol 2008; cilt 2; sayı 1; 719-725.
24. Uzunoğlu S, Karagül H, Tanrıverdi Ö, et al. İleri evre küçük hücreli dışı akciğer kanseri tedavisi kemoterapinin son yıllarda gelişim ve etkinliğinin değerlendirilmesine kısa bir bakış. Türk Onkol Der 2010; 25(2); 77-85.
25. Sehouli J, Stengel D, Mustea A, et al. Weekly paclitaxel and carboplatin (PC-W) for patients with primary advanced ovarian cancer: results of a multicenter phase-II study of the NOGGO. Cancer Chemother Pharmacol 2008; 61; 243-250.

26. Öztürk N, Erbaycu AE, Gülpek M, et al. İleri ve lokal ileri evreli küçük hücreli dışı akciğer kanserinde gempitabin ve karboplatin kombinasyonu. Türk Onkol Der 2008; 23(2); 72-80.
27. Cella D, Huang HQ, Monk JB, et al. Health-related quality of life outcomes associated with four cisplatin-based doublet chemotherapy regimens for stage IVB recurrent or persistent cervical cancer: A gynecologic oncology group study. Gynecologic Oncol 2010 YGYNO-973724; no. Of pages: 7; 4C.
28. Hansen C, Verma RP. Overcoming tumor drug resistance with C2-modified 10-deacetyl-7 propionyl cephalomannines: A QSAR study. Mol Pharm 2009; vol 6; no 3; 849-860.
29. Muler V, Thomssen C, Schmidt M, et al. Final results of a phase I-II pilot study of capecitabine with or without vinorelbine after sequential dose-dense epirubicin and paclitaxel in high-risk early breast cancer. BMC Cancer 2010; 10;430.
30. Flatters SJL, Bennett GJ. Studies peripheral sensory nerves in paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy: Evidence for mitochondrial dysfunction. Pain 2006; 122; 245-257.
31. Flatters SJL, Bennett GJ. Ethosuximide reverses paclitaxel and vincristin-induced painful peripheral neuropathy. Pain 2004; 109; 150-161.
32. Schmidt S, Schneider L, Essmann F, et al. The centromal protein TACC3 controls paclitaxel sensitivity by modulating a premature senescence program. Oncogene 2010; 1-9.

33. Loven D, Levavi H, Sabach G, et al. Long-term glutamate supplementation failed to protect against peripheral neurotoxicity of paclitaxel. *Eur J Cancer Care* 2009; 18; 78-83.
34. Yağmurlu B, Akyürek S, Fitoz S, et al. Malign bozuklukların neoplastik olmayan kraniyal komplikasyonlarının manyetik rezonans görüntülenmesi. *Diagn Interv Radiol* 2008; 14; 61-68.
35. Duska LR, Berkowitz R, Matulonis U, et al. A pilot trial of TAC (paclitaxel, doxorubicin, and carboplatin) chemotherapy with filgastrim (r- metHuGF) support followed by radiotherapy in patients with 'high-risk' endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2005; 96; 198-203.
36. Sufliarsky J, Chovanec J, Svetlovska D, et al. Gemcitabine and carboplatin treatment in patients with relapsing ovarian cancer. *Neoplasma* 2009; 4; 291.
37. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Sisplatin> 26 Kasım 2010. Çevrimiçi.
38. Howland RD, Mycek MJ. Lippincott Farmakoloji 3.baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 2009,479-481.
39. Rea WJ. 'What is neurotoxicity?', 25 Kasım 2010. Çevrimiçi

<http://www.aehf.com/articles/Defin-neurotox.html>
40. Yang IH, Siddique R, Hosmane S, et al. Compartmentalized microfluidic culture platform to study mechanism of paclitaxel-induced axonal degeneration. *Exp Neurol* 2009; 218; 124 - 128.

41. Batmazoğlu M, Evrensel T, Manavoğlu O, et al. Kemoterapiye bağlı gelişen nöropatiye karşı venlafaksinin koruyucu etkinliğinin araştırılması. Türkiye Klin J Med Sci 2008; 28; 425 - 36.
42. Argyriou AA, Chroni E, Koutras A, et al. Preventing paclitaxel-induced peripheral neuropathy: A phase II trial of vitamin E supplementation. J Pain Symptom Manage 2006; 32(3), 237.
43. Oskay-Özçelik G, Chekerov R, Sommer H, et al. Sequential chemotherapy with carboplatin followed by weekly paclitaxel in advanced ovarian cancer: Results of multicenter phase II study of the northeastern German society of gynecological oncology. Gynecol Oncol 2010; 116; 317- 322.
44. Hurt ID, Richardson DL, Seamon LG, et al. Sustained progression free survival with weekly paclitaxel and bevacizumab in recurrent ovarian cancer. Gynecol Oncol 2009; 115; 396- 400.
45. Argyriou AA. Tracing the incidence of paclitaxel induced peripheral neuropathy. Eur J Cancer Care 2009; 18; 522- 523.
46. Flatters SJ, Xiano W, Bennett GJ. Acetyl-L-carnitine prevents and reduces paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy. Neurosci Lett 2006; 397; 219- 223.
47. Pascual D, Goicoechea C, Suardiaz M, et al. A cannabinoid agonist reduces neuropathic nociception induced by paclitaxel in rats. Pain 2005; 118: 23-34.
48. <http://www.itusozluk.com/goster.php/allodini>, 25 Kasım 2010, Çevrimiçi.

