

SIÇANLARDA KİMYASAL SİMPATEKTOMİNİN NÖROTOKSİK ETKİSİ

THE NEUROTOXIC EFFECT OF CHEMICAL SYMPATHECTOMY IN THE RAT

Ayşe TUÇ¹İbrahim TUĞLU²Altuğ YAVAŞOĞLU³Tuncay VAROL⁴

¹ Celal Bayar Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Manisa, TÜRKİYE

² Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Manisa, TÜRKİYE

³ Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir, TÜRKİYE

⁴ Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Manisa, TÜRKİYE

Anahtar sözcükler : kimyasal simpatektomi, guanethidine, sıçan, beyin, nörotoksosite, histoloji

Key Words : chemical sympathectomy, guanethidine, rat, brain, neurotoxicity, histology.

ÖZET

Amaç: Guanethidine bir antihipertansif ilaç olup, beyin damarlarında yapısal değişikliklere neden olabilen yan etkileri vardır. Deneysel çalışmalarda kimyasal simpatektomi yapmak için kullanılmaktadır. Her iki durumda da özellikle etki alanları dışında nörotoksik etkisi ile ilgili bilgi bulunmamaktadır. Bu nedenle nörotoksik etkiye en duyarlı beyin bölgelerinde, histolojik yöntemle guanethidine etkisinin araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Erişkin sıçanlarda intraperitoneal olarak 10 mg/kg guanethidine ve kontrol grubunda aynı volümde serum fizyolojik (SF) 30 gün süre ile tek doz uygulandı. Süre sonunda anestezi ile dekapite edilen denekler, kardiyak perfüzyon sonrasında beyinleri çıkartılarak parafine gömüldü. Histolojik kesitler ışık mikroskobu ile incelendi.

Bulgular: SF verilen grupta toksik etkiye duyarlı truncus cerebri, cerebellum, cortex cerebri ve hippocampus alanlarında hiçbir patolojik değişikliğe rastlanmazken, Guanethidine uygulanan grupta bazı alanlarda hücre çevresindeki boşlukların arttığı, nükleusların kondanse olduğu, piknosize benzer yapının oluştuğu gözlemlendi.

Sonuç: Guanethidine yan etkileri nedeniyle dikkatle kullanılması gereken bir ajan olarak klinikte ve olası nörotoksik etkisi nedeniyle de deneysel çalışmalarda sonuçların yorumlanmasında sorun oluşturabilecek potansiyele sahip gözükmektedir. Etki alanları dışında daha önce nörotoksik etkisi araştırılmamış bu maddenin, toksisitesi ile ilgili daha detaylı çalışmaların yapılması yararlı olacaktır.

SUMMARY

Objective: Guanethidine is an antihypertensive drug which can produce structural alterations on the vessels of the brain. It has also been used for the purpose of chemical sympathectomy in experimental studies. However there is little, if any, information on the neurotoxic effects of the drug except the regions where they exert their primary effects. Therefore we have conducted this study to histologically investigate the effects of guanethidine in regions most susceptible to neurotoxicity.

Material and Methods: Desympathization was induced in mature rats by daily single intraperitoneal injection of 10 mg/kg of guanethidine for 30 days. Same volume of saline was injected the same way to control animals. Rats were euthanized with cardiac perfusion and brains were removed to be fixed in formaline and embedded in paraffin. Serial sections were stained with H&E and examined under light microscope.

Yazışma adresi : Ayşe TUNÇ, Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Manisa

Makalenin geliş tarihi : 26.08.2005 ; kabul tarihi : 05.09.2005

Cell density was measured from selected vulnerable regions of the brain by morphometric methods. Findings: We found an increase in pericytoplasmic area, nuclear condensation and picnosis-like changes in guanethidine group. There were no clear pathologic alterations in the brain stem, cerebellum, cerebral cortex and hippocampus in the control group. Results and Conclusion: Guanethidine needs to be used with caution clinically due to its side effects and experimentally due to its possible neurotoxic effects which may confound interpretation of the findings. Further studies are required to uncover the neurotoxic effects of the drug.

