



Araştırma Yazısı

Astrosit Hücre Kültürlerinde pH Değişikliğinin Yarattığı Toksikite ve Glutatyonun Koruyucu Etkisi

Ozlem YILMAZ, Dilek TASKIRAN

Ege University School of Medicine, Physiology, Izmir, Türkiye

Özet

Amaç: Ekstraselüler ve intraselüler ortam pH değişikliklerinin nöron ve astrosit hücreleri üzerinde toksik etkileri olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada asidozisin astrosit hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini hücre ölümü ve oksidatif stres parametreleri ile değerlendirerek belirlemeyi amaçladık. Aynı zamanda askorbik asit ve glutatyon antioksidanlarının asidoz sırasındaki toksisiteye karşı koruyucu etkilerini araştırdık.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada 1-2 günlük yeni doğan sıçanların frontal kortekslerinden hazırlanan primer astrosit hücre kültürü kullanıldı. Astrositler pH:5,5 ± 0,1 de, 2 saat süreyle askorbik asit (AA, 1 mM) ve glutatyon (GSH, 1 mM) eklenen ve eklenmeyen ortamlarda inkübe edildi. Asidoz ve antioksidanların etkileri, laktat dehidrogenaz (LDH), superoksit dismutaz (SOD) ve katalaz enzimleri ve nitrit düzeyleri ölçülerek değerlendirildi.

Bulgular: LDH aktivitesi, nitrit düzeyleri ve antioksidan enzim aktiviteleri asidozlu grupta kontrol grubundan anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p < 0.0005$). GSH eklenen grupta astrosit hücre ölümü, nitrit düzeyleri ve antioksidan enzim aktiviteleri azaldı. AA eklenen grupta antioksidan enzim aktiviteleri ve nitrit düzeyleri azaldığı halde, astrosit hücre ölümünde azalma gözlenmedi.

Sonuç: Sonuçlarımıza göre, düşük pH değerleri astrosit hücrelerinin canlılığını ve antioksidan enzim aktivitelerini etkilemektedir. GSH tedavisi astrositleri, toksik etkilerden ve oksidatif stresten koruyabilir. Tüm bunlar, asidoz ve oksidatif stresin birarada, beyin hücre hasarını tetikleyebileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Astrosit, glutatyon, oksidatif stres, asidoz, toksisite

Cytotoxicity in Astrocyte Cultures Due to pH Changes and Protection by Glutathione

Summary

Background: It is well known that extracellular and intracellular pH changes have cytotoxic effects on astrocytes and neurons. In the present study, we aimed to evaluate the cytotoxic effects of acidosis on astrocyte cultures by measuring cell death and oxidative stress parameters. We also investigated the protective effects of ascorbic acid and glutathione as antioxidants against toxicity due to pH changes in the cultures.

Materials and Methods: Primary astrocyte cultures were prepared from 1-2 day old neonatal rats. Astrocytes were incubated in media with or without pH 5,5 ± 0,1 for 2 h and treated with ascorbic acid (AA, 1 mM) and glutathione (GSH, 1 mM). The effects of acidosis and antioxidants were assessed by measuring lactate dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD) and catalase activities and nitrite levels in the cultures.

Results: LDH activity, nitrite levels and antioxidant enzyme activities were found significantly elevated in the acidosis group than the control ($p < 0.0005$). Treatment of the astrocytes with GSH decreased cell death, nitrite levels and antioxidant enzyme activities compare to the acidosis group. Although the treatment of the cultures with AA lowered

antioxidant enzyme activities and nitrite levels, there was no protective effect on astrocyte viability.

Conclusions: Our results demonstrated that decreased of pH levels may effect astrocyte viability and antioxidant enzyme activities. Treatment of the astrocytes with GSH may protect them from cytotoxicity and oxidative stress. Overall, these results support that acidosis and oxidative stress closely interact with each other and may trigger cell damage in brain.

