

## K-3 VİTAMİNİNİN SIÇAN GLİOMA (C6) ve İNSAN GLİOBLASTOMA MULTİFORME HÜCRE ÇOĞALMASINA İN VİTRO ETKİLERİ

*Pınar ÖZTOPÇU<sup>1</sup>, Selda KABADERE<sup>1</sup>, Ruhi UYAR<sup>1</sup>*

### ÖZET

**Amaç:** Glioblastoma multiforme beyin dokusu içerisine hızla yayılan ve onu yıkıma uğratan, sinir sisteminde görülmeye sıklığı yüksek oldukça tehlikeli bir tümör çeşididir. K-3 vitamininin çeşitli kanser hücre dizileri üzerinde hücre çoğalmasını baskılayıcı etkisi olduğu bildirilmektedir. Çalışmamızda K-3 vitamininin, sıçan glioma (C6) ve insan glioblastoma multiforme hücrelerinin çoğalması üzerindeki baskılayıcı etkilerini karşılaştırarak belirlemeyi amaçladık.

**Yöntem:** K-3 vitamininin 1, 10, 25, 50, 75 ve 100 M dozlarının hücre çoğalması üzerindeki etkilerini, besi ortamına ilave edildikten 24 saat sonra 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) yöntemi ile belirledik. Sonuçların istatistiksel değerlendirmesini tek yönlü varyans analizi ardından, Tukey'in çoklu karşılaştırma yöntemi ile yaptık.

**Bulgular:** C6 ve insan glioblastoma multiforme hücre dizileri üzerinde K-3 vitamininin belirlenen dozlarının hücre yaşam oranı üzerindeki etkilerini belirledik. Hücrelerin çoğalmasını % 50 oranında baskılayan doz olarak bilinen IC<sub>50</sub> değerlerini C6 hücreleri için 41 M, glioblastoma multiforme hücreleri için 24 ve 23 M olarak belirledik.

**Sonuçlar:** Çalışmamızda, K-3 vitamininin hem C6 hem de insan glioblastoma hücreleri üzerinde düşük dozlarda antiproliferatif etkisi olduğu sonucuna vardık. Bulgularımızın, K-3 vitamini ve glioblastoma multiforme üzerinde yapılacak başka in vitro ve in vivo çalışmalara ışık tutacağına inanmaktayız.

**Anahtar kelimeler:** Glioma, K-3 vitamini, hücre çoğalması, in vitro

### Effects of Vitamin K-3 on Growth Inhibition of Rat glioma Cell (C6) and Human Glioblastoma Multiforme in Vitro

### SUMMARY

**Objectives:** Glioblastoma multiforme is characterized as a highly invasive and rapidly growing astrocytoma. Previous studies have reported that vitamin K-3 inhibits cell growth of many types of malignant tumor cell lines. In this study we aimed to investigate the possible inhibitory effect of vitamin K-3 on rat glioma (C6) and human glioblastoma multiforme cells.

**Method:** The cells were exposed to 1, 10, 25, 50, 75 and 100 M of vitamin K-3 for 24 hours. Cell viability was estimated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. For statistical analysis one-way ANOVA test and then Tukey's multiple comparison test were used.

**Results:** The IC<sub>50</sub> values of vitamin K-3 were calculated as 41 M for C6, and 24 M and 23 M for human glioblastoma multiforme cells.

**Conclusion:** We have found that at low concentrations vitamin K-3 has an antiproliferative effect on both C6 and human glioma cells. We believe that all these findings should contribute to other in vitro or in vivo studies on vitamin K-3 and glioblastoma multiforme cells.

**Key words:** Glioma, vitamin K-3, cell proliferation, in vitro

Glioblastoma multiforme beyin dokusuna hızla yayılan ve onu yıkıma uğratan, primer beyin tümörlerinin %30'unu ve astrositomaların yaklaşık olarak %50'sini oluşturan, oldukça tehlikeli bir beyin tümörü çeşitidir.<sup>1,2</sup> Yetişkin erkeklerde kadınlara oranla daha sık görülmekle beraber 15 yaşın altındaki çocuk tümörlerinin %50'sini oluşturmaktadır.<sup>3</sup> Beyin tümörü belirlenen hastalarda tümörün diğer bölgelere geçmemesi için önce cerrahi müdahale yapılmaktadır. Fakat tümör bulunan bölgeyi her zaman tam olarak temizlemek mümkün olmamaktadır. Bu yüzden cerrahi müdahaleyi takiben radyoterapi ve kemoterapiye başlanmaktadır. Kemoterapide ise kullanılan ilaçların yan etkilerinin çok fazla olması ve kullanılan ilaçlara karşı zaman içerisinde kanser

hücrelerinin direnç kazanması tedaviyi olumsuz etkilemektedir. Bu sebeplerden dolayı hastanın yaşam süresi en fazla 1 ila 2 yıl uzatılabilmektedir.<sup>4,5</sup>