GİRİŞ

Guanethidine sinirsel iletimde uyarıları kontrol ederek vazodilatasyon yapan bir antihipertansif ilaç olup, uzun süreli kullanıldığında kalp, böbrek ve beyin damarlarında yapısal değişikliklere neden olmakta ve inme benzeri durum oluşturabilmektedir (1, 2, 3). Lateral ventrikül yoluyla 6-hydroxydopamine (6-OHDA) uygulamasına bağlı simpatektomi ile beynin hippocampus, striatum ve septal bölgelerinde dopamine (DA), serotonin (5-HT) ve norepinephrine (NE) düzeylerinin değiştiği, nonspesifik toksik etki olabileceği düşünülmüştür (4). Ayrıca, 6-OHDA ile tirozin hidroksilazın cortex cerebri ve cerebellum'da azalması ve beyin sapında artması, guanethidine'de ise tüm bölgelerde artış görülmesi sonucu kimyasal simpatektomide beynin değişik bölgelerinin değişik şekillerde etkilendiği bulunmuştur (5, 6). Oluşan toksik etkilerin yaş ve kan beyin bariyerinin maturasyonu ile ilgili olduğu da düşünülmüştür (5). Ultrastüktürel düzeydeki incelemede nöronlardan bir kısmında yapısal bozukluklar gözlenmiştir (7). Daha önemli olarak periferik dolaşımdaki guanethidine'in nörotoksik etkisinin BOS-beyin bariyerinin olmadığı area postrema'da hücre azalmaya neden olduğu saptanmıştır (8). Bunların yanı sıra, yeni doğan sıçanlarda guanethidine'in kan beyin bariyerini geçebildiği ve sinir terminallerinde hasar oluşturabildiği düşünülmüştür (9). Bir başka çalışmada guanethidine'e bağlı olarak, ganglion cervicale superius'taki nöronlarda kromatoliz, nöron hasarı ve mononükleer inflamatuvar hücre sayısında artış saptanmıştır (10). Guanethidine ile yapılan simpatektomi sonrasında ganglion stellatum'da hücre sayısının azaldığı ve uzun süreli kullanımda akson büyümesinin gerçekleşemediği iddia edilmiştir (11).

Hippocampus'un CA1 bölgesindeki piramidal nöronlar ve cerebellum'un Purkinje hücrelerinin toksik etkiye duyarlı oldukları (12, 13, 14) ve oluşan etkilerin mononükleer hücre infiltrasyonu, reaktif astrositler, yaygın şekilde saptanmış makrofaj topluluğu, infiltrasyon alanlarında ödem, hücre membranında bozulma, gliosis, nükleusta degradasyon ya da kondansasyon gibi hücre ölümüne işaret edebilecek bulgular olduğu bilinmektedir (15, 16).

Guanethidine ile ilgili birçok fizyolojik ve biyokimyasal çalışma olmasına rağmen simpatektomik etkisinin dışında

nörotoksik etkisi ile ilgili veri bilinmemektedir. Oysaki bu tür bir sistemik ajanla ilgili çalışmaların değerlendirilmesinde, beynin diğer bölgeleri üzerindeki olası nörotoksik etkilerinin bilinmesi zorunludur. Bu nedenle, kimyasalların nörotoksik etkilerinin en çok görüldüğü beynin fonksiyonel bölgelerinde histolojik yöntemle guanethidine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