Key words: Astrocyte, glutathione, oxidative stress, acidosis, toxicity

GİRİŞ

Astroglia hücreleri, erişkin santral sinir sisteminde en yoğun bulunan hücre grubu olup uzun yıllar boyunca beyinde nöronları bir arada tutmaya yarayan destek elemanları oldukları düşünülmüştür. Oysa son yıllarda, bu hücrelerin santral sinir sisteminde birçok yeni işlevlerinin olduğu kabul edilmektedir. Yapılan çalışmalarda astrositlerin iyon homeostazisinde önemli rol oynadığı, birçok nöroaktif bileşik sentezlediği ve salgıladığı, nöronlara metabolik ve trofik destek sağladığı ve toksisiteye karşı koruyucu rol oynadığı gösterilmiştir.^(7,26) Nöron ve astrosit hücre canlılığının devam etmesinde ortam pH'sının en önemli etkenlerden biri olduğu bilinmektedir. İskemi sonrasında yaygın astroglial değişiklikler olduğu ve özellikle iskemiye bağlı olarak düşen pH değerlerinin hücre ölümüne yol açtığı gösterilmiştir.^(18,23)

Oksidatif stres, sinir sisteminde serebral iske mi, eksitotoksisite ve nörodejeneratif süreçlerin gelişiminde önemli rol oynar. Hücre içinde reaktif oksijen ürünlerinin üretimi ile bunları ortadan kaldıracak antioksidan sistemlerin arasındaki dengenin bozulması, oksidatif stresin gelişimine neden olmaktadır.⁽²⁶⁾ Oksidatif stresin astrositlerde hücre içi asidozu da uyardığı bildirilmiştir.⁽²⁷⁾ Dolayısıyla asidoz ve oksidatif stres genelde birarada bulunan ve aynı zamanda birbirini uyarıcı durumlar olarak karşımıza çıkmaktadır.

Astrositlerin belirli antioksidanları yüksek konsantrasyonlarda bulundurabildiği ve bu nedenle oksidatif hasara nöronlardan daha

dirençli olduğu bilinmektedir. Çeşitli çalışmalarda astrositlerde glutatyon (GSH) redoks sistemlerinin olduğu ve indirgenmiş glutatyonun nöronlardan daha yoğun bulunduğu öne sürülmüştür.^(2,15) Astrositler, GSH aracılığı ile özellikle nöronlar üzerinde hücre ölümünü engelleyici rol oynamaktadır.⁽⁶⁾ Bunun yanı sıra nörodejeneratif hastalıklarda ve bazı patofizyolojik koşullarda süperoksit dismutaz (SOD) enziminin astrositlerde arttığı gösterilmiştir.⁽⁵⁾ Katalaz enziminin astrositlerdeki etkinliği daha az bilinmekle birlikte in vitro koşullarda sinir hücreleri üzerinde koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir.⁽⁸⁾ Askorbik asit (AA) santral sinir sisteminde yoğun olarak bulunan bir antioksidandır. Astrositlerin AA sentezlemediği, ancak ekstrasellüler ortamdan aldıkları askorbatı çok konsantrasyonda edebildikleri gösterilmiştir.⁽²⁵⁾ Nitrik oksid (NO), sinir sisteminde birçok fizyolojik ve patolojik süreçlerden sorumlu tutulan bir moleküldür ve astrositlerde özellikle sitokinlerle uyarılmaya bağlı sentezlenmekte ve salınmaktadır.^(4,32)

Serebral iskemilerde etiopatogenez üzerinde önemle durulmakta ve değişen ortam koşullarının, astrosit hücre yaşamı/ölümü üzerine etkileri araştırılmaktadır. Bu aşamada hücre ölümünü azaltacak ajanların saptanması çok önem kazanmaktadır. Bu bağlamda çalışmamızda, bazı antioksidanların (AA ve GSH) asidoz sırasında oluşan hücre ölümünü azaltıp azaltmadığını ve aynı zamanda oksidan hasarın göstergesi olan bazı ürünlerin (SOD, katalaz ve nitrit)

salımı üzerindeki etkilerini araştırmayı amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada yenidoğan (d1-d2) Sprague Dawley sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar Ege Üniversitesi Tıp Fakóltesi, Deneysel Cerrahi ve Araştırma, Hayvan Üretim ve Bakım Merkezinden temin edildi. Çalışma öncesinde Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan gerekli onay belgesi alındı.