K vitamini, yağda çözülebilen ve canlılık için gerekli temel bir vitamindir.<sup>6</sup> K vitamininin K-1 (Filokuinon) ve K-2 (Menakuinon) olmak üzere iki doğal formunun yanı sıra, K-3 (Menadion) olarak isimlendirilen sentetik türevi bulunmaktadır.<sup>7</sup> K-3 vitamininin özellikle pek çok kemirgen ve insan kanser hücreleri üzerinde çoğalmayı baskılayıcı etkisinin olduğu in vitro ve in vivo çalışmalarla gösterilmiştir.<sup>8,9</sup> Yapılan çalışmalarda K-3 vitamininin hücre içine girdiğinde yabancı bir madde olarak algılandığı ve hücreden uzaklaştırılabilmek için çeşitli enzimler yardımı ile redoks döngüsüne girdiği belirlenmiştir.

<sup>1</sup>Osman Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AD. ESKİŞEHİR

Döngü sırasında K-3 vitamininin ilk olarak bir elektronu kaybederek semikuinon, daha sonra bir elektron daha kaybederek hidrokuinon yapısına indirildiği anlaşılmıştır. Semikuinon ve hidrokuinon ortamda bulunan oksijen ile reaksiyona girerek, hücre içinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşmasına sebep olduğu tespit edilmiştir. Hücre içinde bulunan ROS miktarının artması sonucunda oluşan olumsuz koşulların hücre döngüsünü baskıladığı belirtilmiştir.<sup>9</sup>

Yapılan çalışmalarda K-3 vitamininin yan etkilerinin az olduğu, klinikte kullanılan bazı antikanser ilaçların sitotoksik etkilerini arttırdığı ve ilaçlara karşı direnç oluşturan hücreler üzerinde etkili olduğunun belirlenmesi dikkati bu vitamin üzerine çekmektedir.<sup>10</sup> Bu nedenle, çalışmamızda K-3 vitamininin hem sıçan hem de insan glioma hücrelerinin çoğalması üzerindeki etkilerini karşılaştırarak belirlemeyi amaçladık.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Deneyel çalışmalarımız Osmangazi Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı Hücresel Araştırmalar Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Çalışmamızda daha önceden Durmaz ve arkadaşları tarafından iki farklı hastadan alınarak hazırlanmış glioblastoma multiforme hücre serisi ile Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilen C6 hücre serisi kullanıldı.<sup>11</sup> Hücreler 1:1 oranında Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, Sigma) ile Nutrient Mixture F-12 (F-12, Sigma), %10 fetal calf serum (Sigma) ve %1 penisilin+streptomisin (Sigma) karışımı içeren besi yerinde, 37 °C, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem içeren ortamında inkübe edildi.<sup>11,12</sup>

**Deneyin yapılışı:** Hücrelerin deneye alınması ve ilaç uygulaması Thomas ve arkadaşlarının uyguladıkları yöntemle yapıldı.<sup>13</sup> Her bir kuyucuğa 3x10<sup>4</sup> hücre düşecek şekilde 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekim yapıldı ve 24 saat inkübe edildikten sonra ilaç uygulamasına alındı. K-3 vitamini (Sigma) F-12 kullanılarak 1:10 oranında seyreltildi. K-3 vitamininin 1, 10, 25, 50, 75 ve 100 M dozları hazırlanarak besi ortamına eklendi.