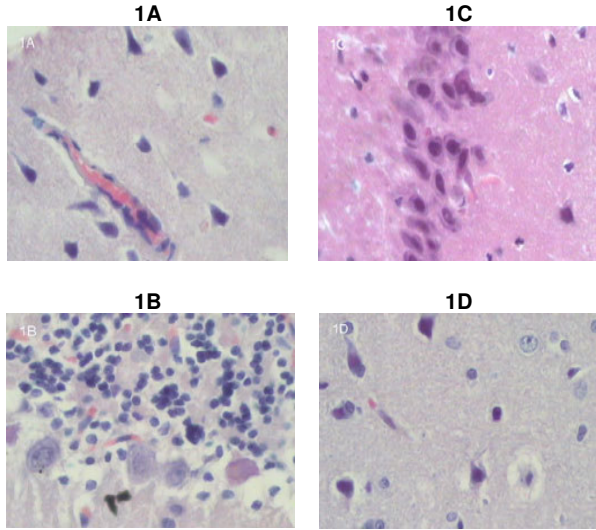
Bu çalışmada erişkin erkek Wistar albino sıçanlar (250±50 g) kullanıldı. Her grupta hem erkek hem dişi olmak üzere deney (n=10) grubunda intraperitoneal olarak 10 mg/kg Guanethidine ve kontrol (n=5) grubunda aynı volümde serum fizyolojik 30 gün süre ile tek doz uygulandı (17, 18, 19). Hayvanlar standart yem ve su ile beslendi. Deney hayvanlarına ketamin (90 mg/kg, Ketalar®, Parke Davis) + ksilazin (8 mg/kg, Alfazin®, Alfasan International B. V.) uygulanarak anestezi sağlandı. Anestezi altında intrakardiyak perfüzyonla, önce +4 C⁰'deki fosfat tamponlu tuz (PBS, pH 7.4) verildi ve sonra % 10 formaldehid ile fikse edildi. Beyin dokusu dikkatlice çıkartılarak, en az 24 saat % 10 formaldehidte tutuldu, parafine gömülerek kraniyalden kaudale doğru 5 µm kalınlıkta kesitleri alındı. Dokular ışık mikroskobu (Olympus BX40, Japan) ile incelenerek, görüntüler dijital video kamera (Olympus OIPM-CD35X, Japan) aracılığı ile bilgisayar ortamına alındı (20, 21, 22).

Morfometrik inceleme için hematoksilen-eosin boyaması yapılan parafin kesitlerden alınan mikroskopik görüntüler bilgisayar ortamına aktarıldı. Kör yöntemle, aynı büyütmelerde, karşılaştırılması mümkün belirli bölgelerde boyanmış nükleuslar üzerinden yapılan hücre sayımları, ortalama ± standart sapma olarak saptanıp, ANOVA yöntemi ile istatistiksel olarak değerlendirildi (23, 24, 25).

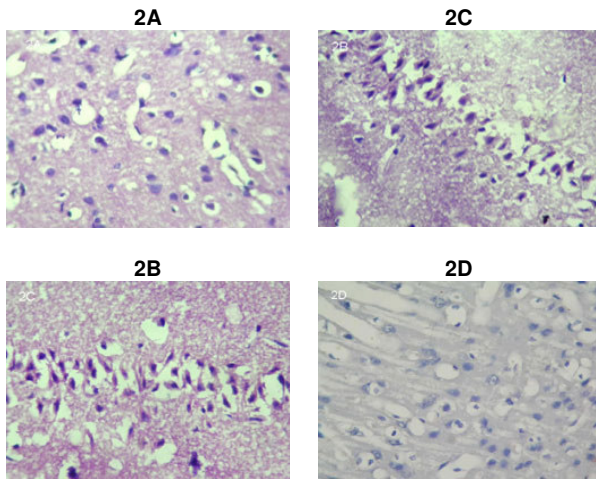
BULGULAR

SF uygulanmış kontrol grubuna ait beyinlerin koronal kesitlerinde, beyin sapında (Resim 1A), cortex cerebelli tabakalarında (Resim 1B), cortex cerebri'de (Resim 1C) ve hippocampus'taki nöron ve glialarda (Resim 1D) nükleus, membran ve genel morfolojinin normal olduğu izlendi. İncelenen alanların hiç birisinde nöron ve diğer hücrelerde belirgin eosinofili, mononükleer hücre infiltrasyonu, reaktif astrosit, eosinofilik granüller, yaygın şekilde saptanmış

makrofaj topluluğu, alanlarda ödem, myelin değişiklikleri, hücre membranında bozulma, nükleusta degradasyon veya kondansasyon gibi hücre toksisitesine veya ölümüne işaret edebilecek bulgulara rastlanmadı.