Hücre Kültürü: Primer astrosit kültürü 2-3 günlük yeni doğan sıçan beyinlerinden, modifiye edilen Mc Carthy ve de Vellis yöntemi ile izole edildi.⁽²¹⁾ Mekanik ve enzimatik ayrıştırmaya uğratarak elde edilen hücre suspansiyonu, 3×10^5 hücre/ml olacak şekilde üreme besiyeri ile sulandırıldı ve 35 mm.lik petri kaplarına 2 şer ml konuldu. Üreme besiyeri, %10 Fetal calf serum (FCS) içeren Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) içermektedir. Petri kapları % 97 nemli hava, % 5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C de inkübe edildi ve besiyerleri 2-3 gün arayla değiştirildi. Hücrelerin astrosit olduğu 16-17. günlerde bu hücelere özgü Glial Fibriler Asidik Protein (GFAP) boyaması ile belirlendi. Büyümelerini ve çoğalmalarını tamamlayarak tek tabakalı hücre topluluğu oluşturan kültür hücreleri 16-18. günlerde sitotoksisite deneylerinde kullanıldı.

Asidoz oluşturulması: 16-18 günlük kültür hücrelerinin besiyeri ortamları (normal koşullarda pH: 7.4±0.1) aynı organik ve inorganik maddeleri içeren daha düşük pH'lı besiyeri ile (pH: 5.5± 0.1) değiştirildi. Hücreler bu pH değerlerinde 120 dakika süreyle % 5 CO₂, % 97 nem içeren inkübatörde 37 °Cde inkübe edildi. Asit ortama maruz bırakılan hücre kültürlerinde gelişen sitotoksisite, laktik dehidrogenaz (LDH) enzimi ölçümü ile belirlendi.⁽¹⁹⁾

Antioksidan uygulaması: Antioksidanların etkilerini incelemek amacıyla AA (1 mM) ve GSH (1 mM) kültür besiyerine eklendi. Antioksidan ve asidik pH' lı (pH:5.5) besiyerine maruz bırakılan kültürlerde

LDH aktivitesi, nitrit düzeyi, SOD ve Katalaz enzimlerinin aktivitelere ölçüldü.

Hücre Ölümünün / Sitotoksisitenin belirlenmesi: Laktik dehidrogenaz (LDH) enzimi, hücre membranı bütünlüğünün bozulmasıyla ortaya çıkan sitoplazmik bir enzimdir. Kültür besiyerine salgılanan LDH miktarı, hücre ölüm oranını verir.⁽¹⁹⁾ Örneklerdeki LDH aktivitesi, piruvatın laktata dönüşümü sırasında gerçekleşen NADH oksidasyonunun 340 nm de ölçümüne dayanan spektrofotometrik yöntemle saptandı.⁽³¹⁾

SOD aktivitesinin ölçümü: Hücreler 1 ml medium ile yıkandı, 1 ml 0.1 M potasyum fosfat tamponu (pH:7.4) ile zeminden kaldırıldı ve homojenize edilerek SOD ve katalaz enzim aktivitelere ölçüldü. Aynı homojenat içinde protein ölçümü de gerçekleştirildi. Total SOD aktivitesi epinefrinin otooksidasyonuna dayalı Misra ve Fridovic yöntemi ile ölçüldü ve pürifiye SOD ile kalibre edildi.⁽²²⁾ Bir ünite enzim, epinefrinin otooksidasyonunu % 50' sini inhibe eden enzim miktarı olarak belirlendi ve enzim aktivitesi U/mg protein olarak ifade edildi.

Katalaz aktivitesinin ölçümü: Katalaz aktivitesi, peroksidin yıkılıminın 240 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçümü ile belirlendi.⁽¹⁾ Bir ünite enzim bir dakikada 1 mmol H₂O₂' i spesifik koşullarda yıkan enzim miktarı olarak belirlendi ve enzim aktivitesi U/mg protein olarak ifade edildi.

Protein düzeyinin ölçümü: Çalışma örneklerindeki protein düzeyleri Bradford yöntemi ile spektrofotometrik olarak ölçüldü.⁽³⁾ Protein düzeyleri BSA ile elde edilen standart kalibrasyon eğrisine göre değerlendirildi ve mg protein olarak ifade edildi.