49. www.saglikdanis.com/sozlukgoster.asp?id=6726 25 Kasım 2010, Çevrimiçi.
50. Wu J, Sun J, Xue Y. Involvement of JNK and P53 activation in G2/M cell cycle arrest and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in neuron cells. *Toxicol Lett* 2010.
51. Tiryaki T, Ağır H, Ünal Ç, et al. Preoperatif kemoterapinin (paklitaksel) periferik sinir rejenerasyonuna etkisi. *Türk Plas Rekons Est Cerrahi Der cilt* 15, sayı 1.
52. Hayakawa K, Itoh T, Niwa H, et al. Nerve growth factor prevention of aged-rat sympathetic neuron injury by cisplatin, vincristine and taxol-in vitro explant study. *Neurosci Lett* 1999; 274; 103- 106.
53. Ahmed HH, Elmegeed GA, El-Sayed EM, et al. Potent neuroprotective role of novel melatonin derivatives for management of central neuropathy induced by acrylamide in rats. *Eur J Med Chem* 2010; 45; 5452- 5459.
54. Bakar M, Talu A. 'Nörotoksisite', Gündüz kemoterapi ünitesi. Çevrimiçi www.anh.gov.tr/index.php?option=com_docman&task.
55. Hacımuftuoğlu A. Nörotoksisite ve glutamat ilişkisi, 19. Ulusal farmakoloji kongresi, Trabzon, 24-27 Ekim 2007.
56. Yıldırım YK. Nörotoksisite. Ege Üniversitesi Hemşirelik Yüksek Okulu, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir, Çevrimiçi.
57. Leskela S, Jara C, Leandro-Garcia LJ, et al. Polymorphism in cytochromes P450 2C8 and 3A5 are associated with paclitaxel neurotoxicity. *Pharmacogenomics J* 2010; 1-9.

58. Carozzi VA, Canta A, Oggioni N, et al. Neurophysiological and neuropathological characterization of new murine models of chemotherapy-induced chronic peripheral neuropathies. *Exp Neurol* 2010; YEXNR-10640; No. Of Pages: 9.
59. Jamieson S, Subramaniam J, Liu JJ, et al. Oxaliplatin-induced loss of phosphorylated heavy neurofilament subunit neuronal immunoreactivity in rat DRG tissue. *Mol Pain* 2009; 5; 66.
60. Cella D, Huang H, Homesley HD, et al. Patient-reported peripheral neuropathy of doxorubicin and cisplatin with and without paclitaxel in the treatment of advanced endometrial cancer: Results from GOG 184. *Gynecol Oncol* 2010; YGNNO-973726; No, of Pages 5.
61. Rovini A, Carre M, Bordet T, et al. Olesoxime prevent microtubule-targeting drug neurotoxicity: Selective preservation of EB comets in differentiated neuronal cells. *Biochem Pharmacol* 2010; 80; 884-894.
62. Hill A, Bergin P, Hanning F, et al. Detecting acute neurotoxicity during platinum chemotherapy by neurophysiological assessment of motor nerve hyperexcitability. *BMC Cancer* 2010; 10; 451.
63. Pisano C, Pratesi G, Laccabue D, et al. Paclitaxel and cisplatin induced neurotoxicity: A protective role of acetyl-L-carnite. *Clin Cancer Res* 2003; vol 9; 5756-5767.
64. Melli G, Taiana M, Camozzi F, et al. Alpha-lipoic acid prevents mitochondrial damage and neurotoxicity in experimental chemotherapy neuropathy. *Exp Neurol* 2008; 214; 276-284.