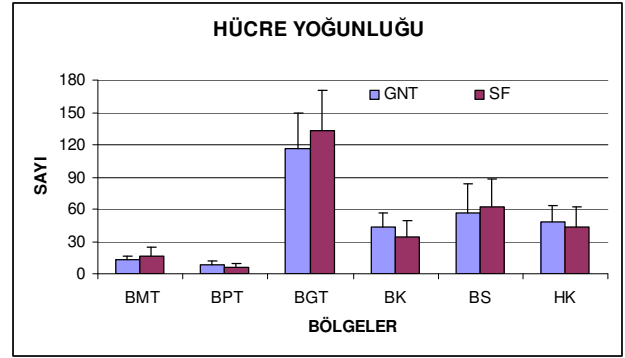
Resim 1. Erişkin sıçanda 30 gün İ.P. Guanethidine uygulamasından sonra alınan koronal beyin kesitlerinde beyin sapı (A), cortex cerebelli tabakaları (B), cortex cerebri (C) ve hippocampus (D) görüntülerinde nöral, glial, moleküler, granüler ve purkinje hücreleri nükleusları, membranları ve genel görünüşleri ile normal morfoloji izlendi. H&E, x100



Resim 2. Erişkin sıçanda 30 gün İ.P. SF uygulamasından sonra alınan koronal beyin kesitlerinde beyin sapı (A), cortex cerebelli tabakaları (B), cortex cerebri (C) ve hippocampus (D) görüntülerinde nöral, glial, moleküler, granüler ve purkinje hücreleri nükleusları, membranları ve genel görünüşleri ile normal morfoloji yanı sıra bazı alanlarda hücre çevresindeki alanda boşlukların arttığı, nükleus kondansasyonu ve piknosise benzer değişiklikler gözlemlendi. H&E, x100

Guanethidine verilen deneklerde 30 gün sonunda alınan koronal beyin kesitlerinin ışık mikroskopik görüntülerinde; beyin sapında (Resim 2A), cortex cerebelli tabakalarında (Resim 2B), cortex cerebri'de (Resim 2C) ve hippocampus'taki (Resim 2D) hücrelerin nükleusları, morfolojik olarak kontrol grubundakine benzer şekilde izlenirken, bazı alanlarda hücre çevresinde boşluk ve nükleusların kondansasyonları saptandı.

Histolojik değerlendirmede hücre çevresindeki boşlukların artmasına ve nükleuslarda kondansasyona bağlı hücre ölümünün varlığını göstermek amacı ile morfometri yapıldı. Hücrenin toksik etkiye en duyarlı olduğu alanlardan mikroskop görüntülerinin bilgisayar ortamında kör yöntemle sayımı sonucunda, cortex cerebri ve cortex cerebelli tabakaları ile beyin sapında sayısal olarak hücre yoğunluğunda anlamlı bir değişiklik olmadığı saptandı (Tablo 1).



Tablo 1. Toksik etkiden kaynaklanan hücre ölümüne bağlı olarak dansitede değişikliği göstermek için yapılan morfometrik sayımda beyin korteksi (BK), beyincik moleküler (BMT), purkinje (BPT) ve granüler (BGT) tabakaları, beyin sapı (BS) ile hippocampus'ta (HK) belirli bir alanda ve büyütmede yapılan körleme hücre sayımı sonucunda dansite açısından sonuçlar arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$).