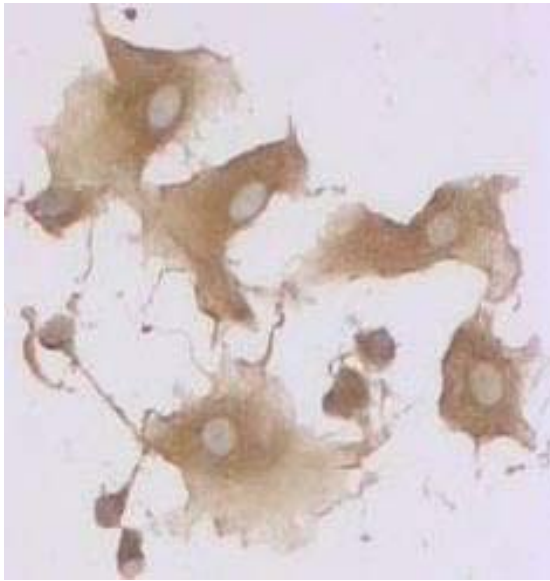
Nitrit düzeyinin ölçümü: Nitrit ölçümü süpernatantda yapılacağı için süpernatantlar eppendorf tüplerine alındı ve çalışma gününe dek -30 ° de saklandı. Süpernatandaki nitrit düzeyleri Griess yöntemi ile spektrofotometrik olarak

ölçülerek sonuçlar, sodyum nitrit ile elde edilen standart kalibrasyon eğrisine göre hesaplandı ve μM olarak verildi.⁽¹⁴⁾

İstatistiksel analiz: Verilerin değerlendirilmesinde ve gruplar arası karşılaştırmalarda tek yönlü ANOVA ve post-hoc Bonfferoni testi uygulandı. Veriler ortalama + SEM olarak sunuldu. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Bu çalışmadaki bulguların değerlendirilmesinde SPSS Inc. V10 istatistik programı kullanıldı.

BULGULAR

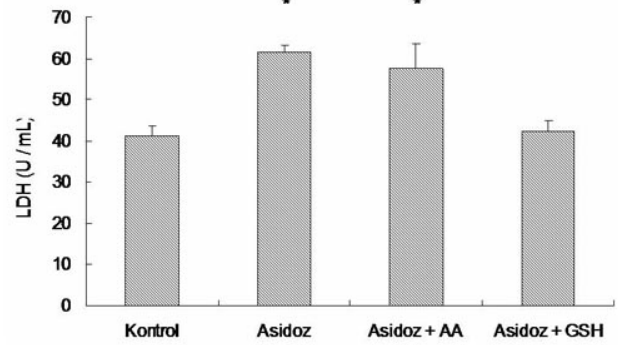
Astrosit kültürlerinin belirlenmesi: Astrositlerin sitoplazmalarında bulunan glial fibriler asidik protein (GFAP), bu hücreler için spesifiktir. Ürettiğimiz hücrelerin astrosit olduğu, GFAP antikoru ile, immunohistokimyasal yöntemle boyanarak belirlendi (Şekil 1).



Şekil 1: GFAP+ Astrosit hücreleri

Hücre ölümünün belirlenmesi: Hücre ölümünü değerlendirmek için hücre içi bir enzim olan LDH aktivitesi ölçüldü. Şekil 2' de görüldüğü gibi en yüksek LDH aktivitesi (hücre ölümü) asidozlu grupta

elde edildi ($p < 0.0005$). Glutasyon (GSH) eklenen asidozlu gruptaki LDH değerleri kontrol düzeylerine gerilerken AA eklenen grubun LDH aktivitesi kontrol grubuna göre yüksek bulundu ($p < 0.005$).