**MTT yöntemi:** İlk olarak Mosmann tarafından tanımlanan ve daha sonra Alley ve ark. tarafından geliştirilen 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) yöntemi hücre canlılığının belirlenmesi için sıkça kullanılan pratik bir yöntemdir.<sup>14,15</sup> MTT, hücrelere aktif olarak absorbe olan ve mitokondriye bağlı bir reaksiyon ile renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenen bir maddedir.<sup>15</sup> Hücrelerin MTT indirgeme özelliği hücre canlılığının ölçütü olarak alınır ve MTT analizi sonucunda elde edilen boya yoğunluğu canlı hücre

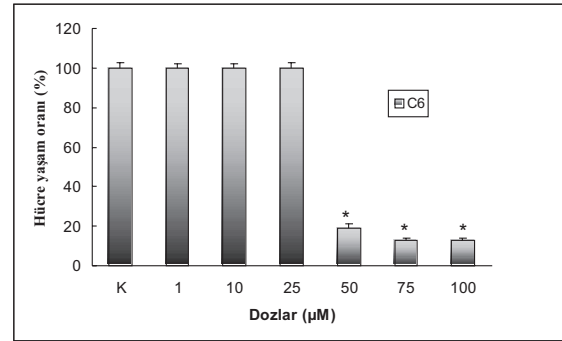
sayısı ile korelasyon gösterir.<sup>16</sup> Hücreler 24 saat ilaç dozları ile inkübe edildikten sonra, MTT (Sigma) testine alındılar.

İlaç uygulanmış her bir kuyucuktan elde edilen optik yoğunluk 550 nm spektrofotometrede okundu. Okunan değerler, her bir kuyucuktaki ilaç uygulanan hücrelerin absorbanası x 100 / kontrol hücrelerinin absorbanası formülüne göre canlı hücre yüzdesine çevrildi.<sup>11</sup> K-3 vitamininin tüm konsantrasyonlarını içeren doz-cevap eğrileri belirlenerek kontrolün yüzdesi olarak ifade edildi. Doz cevap eğrileri yardımı ile IC<sub>50</sub> değerleri hesaplandı. Yapılan tüm deney grupları en az 3 kez tekrar edildi.

Veriler tek yönlü varyans analizi ve ardından Tukey'in çok yönlü karşılaştırma yöntemiyle istatistiksel olarak değerlendirildi. p< 0,05 anlamlı olarak kabul edildi.

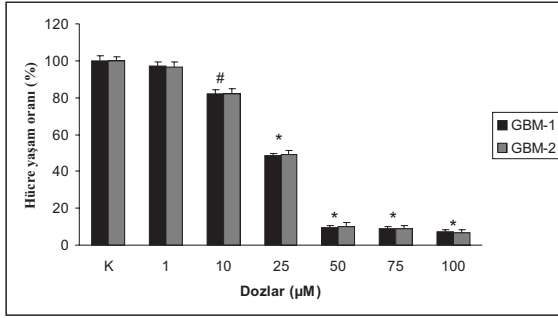
## BULGULAR

C6 hücreleri üzerinde K-3 vitamini 50 M'dan itibaren etki göstermeye başladı. 1, 10 ve 25 M dozlarındaki K-3 vitamini C6 hücreleri üzerinde çoğalmayı baskılayıcı bir etki göstermemişti (p>0.05). 50, 75 ve 100 M dozları hücre yaşam oranını kontrole göre azaltmıştır (p<0.001, Şekil 1, Tablo 1). Canlı hücre sayısındaki kontrole göre azalma 50 M'da % 81, 75 ve 100 M'da % 87'dir. K-3 vitamininin C6 hücreleri üzerindeki IC<sub>50</sub> değeri 41 M olarak hesaplandı.



**Şekil 1.**Farklı dozlardaki K-3 vitamininin C6 hücre yaşam oranlarına etkisi. Kontrol grubu % 100 olarak kabul edilmiştir; p<0.001.

K-3 vitamini birinci ve ikinci hastaya ait glioblastoma multiforme hücreleri üzerinde 10 µM'dan itibaren etki göstermeye başladı (p<0.05, Şekil 2, Tablo 1). 1 µM dozunda oluşan etki kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık ifade etmemektedir (p>0.05). 50 µM'da kontrol grubuna göre % 90 azalma belirlendi (p<0.001). K-3 vitamininin IC<sub>50</sub> değeri birinci hasta için 24 µM, ikinci hasta için ise 23 µM olarak hesaplandı.