TARTIŞMA

Bir ilacı nörotoksik olarak değerlendirebilmek için kimyasal madde kullanılan grup ile serum fizyolojik ya da, nörotoksitesine olmayan bir solüsyon ile karşılaştırma ileri moleküler tekniklerin yanı sıra hala toksisitenin bir göstergesi olarak kullanılmakta ve güvenli olduğu düşünülen birçok maddenin değişik yöntem ve uygulamalara bağlı olarak toksik hale gelebildiği bilinmektedir (26, 27, 28, 21, 29, 12, 30). Guanethidine antihipertansif özelliği ile klinikte kullanılan ancak kimyasal simpatektomi oluşturması nedeniyle deneysel çalışmalarda sıklıkla kullanılan bir ajan olup, hem bu çalışmalarda hem de klinik kullanımda nörotoksik olmadığı düşünülmektedir. Ancak, yapılmış çalışmalarda etki gösterdiği alanlarda hücre ölümüne neden olması, özellikle patolojik durumlarda etki etmediği

alanlarda da toksik etki yapma olasılığını akla getirmektedir. Bu çalışmada, Guanethidine'ne bağlı özellikle beynin duyarlı bölgelerinde (31) olası toksik etki histopatolojik inceleme ile araştırıldı. Toksik etki net bir şekilde görülmemesine rağmen, bu olasılığı destekleyecek histolojik bulgulara rastlanıldı.

Işık mikroskobu ile yapılan çalışmalarda beyne ilaç uygulamalarında intratekal olarak sadece salın solüsyonu infüze edilen deneklerde bile histopatolojik değişiklikler gözlenmiş, kronik spinal kanülasyonun subaraknoid aralıkta, kateter çevresinde fibrozis ve lenfosit infiltrasyonunu da içeren değişikliklere yol açtığı saptanmıştır (32). Çalışmamızda, intraperitoneal olarak uygulama sonrasında SF grubunda incelenen alanların hiç birinde mononükleer hücre infiltrasyonu, reaktif astrosit, yaygın şekilde saptanmış makrofaj topluluğu, ödem, hücre membranında bozulma, gliosis, nükleusta degradasyon veya kondansasyon gibi hücre toksisitesine işaret edebilecek bulgulara rastlanmadı. Ancak, Guanethidine uygulamasında sadece hücre çevresindeki boşlukların artması ve nükleus kondansasyonu gibi piknozis ya da karyoreksis gibi apoptotik hücre ölümünü düşündüren histopatolojik değişiklikler bulundu. Bu hücrelerde sitoplazmanın eosinofilisinin olmamasına, koyu boyanmamasına karşın nükleusları kondanse olmuş, piknozise benzer değişiklikler gösterdiği saptandı. Ancak, hasarın belirtisi olan nöronlardaki sitoplazmik kırmızılığın belirginleşmesi veya oluşan hasara bağlı debrisin temizlenmesi amacıyla ortama yayılmış makrofajlar bulunmadı. Toksik etkiye bağlı nekrosis tam olarak tanımlanamaması, bu histopatolojik değişikliklerin fiksasyon eksikliğine veya homojenizasyonun bozukluğuna bağlı teknik hata sonucu oluşan artifakt olasılığını kontrollerle karşılaştırıldığında az da olsa düşündürmektedir. Bu bulguların desteklenmesi amacı ile yapılan morfolojik incelemede hücrenin toksik etkiye en duyarlı olduğu cortex cerebri, cortex cerebelli, hippocampus ve beyin sapı gibi bölgelerde (16, 33), hücre yoğunluğunda anlamlı bir değişiklik olmadığı saptandı.