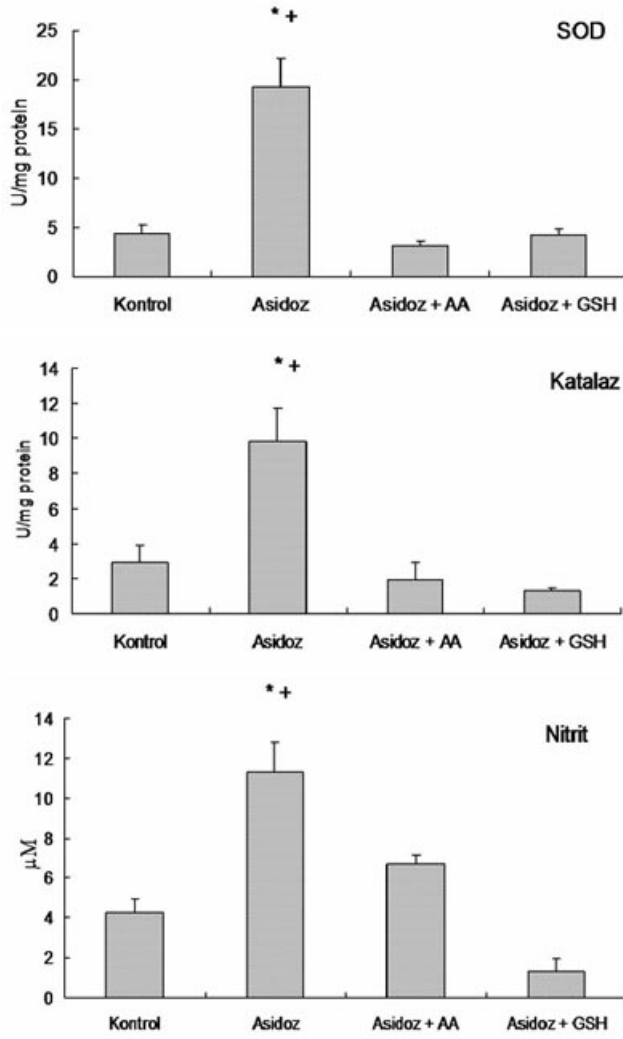


Şekil 2: LDH aktiviteleri. LDH aktivitesi, asidoz ve asidozla birlikte AA uygulanan gruplarda kontrole göre artarken glutasyon eklenen grupta kontrol düzeyine gerilemiştir (* Kontrolден farklı)

SOD aktivitesi: SOD aktivitesi, asidoz oluşturulmuş grupta kontrolden yüksek değerlerde bulundu ($p < 0.0005$). AA ve GSH eklenen asidozlu gruplarda ise aktivite asidoz oluşturulan gruba göre düşük bulundu (Şekil 3A, $p < 0.05$).

Katalaz aktivitesi: Katalaz aktivitesi asidoz oluşturulmuş grupta kontrolden yüksek değerlerde bulundu ($p < 0.0005$). AA ve GSH eklenen asidozlu gruplarda ise aktivite asidoz oluşturulan gruba göre anlamlı düşük bulundu (Şekil 3B, $p < 0.05$).

Nitrit düzeyinin ölçümü: Nitrit düzeyleri asidoz oluşturulan grupta kontrolden yüksek bulunurken ($p < 0.0005$), AA ve GSH eklenen asidozlu gruplarda asidoz oluşturulan gruba göre anlamlı fark gözlemlendi (Şekil 3C, $p < 0.05$).



Şekil 3: A) SOD aktiviteleri B) Katalaz aktiviteleri C) Nitrit düzeyleri. Asidoz oluşturulan gruplarda SOD ve katalaz aktiviteleri ile nitrit düzeyleri kontrole göre artarken, ortama AA ve glutasyon eklendiğinde değerler kontrol düzeylerine gerilemiştir. (* Kontrolden farklı, + Diğer gruplardan farklı)

TARTIŞMA

İskemiye bağlı inme, erişkinlerde ölüme yol açan en yaygın ikinci sağlık sorunu olup batı ülkelerinde tüm ölümlerin %10-12' sinden sorumludur.⁽⁹⁾ Bu nedenle inmenin yol açtığı sonuçların tanı ve tedavisi için yeni yöntemler geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Son yıllarda in vitro deneyleri, hayvan modellerini ve klinik uygulamaları içeren birçok çalışma iskemik hasarın oluşmasına yol açan mekanizmalar üzerinde odaklanmıştır. Bu süreçte rol oynayan birçok farklı etken

olmakla birlikte hüresel hasarın ortaya çıkmasındaki ortak yol; doku kanlanmasının azalması ve sonrasında gelişen eksitotoksisite, oksidatif stres, kan beyin bariyerinin bozulması, iskemi sonrası inflamasyon ve sonuçta nöron, glia ve endotel hücrelerde ölüm meydana gelmesidir.⁽⁴⁾ Beyinde en yoğun hücre topluluğu olan astrositler nöronlara verdikleri metabolik ve trofik destek nedeniyle santral sinir sisteminin korunmasında kritik önem taşıyan hücreleridir.⁽²⁶⁾ Yüksek antioksidan kapasiteleri nedeniyle oksidatif hasara nöronlardan daha dirençlidirler ve nöronal hücreleri toksik hasardan korurlar.^(10,30)