**Şekil 2.**Farklı dozlardaki K-3 vitamininin birinci (GBM-1) ve ikinci (GBM-2) hastaya ait glioblastoma multiforme hücre yaşam oranlarına etkisi. Kontrol grubu % 100 olarak kabul edilmiştir; \*: p<0.001, #: p<0.05.

## TARTIŞMA

K-3 vitamininin glioma hücre çoğalması üzerindeki etkisi ilk olarak Prasad ve ark. tarafından C6 hücreleri kullanılarak incelenmiştir. C6 hücreleri üzerindeki IC<sub>50</sub> değeri 13.5 µM olarak belirlenmiştir.<sup>8</sup> Çalışmamızda K-3 vitamininin IC<sub>50</sub> değeri 41 µM olarak bulunmuştur. Çalışmada belirlenen IC<sub>50</sub> değerinin, Prasad ve ark. belirlediği değerden daha

yüksek olmasının nedeni, F-12 solüsyonuna ek olarak DMEM solüsyonunun da besi ortamında kullanılması olabilir. Ayrıca çalışmamızda K-3 vitamininin hücre canlılığı üzerindeki etkisi ortama ilave edildikten 24 saat sonra saptanırken, Prasad ve ark.nın yaptığı çalışmada ise bu etki 72 saat sonunda belirlenmiştir. Değişik besi ortamlarının ve inkübasyon sürelerinin K-3 vitamininin IC<sub>50</sub> değerinde farklılık yaratabileceğini düşünmekteyiz.

Yapılan çalışmalarda K-3 vitamininin, değişik kanserli hücre serilerinde redoks döngüsüne girerek ROS oluşmasına neden olduğu ve oluşan olumsuz koşullarında hücre çoğalmasını baskılamış olabileceği rapor edilmiştir.<sup>17,18,19</sup> ROS oluşumu ile merkezi sinir sisteminde pek çok hasarın oluştuğu ve özellikle bu olumsuz koşullardan en çok etkilenebilecek ve zarar görecektir. Bununla beraber yapılan son çalışmalarda, sistemin diğer bir hücresi olan astrosit hücrelerinin ROS'a karşı oldukça dirençli olduğu ve beyinde oluşabilecek hasarlara karşı nöronları koruduğu belirtilmiştir. Desagher ve arkadaşları, koruyucu etkinin astrosit/nöron oranına bağlı olduğunu ve 30 dakika 100 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilave edilen fare nöron kültüründe yaklaşık olarak 1 astrosit hücrelerinin

**Tablo 1:** C6 ve insan glioblastoma multiforme hücrelerine K-3 vitamininin etkisini gösteren optik yoğunluk, % ve p değerleri

Dozlar ( M)	C6			İnsan glioblastoma multiforme birinci hasta			İnsan glioblastoma multiforme ikinci hasta		
	K-3 vitamini			K-3 vitamini			K-3 vitamini		
	Optik yoğunluk	%	p	Optik yoğunluk	%	p	Optik yoğunluk	%	p
Kontrol	2,218 0,211 n=24	100		2,216 0,120 n=24	100		2,218 0,086 n=24	100	
1	2,218 0,180 n=24	100	1,00	2,148 0,123 n=24	96,9	0,205	2,145 0,091 n=24	96,7	0,27
10	2,219 0,183 n=24	100	1,00	1,815 0,118 n=24	81,9	0,004	1,820 0,088 n=24	82	0,006
25	2,218 0,176 n=24	100	P<0,001	1,080 0,144 n=24	48,7	P<0,001	1,093 0,085 n=24	49,2	P<0,001
50	0,416 0,077 n=24	19	P<0,001	0,210 0,099 n=24	9,4	P<0,001	0,221 0,158 n=24	9,9	P<0,001
75	0,305 0,049 n=24	13	P<0,001	0,199 0,042 n=24	8,9	P<0,001	0,193 0,028 n=24	8,7	P<0,001
100	0,300 0,030 n=24	13	P<0,001	0,159 0,017 n=24	7,1	P<0,001	0,155 0,012 n=24	6,9	P<0,001

20 nöronu koruduğunu göstermişlerdir.<sup>22</sup> Ayrıca Sun ve arkadaşları, ortama K-3 vitamini ilave edilmeden önce antioksidan enzimlerin eklenmesinin oluşan ROS miktarını dikkat çekici bir şekilde azalttığını göstermişlerdir.<sup>23</sup> Çalışmamızda hem C6 hem de insan glioblastoma multiforme hücrelerinde K-3 vitamininin oldukça düşük dozlarda antiproliferatif etki gösterdiğini belirledik. Tüm bu bulgular doğrultusunda K-3 vitaminin düşük dozlarında oluşturduğu reaktif oksijen türleri nöronlara zarar verecek miktarda olmayabilir.