Toksik etkinin sinir sisteminde gösterdiği değişiklikler multifaktöriyel olup karmaşık bir süreçtir (34). Bu toksisitenin gösterilmesinde kalitatif ve kantitatif yöntemler

kullanılır. Histokimyasal ve immünohistokimyasal yöntemlerle toksisite değerlendirilebilir. Bunun yanı sıra beynin ağırlığı, morfolojik yöntemlerle hücre sayısı ve yoğunluğunun tespiti, toksisite hakkında bilgi verir (35, 36). Etkin bir toksik durum hücrenin nekroz ile ölmesine yol açarken, ılımlı toksik etki veya etkinin gecikerek ortaya çıkması programlanmış hücre intiharı (apoptozis) mekanizması ile hücrenin ölümüne neden olabilir. Deneysel çalışmalarda birçok metabolik, yöntemsel ve teknik faktörler sonuçları etkileyebilir (37, 38, 41). Deney hayvanının yaş ve kilosunun standardize edilmesi, hayvanların enfeksiyonsuz olması, deneyin yapılış metodu, maddenin veriliş yolu ve şekli, toksisitesi araştırılan ve kontrol maddelerinin ozmolaritesi, volümü, pH'ı, etki için bekleme süreleri, hayvanın öldürülme şekli, öldürüldükten sonra fiksasyonu, parafin işlemi ve kesit alınması gibi etkenler çok önemlidir (17, 24, 39, 40). Yapılan incelemeler sonucunda toksik etkiye bağlı patolojik bir değişikliğin saptanmamasına rağmen tam olarak toksik etkinin olmadığını söylemek zordur. Tersine bir şekilde de teknik hatalara bağlı patolojiyi düşündüren sonuçlar da alınabilir. Çalışmamızda toksik etkiye bağlı nekrosis tam olarak tanımlanamamış ve oluşan değişikliklerin ılımlı hasara bağlı apoptosis mekanizmasına işaret ettiği düşünülmüştür. Bunun ispatlanması için immünohistokimyasal yöntemle belirleme yapılması gerekir. Hücre intiharı bir mekanizma olarak kullanılıyorsa, elektron mikroskop çalışmaları ile organel düzeyinde, biyokimyasal ve moleküler biyoloji çalışmaları ile de protein düzeyinde değişikliklerin ve DNA-RNA yapısal ve fonksiyonel bozukluklarında ileri çalışmalarla araştırılması gerekir. Böylece hemen gerçekleşmeyen ancak daha sonra ortaya çıkabilecek ve çok düşük düzeyde oluşabilecek toksik etki değerlendirilebilir.

Çalışmamızdan çıkan sonuca göre, Guanethidine yan etkileri nedeniyle dikkatle kullanılması gereken bir ajan olarak klinikte ve olası nörotoksik etkisi nedeniyle de deneysel çalışmalarda sonuçların yorumlanmasında sorun oluşturabilecek potansiyele sahip gözükmektedir. Etki alanları dışında daha önce nörotoksik etkisi araştırılmamış bu maddenin toksisitesi ile ilgili daha detaylı çalışmaların yapılması yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Barres C, Julien C, Sassard J. Arterial pressure control in the sympathectomized rat. *Kidney Int Suppl* 1992;37:19-23.
2. Winqvist RJ, Webb RC, Bohr DF. Relaxation to transmural nerve stimulation and exogenously added norepinephrine in porcine cerebral vessels. A study utilizing cerebrovascular intrinsic tone. *Circ Res* 1982;51:769-76.
3. Nevzorova MN, Tiatenkova NN, Filimonov VI. Morphometric characteristics of microcirculatory bed of olfactory bulbs in the desympathized albino rat. *Morfologia* 2004;125:86-8.
4. Commins DL, Shaughnessy RA, Axt KJ, Vosmer G, Seiden LS. Variability among brain regions in the specificity of 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced lesions. *Neural Transm* 1989;77:197-210.