Hipoperfüzyon/iskemi sırasında gerekli enerjinin anaerobik yolla sağlanması laktik asit birikimine bu da ortam pH'nın düşmesine (asidoza) yol açmaktadır. Asidoz sırasında astrositlerin toksisiteye uğradığı pek çok çalışmayla gösterilmiştir.^(29,33)

İskemik reperfüzyonu takiben sitotoksik etki gösteren serbest oksijen radikallerinin oluştuğu bilinmektedir.⁽⁶⁾ Serbest oksijen radikalleri dokularda mitokondriyal elektron transport sistemleri tarafından üretilmektedir. Dokularda oluşan oksijen radikallerine karşılık birtakım antioksidan sistemler de bulunmaktadır. Bu sistemlerden bazıları H₂O₂ için katalaz ve glutasyon peroksidaz, süperoksit radikali için süperoksit dismutaz (SOD), lipid peroksidleri için glutasyon peroksidaz ve glutasyon, seruloplazmin, transferrin gibi antioksidanlardır. Oluşan serbest radikallerin miktarının, hücrelerin antioksidan kapasitelerini aşması oksidatif strese yol açar.⁽¹³⁾ Bazı radikallerin astrositlerde asidozu indüklediği gösterilmiştir.⁽²⁷⁾ Asidozda süperoksit sentezi ile birlikte SOD aktivitesi artar ve aşırı H₂O₂ sentezlenir. H₂O₂, glutasyon peroksidaz veya katalaz ile suya indirgenir. SOD aktivitesinin artması iskemi sonrasında gelişen hücre hasarını azaltır.⁽¹¹⁾ Katalaz aktivitesindeki değişiklikler de SOD için açıklanan mekanizmalarla benzerdir.

Çalışmamızda, antioksidan kullanımının astrosit hücrelerini asidoz toksisitesinden koruyup korumadığını araştırdık. Aynı zamanda, kullanılan antioksidan ajanların SOD ve katalaz aktivitelerini ve nitrit düzeylerini (NO) ne ölçüde değiştirdiğini belirleyerek astrositlerin oksidatif strese yanıtlarını araştırdık. Bu amaçla asidoz sırasında, ortama AA ve GSH antioksidanları ekledik. Çalışmamız LDH ile belirlenen hücre ölümünün, önceki çalışmalarla^(23,29) uyumlu olarak asidoz (pH: 5.5) ortamında arttığını gösterdi (Şekil 2). Asidoz olan grupta SOD ile katalaz enzimlerinde ve nitrit oluşumunda belirgin bir artış saptadık (Şekil 3). Hücre ölümünün arttığı asidoz koşullarında, antioksidan enzimlerin ve nitrit oluşumunun artması, oluşan toksisitede oksidan stres hasarın rol oynadığını düşündürmektedir. Asidozlu gruba AA eklenmesi koruyucu bir etki yaratmazken, GSH eklenen grupta hücre ölümünde anlamlı bir düşme gözlemlendi. GSH beyin homeostazisinin devam etmesinde önemli rolü olan bir antioksidandır ve astrositlerde nöronlardan daha yüksektir.^(17,20) Astrositlerin nöron hücrelerine göre oksidatif hasara karşı daha dirençli olmalarının nedeni, daha fazla GSH sentezlenmesi ve yüksek glutatyon peroksidaz düzeyleri olabilir.⁽¹⁶⁾ Bizim çalışmamızın sonuçları da, ortamda GSH artışının astrositleri asidoz toksisitesinden koruduğunu göstermektedir. Sonuçlarımız, GSH nin asidozlu ortamda SOD, katalaz ve nitrit oluşumunu da belirgin şekilde azalttığını gösterdi (Şekil 3). Bu sonuç da asidozda astrosit hücre ölümünün oksidatif hasar ile tetiklendiğini göstermektedir.