Antineoplastik ilaçlar klinikte genellikle bir yada daha fazla ajanla birlikte kullanılırlar. Nutter ve arkadaşları, klinik tedavide aktif olarak kullanılan on beş antikanser ilaç ile K-3 vitamininin etkileşimlerini oral epidermoid karsinoma (KB) hücre serisinde in vitro olarak araştırmışlardır. K-3 vitamininin dört ilaç ile sinerjistik, sadece bir ilaç ile antagonistik etki gösterdiğini, geriye kalan on ilacın ise antiproliferatif etkisini arttırdığını belirlemişlerdir.<sup>10</sup> Ayrıca K-3 vitamininin multi-drug direnç geni taşıyan insan kanserli hücre dizilerinde oldukça etkili olduğu ve toksik yan etkilerinin az olduğu tartışılmıştır.<sup>24,25</sup> Tüm bu bulgular, K-3 vitamininin antikanser ilaçlarla kombine olarak kullanılabilceğini ve bazı direnç geni taşıyan beyin tümörlerinin tedavisinde kullanılabilceğini düşündürmektedir. Genellikle kemoterapide kullanılan ilaçlar kan beyin bariyerinden oldukça düşük oranda geçebilmelerine rağmen, K-3 vitamininin beyin kapiller endotel hücrelerinin geçirgenliğini arttırdığı için kan beyin bariyerini kolaylıkla geçebildiği, in vitro çalışmalarla gösterilmiştir.<sup>26</sup>

C6 ve insan glioma hücre serileri üzerinde K-3 vitamininin etkisinin karşılaştırılmasını amaçlayan çalışmamızda K-3 vitamininin her iki hücrede de güçlü antiproliferatif etkiye sahip olduğunu belirledik. İki hücre tipi karşılaştırıldığında, K-3 vitamininin çoğalmayı baskılayıcı etkisinin, insan glioma hücrelerinde C6 hücrelerine oranla daha güçlü olduğunu saptadık. Yan etkilerinin az, diğer antikanser ilaçların sitotoksik etkilerini artıran, bunlara karşı direnç geliştirmiş hücrelerde de etkili olabileceği belirtilen ve bulgularımızdan da elde edilen veriler doğrultusunda glioma hücrelerinin çoğalmasını baskılayan K-3 vitamininin ileride klinikte yararlılığı olabileceğini ve benzer çalışmalara kaynaklık edebileceğini düşünmekteyiz. Bununla birlikte, K-3 vitamininin kanser tedavisinde ilaç olarak kullanılabilmesi için pek çok hayvan deneyleri ve klinik araştırmaların yapılması elbette gereklidir.

## KAYNAKLAR

1. Louis DN, Cavenee WK. Neoplasms of the central nervous system. In: DeVita, V.T., Hellman, S., and Rosenberg, S.A, eds; Cancer: principle and practice of oncology, 5 th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1997; 2013-2017.