5. Pappas BA, Peters DA, Sobrian AK, Blouin A, Drew B. Early behavioral and catecholaminergic effects of 6-hydroxydopamine and guanethidine in the neonatal rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1975;3:681-5.
6. Schenk S, Horger BA, Peltier R, Shelton K. Supersensitivity to the reinforcing effects of cocaine following 6-hydroxydopamine lesions to the medial prefrontal cortex in rats. *Brain Res* 1991;543:227-35.
7. Heath J.W, Burnstock G. Selectivity of neuronal degeneration produced by chronic guanethidine treatment. *J. Neurocytol* 1977;6:397-405.
8. Newton BW, Melvin JE, Hamill RW. Central neurotoxic effects of guanethidine: altered serotonin and enkephalin neurons within the area postrema. *Brain Res* 1987; 404:151-61.
9. Nomura Y, Naitoh F, Segawa T. Regional changes in brain catecholamine content following administration of guanethidine to neonatal rats. *Jpn J Pharmacol* 1975;25:773-9.
10. Juul A, Juul P, Christensen HB, Guanethidine-induced sympathectomy in the nude rat. *Pharmacol Toxicol* 1989;64:20-2.
11. Borisov MM, Doronin PP, Zueva LV, Kulaev BS, Rodionov IM. Age changes in rat vasomotor reflexes and sympathetic neuron ultrastructure following chemical sympathectomy *Biull Eksp Biol Med* 1975;79:21-4.
12. Fix AS, Garman RH. Practical aspects of neuropathology: a technical guide for working with the nervous system. *Toxicol Pathol* 2000;28:122-131.
13. Nitatori T, Sato N, Waguri S, Karasawa Y, Araki H, Shibanaï K, Kominami E, Uchiyama Y. Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis. *J Neurosci* 1995;15: 1001-101.
14. Widdowson PS, Simpson MG, Wyatt I. L-2-chloropropionic acid-induced neurotoxicity in the rat: a valuable model for studying selective neuronal cell death in vivo. *Gen Pharmacol* 1997 Aug;29:113-9.
15. Macko RF, Ameriso SF, Barndt R, Clough W, Weiner JM, Fisher M. Precipitants of brain infarction: roles of preceding infection/inflammation and recent psychological stress. *Stroke* 1996;27: 1999–2004.
16. Guerri C. Neuroanatomical and neurophysiological mechanisms involved in central nervous system dysfunctions induced by prenatal alcohol exposure. *Alcohol Clin Exp Res* 1998;22:304-12.
17. Kohlhauser C, Kaehler S, Mosgoeller W, Singewald N, Kouvelas D, Prast H, Hoeger H, Lubec B. Histological changes and neurotransmitter levels three months following perinatal asphyxia in the rat. *Life Sci* 1999;64:2109-24.
18. Zochodne DW, Huang ZX, Ward KK, Low PA. Guanethidine-induced adrenergic sympathectomy augments endoneurial perfusion and lowers endoneurial microvascular resistance. *Brain Res* 1990;519:112-7.
19. Berecek KH, Work J, Mitchum TN, Ram S. Effects of chronic peripheral sympathectomy on plasma levels of, and the pressor response to, vasopressin. *J Hypertens* 1985;3:225-30.
20. Karibe H, Zarow GJ, Graham SH, Weinstein PR. Mild intranscemic hypothermia reduces postischemic hyperperfusion, delayed postischemic hypoperfusion, blood-brain barrier disruption, brain edema, and neuronal damage volume after temporary focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1994; 14: 620-627.
21. Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski HM. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* 1986 ;17: 1304-8.
22. Maier CM, Ahern KV, Cheng ML, Lee JE, Yenari MA, Steinberg GK. Optimal depth and duration of mild hypothermia in a focal model of transient cerebral ischemia: effects on neurologic outcome, infarct size, apoptosis, and inflammation. *Stroke* 1998; 29: 2171-2180 .
23. Duffell SJ, Soames AR, Gunby S. Morphometric analysis of the developing rat brain. *Toxicol Pathol* 2000; 28:157-163.
24. Sadowski M, Morys J, Berdel B, Maciejewska B. Influence of fixation and histological procedure on the morphometric parameters of neuronal cells. *Folia Morphol* 1995; 54:219-226 .
25. Lindstrom H, Luthman J, Oskarsson A, Sundberg J, Olson L. Effects of long-term treatment with methyl mercury on the developing rat brain. *Environ Res* 19910;56:158-69.
26. Yentür, E.A., Mirzai, I.T., Mirzai, H., Ateş, U. , Baka, M. ve Yurtseven, M.Repeated Epidural Injections of Ketamine with Preservative Benzethonium Chloride Produce Evidence for Neurotoxicity in Rabbits. *The Pain Clinic* 2003;15: 299-308.
27. Yaksh TL, Collins JG. Studies in animals should precede human use of spinally administered drugs. *Anesthesiology* 1989; 70: 4–6.
28. Coombs DW, Fratkin JD. Neurotoxicology of spinal agents. *Anesthesiology* 1987; 66:724-725.
29. Hall E, Oostveen J, Dunn E, Carter D. Increased amyloid protein precursor and apolipoprotein E immunoreactivity in the selectively vulnerable hippocampus following transient forebrain ischemia in gerbils. *Exp. Neurol* 1995;135: 17–27.