AA, askorbat anyonu olarak bulunduğu santral sinir sisteminde önemli nöroprotektif rolü olan bir antioksidandır.⁽²⁴⁾ Bizim çalışmamızda ise asidozlu ortama AA eklenmesi hücre ölümünü azaltmadı (Şekil 2). Buna karşın asidozlu ortamda SOD, katalaz ve NO düzeylerini anlamlı şekilde düşürdü (Şekil 3). Bu sonuç kullandığımız AA'in hücre

ölümü için koruyucu dozun (1 mM) artırılması gereğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda antioksidan enzim aktivitelerinin yanısıra, bir serbest radikal olan nitrik oksidin stabil son ürünü; nitrit düzeyleri de ölçülmüştür (Şekil 3C). NO, beyindeki nörotoksik etkilerini peroksinitrit üzerinden göstermektedir. Çalışmamızda asidoz yaratılan gruptaki nitrit düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yükseldiği gözlemlendi. Nitrik oksit sentaz (NOS) enzimlerinin inhibe edilerek NO üretiminin azaltılması nöroprotektif etki yaratır.⁽²⁸⁾ Çalışmamızda da GSH, asidoz sırasında oluşan nitrit düzeyini azaltarak antioksidan etki yarattı. Sonucumuz, astrositlerde NO düzeylerinin arttığı hasar koşullarında glutatyon sentezinin arttığı gösteren⁽¹²⁾ literatür bilgisiyle uyumludur.

Çalışmamız, çok yaygın bir ölüm nedeni olan inmenin yol açtığı iskemik hasar/ asidozun yarattığı astrosit ve dolayısıyla nöron hücre ölümünü azaltmak veya önlemek için yapılan çalışmalara destek olacak bir model oluşturmak amacıyla planlanmıştır. Sonuçlarımız asidoz sırasında artan astrosit ölümünde oksidan stresin rolünün olduğunu düşündürmektedir. Oksidan hasarı azaltmak amacıyla kullanılan 1 mM AA nitrit düzeyini, SOD ve katalaz enzimlerini aktivitelerini kontrol değerlerine yaklaştırmış ancak bu etkileri ile hücre ölümünde azalma yaratacak etki göstermemiştir. Bu koşullarda AA uygulamasının daha yüksek dozlarda denenmesi önerilebilir. GSH ise 1 mM dozunda kültür ortamına verildiğinde, nitrit oluşumunu baskılamış, antioksidan enzim aktivitelerinde asidoza bağlı etkiyi ortadan kaldırmış ve ayrıca asidoz sırasında ortaya çıkan hücre ölümünde de anlamlı bir azalma yaratmıştır. Bu sonuçların in vivo çalışmalarla da desteklenerek, nörotoksiteden korunma veya tedavi amaçlı antioksidan kullanılması önerilebilir.

İletişim:

Ozlem Yilmaz

E-mail: ozlem.alkan.yilmaz@ege.edu.tr

Gönderilme Tarihi: 08 Ocak 2010

Revizyon Tarihi: 23 Şubat 2010

Kabul Tarihi: 02 Mart 2010

The Online Journal of Neurological Sciences (Turkish) 1984-2010

This e-journal is run by Ege University

Faculty of Medicine,

Dept. of Neurological Surgery, Bornova,

Izmir-35100TR

as part of the Ege Neurological Surgery

World Wide Web service.

Comments and feedback:

E-mail: editor@jns.dergisi.org

URL: <http://www.jns.dergisi.org>

Journal of Neurological Sciences (Turkish)

Abbr: J. Neurol. Sci.[Turk]