65. Carozzi V, Chiorazzi A, Canta A, et al. Effect of the chronic combined administration of cisplatin and paclitaxel in a rat model of peripheral neurotoxicity. *Eur J cancer* 2009; 45; 656- 665.
66. Singh S, Dash AK. Paclitaxel in cancer treatment: perspectives and prospects of its delivery challenges. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2009; 26(4): 333-72.
67. <http://en.wikipedia.org/wiki/Antioxidant>, 20 Kasım 2010, Çevrimiçi.
68. Xu H, Jiang H, Wang J, et al. Rgl protects iron-induced neurotoxicity through antioxidant and iron regulatory proteins in 6-OHDA-treated MES23.5 cells. *J Cell Biochem* 2010.
69. Baskol M, Basjkol G, Kocer D, et al. Mide kanserli hastalarda oksidan ve antioksidan parametreler ve birbirleriyle ilişkileri. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi* 2007; 5(3); 83- 89.
70. Gepdiremen A, Hacımüftüoğlu A, Büyükokuroğlu ME, et, al. Nitric oxide donor sodium nitroprusside induces neurotoxicity in cerebellar granular cell culture in rats by an independent mechanism from L- type or dantolene-sensitive calcium channels. *Biol Pharm Bull* 2002; 25(10); 1295-1297.
71. Türkez H, Tatar A, Hacımüftüoğlu A, et al. Boric acid as a protector against paclitaxel genotoxicity. *Acta ABP Biochim Pol* 2010; vol 57; no 1; 95- 97.
72. <http://altered-states.net/barrv/update227/antioxidant.jpg&imgrefurl>, 24 Kasım 2010, Çevrimiçi.
73. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Beyin>, 28 Kasım 2010, Çevrimiçi.

74. Yıldırım E. 'Beyin' Çevrimiçi

<http://www.canlibilimi.com/bevin-nedir.asp> 28 Kasım 2010.

75. Ziyilan Z. Fizyoloji ders notu, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Çevrimiçi,

http://www.istanbul.edu.tr/itf/fizvoloi/Ogretim_Uye_ve_Yardimcileri/Ziya_Ziylan/serebral_korteks.pdf 28 Kasım 2010.

76. Büyükokuroğlu ME, Gepdiremen A, Hacımüftüoğlu A, et al. The effects of aqueous extract of lavandula angustifolia flowers in glutamate-induced neurotoxicity of cerebellar granular cell culture of rat pups. J Ethnopharmacol 2003; 84; 91- 94.

77. Gepdiremen A, Düzenli S, Hacımüftüoğlu A, et al. Pharmacol Res 2001; vol 43; no3;241-244.

78. Gepdiremen A, Büyükokuroğlu ME, Hacımüftüoğlu A, et al. Contribution of the histaminergic receptor subtypes to histamine-induced cerebellar granular neurotoxicity. Polish J Pharmacol 2003; 55; 383- 388.

79. Akar H. "Hipertansiyon tedavisinde kalsiyum kanal blokerlerinin yeri", Türk Hipertansiyon ve Böbrek Hastalıkları derneği Aydın Bölge Toplantısı, Aydın, 2007. Çevrimiçi

http://www.tiirkhipertansiyon.org/egitim_doc/9harun_akar.pdf 3 Aralık 2010.

80. <http://www.food-info.net/tr/qa/qa-wi1.htm> 01 Aralık 2010, Çevrimiçi.

81. Marcus A J. Aspirin as a prophylaxis against colorectal cancer. N Engl J Med 1995;333:656-658.

82. Mück H, Latta G, Loose-Wagenbach I. Questions and answers about antiplatelet therapy with acetylsalicylic acid. Bayer, Leverkusen 1995; 1-38.
83. Gören B, Mimbay Z, Bilici N. Investigation of neuroprotective effects of cyclooxygenase inhibitors in the 6-Hydroxydopamine induced rat parkinson model. Turkish Neurosurgery 2009, Vol: 19, No: 3, 230-236.
84. Erdemliöğlu K, Varlıbaş A. Alzheimer Hastalığında Hormon Replasman Tedavisi ve Diğer Potansiyel Tedavi Yöntemleri ders notu. Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi nöroloji Anabilim Dalı.
85. Güven TN, Aydinatay BS, Kocadereli. Ortodontide ağrı. SU Dis Hek Fak Der 2008;17:234-242.
86. Hacımüftüoğlu A, Saruhan F, Çetin D, et al. Alterations on glutamate transporter activity of cortical and thalamic brain areas in vincristin-evoked neuropathic pain. 7 th Fens Forum of European Neuroscience, Amsterdam, Netherlands July 3-7 2010.
87. Gepdiremen A, Hacımüftüoğlu A, Düzenli S, et al. H. Effects of salicylic acid in glutamate- and kainic acid-induced neurotoxicity in cerebellar granular cell culture of rats. Pharmacol Res 2000 Dec;42(6):547-51.
88. Hacımüftüoğlu A, Saruhan F, Süleyman H, Çetin D. Paclitaxel-evoked pain and its therapy; in vivo voltammetric study. 16. World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, JULY 17-23 2010, Copenhagen, Denmark, Abstract Book Extra Supplement Pages: S3 Suppl. FC 19 Published: JULY 2010.
89. Takasaki C, Okada R, Mitani A, et al. Glutamate transporters regulate lesion-induced plasticity in the developing somatosensory cortex. J Neurosci 2008; 28, 4995-5006.

90. Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, et al. Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 1998; 10(6):2129-42.