30. Balaban CD. Central neurotoxic effects of intraperitoneally administered 3-acetylpyridine, harmaline and niacinamide in Sprague-Dawley and Long-Evans rats: a critical review of central 3-acetylpyridine neurotoxicity. *Brain Res* 1985;356:21-42. *Toxicol Pathol* 2000;28(1):84-90 .
31. Welsh JP, Yuen G, Placantonakis DG, Vu TQ, Haiss F, O'Hearn E, Molliver ME, Aicher SA. Why do Purkinje cells die so easily after global brain ischemia? Aldolase C, EAAT4, and the cerebellar contribution to posthypoxic myoclonus. *Adv Neurol* 2002; 89: 331-59.
32. Fonnum F, Lock EA. The contributions of excitotoxicity, glutathione depletion and DNA repair in chemically induced injury to neurones: exemplified with toxic effects on cerebellar granule cells. *J Neurochem* 2004;88:513-31.
33. Bayer SA, Altman J, Russo RJ, Zhang X. Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. *Neurotoxicology* 1993;14:83-144.
34. Rice DC, Barone S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect* 2000;108:511-533.
35. Hossmann KA. Experimental principles of tolerance of the brain to ischemia. *Z Kardiol* 1987; 76: 47-66.
36. Mink, J.W., Blumenschine, R.J. and Adams, D.B. Ratio of central nervous system to body metabolism in vertebrates: its constancy and functional basis. *Am. J. Physiology* 1981; 241:203-212 .
37. Culver B, Inzana K, Jones J, et al. Technique and complications attributable to, repeated hyperosmotic blood-brain barrier disruption in dogs. *Am J Vet Res* 1998; 59:1503-1510.
38. Muller M, Ballanyi K. Dynamic recording of cell death in the in vitro dorsal vagal nucleus of rats in response to metabolic arrest. *J Neurophysiol* 2003;89:551-61.
39. Jacobson M. The germinal cell, histogenesis, and lineages of nerve cells. *Developmental Neurobiology*, 3rd edition (Jacobson M, ed). New York: Plenum Press 1991;41-93.
40. De Groot DM, Hartgring S, van de Horst L, Moerkens M, Otto M, Bos-Kuijpers MH, Kaufmann WS, Lammers JH, O'callaghan JP, Waalkens-Berendsen ID, Pakkenberg B, Gundersen HG. 2D and 3D assessment of neuropathology in rat brain after prenatal exposure to methylazoxymethanol, a model for developmental neurotoxicity. *Reprod Toxicol* 2005; 20:417-32.
41. Kohlhauser C, Kaehler S, Mosgoeller W, Singewald N, Kouvelas D, Prast H, Hoeger H, Lubec B. Histological changes and neurotransmitter levels three months following perinatal asphyxia in the rat. *Life Sci* 1999; 64:2109-24.