2. Yaltkaya K, Balkan S, Oguz Y. Nöroloji Ders Kitabı, Palme Yayıncılık, Ankara, 1998; 292.
3. Bunin GG, Kujiten RR, Boesel PC. Materyal diet and risk of astrocytic glioma in children :report from the Childrens Cancer Group (United States and Canada). Cancer Cause Control 1994; 5 (2):177-187.
4. Mikkelsen T. Cytostatic agents in the management of malignant gliomas. Cancer Control:JMCC 1998; 5(2):150-162.
5. Salford LG, Siesjö P, Skagerberg G, Persson BRR, Larsson EM, Lindvall M, Visse E, Widegren B. Search for effective therapy against glioblastoma multiforme-clinical immunisation with autologous glioma cells transduced with the human interferon- gene. International Congress Series 2002; 1247:211-220.
6. Raju TN. The Nobel chronicles. Lancet 1999; 353:761.
7. Suttie JW. The importance of menaquinones in human nutrition. Annu Rev Nutr 1995; 15:399-417.
8. Prasad KN, Prasad JE, Sakamoto A. Vitamin K<sub>3</sub> (menadione) inhibits the growth of mammalian tumor cells in culture. Life Sci 1981; 13:1387-1392.
9. Ngo EO, Sun TP, Chang JY, Wang CC, Chi KW, Cheng AL, Nutter LM. Menadioneinduced DNA damage in a human tumor cell line. Biochem Pharmacol 1991; 42(10):1961-1968.
10. Nutter LM, Cheng AL, Hung HL, Hsieh RK, Ngo EO, Liu TW. Menadione: spectrum of anticancer activity and effects on nucleotide metabolism in human neoplastic cell lines. Biochem Pharm. 1991; 41:1283-1292.
11. Durmaz R, Deliorman S, Işıksoy S, Uyar R, Erol K and Tel E: Antiproliferative properties of the Lazaroids U-83836E and U-74389G on glioma cells in vitro. Pathol Oncol Res 1999; 5(3):223-228.
12. Unterman TG, Glick RP, Waites GT, Bell SC. Production of insulin-like growth factor-binding proteins by human central nervous system tumors. Cancer Res 1991; 51:3030-3036.
13. Thomas DGT, Darling JL, Paul EA, Mott TJ, Godlee JN, Tobias JS, Capra LG, Collins CD, Mooney C, Bozek T, Finn GP, Arigbabu SO, Bullard DE, Shannon N, Freshney RI. Assay of anti-cancer drugs in tissue culture: relationship of relapse free interval (RFI) and in vitro chemosensitivity in patients with malignant cerebral glioma. Br J Cancer 1985; 51:525-532.
14. Mosmann T. Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. J Immunol Methods 1983; 65:55-63.
15. Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Abbott BJ, Mayo JG, Shoemaker RH, Boyd MR. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. Cancer Res 1988; 48:589-601.
16. Abe K, Matsuki N. Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. Neurosci Res 2000; 38:325-329.
17. Wu FYH, Liao WC, Chang HM. Comparison of antitumor activity of vitamins K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub> and K<sub>3</sub> on human tumor cells by two (MTT and SRB) cell viability assays. Life Sci 1993; 52(22):1797-1804.
18. Nishikawa Y, Carr BI, Wang, M, Kar S, Finn F, Dowd P,

- Zheng Z, Kerns J. Growth inhibition of hepatoma cells induced by vitamin K and its analogs. *J. Biol. Chem* 1995; 270(47):28304-28310.
19. Sata N, Stumpe KH, Han B, Haussinger D, Niederau C. Menadione induces both necrosis and apoptosis in rat pancreatic acinar AR4-2J cells. *Free Rad Biol Med* 1997; 23(6):844-850.
  20. Buckman TD, Sutphin MS, Mitrovic B. Oxidative stress in a clonal cell line of neuronal origin: effects of antioxidant enzyme modulation. *J Neurochem* 1993; 60(6):2046-2058.
  21. Servitja JM, Masgrau R, Pardo R, Sarri E, Picatoste F. Effects of oxidative stress on phospho lipid signaling in rat cultured astrocytes and brain slices. *J Neurochem* 2000; 75:788-794.
  22. Desagher S, Glowinski J, Premont J. Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity. *J Neurosci* 1996; 16(8):2553-2562.
  23. Sun LK, Yoshii Y, Miyagi K. Cytotoxic effect through Fas/APO-1 expression due to vitamin K in human glioma cells. *J Neurooncol* 2000; 47:31-38.
  24. Wang Z, Wang M, Finn F, Carr BI. The growth inhibitory effects of vitamin K and their actions on gene expression. *Hepatology* 1995; 22(3):876-882.
  25. Lamson DW, Plaza SM. The anticancer effects of vitamin K. *Altern Med Rev* 2003, 8(3):303-318.
  26. Lagrange P, Romero IA, Minn A, Revest PA. Transendothelial permeability changes induced by free radicals in an in vitro model of the blood-brain barrier. *Free Rad Biol Med* 1999; 27:667-672.

#### YAZIŞMAADRESİ

*Prof.Dr. Ruhi UYAR*  
*Osman Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AD.*  
*ESKİŞEHİR*

*Geliş Tarihi* : 03.11.2003  
*Kabul Tarihi* : 14.02.2005