ISSNe 1302-1664

KAYNAKLAR

1. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105:121-126.
2. Bolanos JP, Heales SJ, Land JM, Clark JB. Effect of peroxynitrite on the mitochondrial respiratory chain: differential susceptibility of neurons and astrocytes in primary cultures. *J Neurochem.* 1995; 64:1965-1972.
3. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248-254.
4. Brouns R, De Deyn PP. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke *Clin Neurol Neurosurg.* 2009; 111:483-495.
5. Chan PH. Role of oxidants in ischaemic brain damage. *Stroke.* 1996; 27: 1124-1129.
6. Chan PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001; 21:2-14.
7. Cooper CE, Brown GC. The interactions between nitric oxide and brain nerve terminals as studied by electron paramagnetic resonance. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 212 404-412.
8. Desagher S, Glowinski J, Premont J. Astrocytes protect neurons from hydrogen-peroxide toxicity. *J Neurosci.* 1996; 16:2553-2562.
9. Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM. *Stroke.* *Lancet.* 2008; 371:1612-1623.
10. Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J. Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem.* 2000; 267:4912-4916.
11. Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Noshita N, Sugawara T, Kawase M, Chan PH. The cytosolic antioxidant copper/zinc-superoxide dismutase prevents the early release of mitochondrial cytochrome c in ischemic brain after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci.* 2000; 20:2817-2824.
12. Gegg ME, Clark JB., Heales SJR. Co-culture of neurones with glutathione deficient astrocytes leads to increased neuronal susceptibility to nitric oxide and increased glutamate-cysteine ligase activity. *Brain Res.* 2005; 1036:2:1-6.
13. Gonzalez FF, Ferriero DM. Therapeutics for neonatal brain injury. *Pharmacol Ther.* 2008; 120(1):43-53.
14. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982; 126:131-138.
15. Hollaar CTL, Van derValk EJM, Franken NAP, Van Ravels FJM, Wondergem J, Van der Laarse A. Protection of myocytes against free radical-induced damage by accelerated turnover of the glutathione redox cycle. *Eur Heart J.* 1995; 16:553-562.
16. Huang J, Philbert MA. Distribution of glutathione and glutathione-related enzyme systems in mitochondria and cytosol of cultured cerebellar astrocytes and granule cells. *Brain Res.* 1995; 680:16-22.
17. Jain A, Martensson J, Stole E, Auld PAM, Meister A. Glutathione deficiency leads to mitochondrial damage in brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 88:1913-1917.
18. Jorgensen MB, Finsen BR, Jensen MB, Castellano B, Diemer NH and Zimmer J. Microglial and astroglial reactions to ischemic and kainic acid induced lesions of the adult rat hippocampus. *Exp Neurology.* 1993; 120:70-88.
19. Koh JY, Choi DW. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *J Neurosci Methods.* 1987; 20:83-90.
20. Makar TK, Nedergaard M, Preuss A, Gelbard AS, Perumal AS, Cooper AJL. Vitamin E, ascorbate, glutathione, glutathione disulfide and enzymes of glutathione metabolism in cultures of chick astrocytes and neurons: Evidence that astrocytes play an important role in the antioxidative processes in the brain. *J Neurochem.* 1994; 62:45-53.
21. Mc Carthy KD, de Vellis J. Preparation of separate astroglial cell cultures from rat brain cerebral tissue. *J Cell Biol.* 1980; 85:890-902.

22. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247:3170-3175.
23. Nedergaard M, Goldman SA, Desai S, Pulsinelli WA. Acid induced death in neurons and glia. *J Neurosci.* 1991;11(8): 2489-2497.
24. Rice ME. Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *TINS.* 2000; 23(5):209-216.
25. Siushansian RP, Wilson JX. Ascorbate transport and intracellular concentration in cerebral astrocytes. *Acta Physiol Scand.* 1995; 138:107-114.
26. Takuma K, Baba A, Matsuda T. Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection *Prog Neurobiol.* 2004; 72(2):111-127.
27. Tsai KL, Wang SM, Chen CC, Fong TH, Wu ML. Mechanism of oxidative stress-induced intracellular acidosis in rat cerebellar astrocytes and C6 glioma cells. *J Physiol.* 1997; 502(1):161-174.
28. van den Tweel ER, van Bel F, Kavelaars A, Peeters-Scholte CM, Haumann J, Nijboer CH, Heijnen CJ, Groenendaal F. Long-term neuroprotection with 2-iminobiotin, an inhibitor of neuronal and inducible nitric oxide synthase, after cerebral hypoxia-ischemia in neonatal rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005; 25(1):67-74.
29. Walz W, Mukerji S. Stimulation of aspects of ischemia in cell culture: changes in lactate compartmentation. *Glia.* 1990; 3:522-528.
30. Wilson JX. Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Can J Physiol Pharmacol.* 1997; 75:1149-1163.
31. Wroblewski F, LaDue J. Lactic dehydrogenase activity in blood. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1955; 90:210-213.
32. Yılmaz O. Primer Mikst Glia Hücre Kültüründe Asit Ortamın Yol Açtığı Toksikite. *Fizyoloji Doktora Tezi.* 1997
33. Yılmaz O, Taskiran D, Aydar S. Cytotoxicity in cytokine stimulated astrocyte cultures: role of IL-6 and nitric oxide. *Neuroscience Res Com.* 2004; 34(2):82-91.