

Diabetik Hasta Serumunun Sıçanda Schwann Hücre Canlılığı Üzerine İn Vitro Etkisi

THE EFFECT OF DIABETIC PATIENT SERUM ON RAT SCHWANN CELL VIABILITY IN VITRO

Doğan ÖZYURT¹, Kemal Kürşad GENÇ², Şermin GENÇ³, Işıl TEKME¹, Ülker SÖNMEZ¹, Oğuz ALTUNGÖZ³, Abdurrahman ÇÖMLEKÇİ⁴

¹Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı

²Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Öğrenme Kaynakları Merkezi Araştırma Laboratuvarı

³Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

⁴Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı

ÖZET

Amaç: Schwann hücresi (SH) periferik sinirlerde aksonların miyelin kılıfının yapımını sağlayarak sinir fonksiyonunu destekleyen glial hücredir. Diabetik nöropatide SH kaybı ya da hasarı gözlenmektedir. Daha önceki çalışmalar diabetik hasta serumunun arka kök ganglion nöron kültüründe hücre ölümüne yol açtığını göstermiştir. Diabetik hasta serumunun SH üzerine benzer bir etkisinin olup olmadığını araştırmak amacıyla bu çalışmada diabetik hasta serumunun in vitro sıçan SH canlılığı üzerine etkisi değerlendirilmiştir.

Gereç ve yöntem: Bu çalışmada sıçan siyatik sinirinden hazırlanan SH kültürlerine diabetik hasta serumu ve normal kontrol serumu ısıyla inaktivasyon sonrası değişik oranlarda eklendi. Hücre canlılığının değerlendirilmesinde 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) testi kullanıldı.

Bulgular: Normoglisemik kontrol kültürleriyle karşılaştırıldığında diabetik hasta serumu eklenen SH kültürlerinde hücre canlılığının istatistiksel olarak anlamlı fark göstermediği saptandı.

Sonuç: Bu sonuçlar ısıyla inaktive edilmiş diabetik hasta serumunun sıçan SH kültürleri üzerine anlamlı bir toksisitesinin olmadığını göstermektedir.

Anahtar sözcükler: Schwann hücresi, diabetes mellitus, sıçan, siyatik sinir, MTT, hiperglisemi

SUMMARY

Objective: Schwann cells (SCs) are glial cells which are responsible for the myelin production and supporting nerve function in peripheral nerve system. SC loss or injury occur in diabetic neuropathy. Recent studies have reported that diabetic patients serum leads cell death in dorsal root ganglion neuron culture. To evaluate whether diabetic patient serum has similar effect on SC viability, the effect of patient serum on SC viability has been determined in SC cultures.

Material and method: In the present study, diabetic patient serum and normal control serum were added to SC cultures that were prepared from rat sciatic nerve. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) test was used to evaluate cell viability.

Results: It was found that diabetic patient serum did not induce significantly cell death in SC cultures as compared with control cultures.

Conclusion: The results of the present study show that diabetic patient serum does not result significant cytotoxicity in rat SC cultures.

Key words: Schwann cell, diabetes mellitus, rat, sciatic nerve, MTT, hyperglycemia

Doğan ÖZYURT

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Histoloji-Embriyoloji AD

35340 Inciraltı, İZMİR

Tel: (232) 4124552

e-posta: dogan.ozyurt@deu.edu.tr

Diabetik nöropati diabetes mellitusun (DM) sık görülen bir komplikasyonudur (1,2). Tip 1 ve tip 2 DM hastalarında bir serum faktörünün ya da faktörlerinin diabetik nöropati patogeneğinde rol oynadığını düşündüren bulgular bildirilmiştir. Nöropatisi olan tip 1 DM hastalarının serumları nöroblastoma hücre hattı kültürlerine eklendiğinde apoptotik hücre ölümünü indüklemektedir (3-6). Nöropatisi olan tip 2 DM hasta serumlarının da apoptotik nöronal hücre ölümünü indüklediği saptanmıştır (7). Ancak bugüne kadar diabetik hasta serumunun Schwann hücre (SH) canlılığı üzerine etkisinin olup olmadığı henüz tam olarak aydınlatılmamıştır.

SH, periferik sinir sisteminde miyelin yapımından sorumludur (8-10). SH, miyelin yapımına ek olarak aksonların çevresindeki iyon konsantrasyonlarını regüle etmekte ve sinir hücrelerine trofik destek sağlamaktadır. Diabetik nöropatide nöronal hasar ve ölüm yanısıra SH kaybı ve disfonksiyonu da olduğunu düşündüren bulgular bildirilmiştir (4). Bu bulgular diabetik nöropati patogeneğinde SH'nin de etkilendiğini düşündürmektedir. Fakat diabetik nöropatide SH etkilenmesinin mekanizmaları henüz bilinmemektedir. Nöronları etkileyen hipoksi, iskemi, oksidatif stres gibi sorumlu tutulan faktörler SH'yi de etkiliyor olabilir. Ayrıca diabetik hasta serumunun in vitro nöron ölümüne yol açması serum faktörlerinin de sorumlu olabileceğini düşündürmektedir. Fakat diabetik hasta serumunun SH canlılığı üzerine etkisi henüz tam araştırılmamış bir konudur.

Omurgalı sinir sisteminde çok sayıda farklı nöron ve glia tipi bulunmaktadır. Merkezi sinir sisteminde bulunan glial hücreler astroglia, oligodendroglia ve mikroglia'dır. Oligodendrositlerin (OL) rolü miyelin kılıfının yapımı ve yapısının sürdürülmesidir (11). Lipidden zengin yapısıyla miyelin kılıfı sinir impulslarının aksonlar boyunca etkin ve hızlı iletimini sağlamaktadır. Periferik sinir sisteminde OL'in görevini SH üstlenmektedir. Merkezi sinir sistemindeki aksine periferik sinir sisteminde bir SH, bir aksonun miyelin kılıfının yapımına katılmaktadır.

SH, sinirin normal fonksiyon görmesi için anahtar bir rol oynamaktadır. SH, aksonların yalıtılmasıyla aksiyon potansiyeli hızının korunmasından, akson çapı-

nun normal sürdürülmesinden, sodyum kanallarının doğru lokalizasyonundan, perinöral kan-sinir bariyeri boyunca sinirin immünolojik ve fonksiyonel bütünlüğünden ve etkin sinir rejenerasyonundan sorumludur. Periferik sinir sisteminin inflamasyon, otoimmünite, genetik, metabolik gibi değişik etiyolojili hastalıklarında SH hasara uğramaktadır. SH kültürü, hem normal SH fonksiyonunun, hem de primer patolojinin SH disfonksiyonu olduğu hastalıkların mekanizmalarının araştırılmasını kolaylaştıran in vitro bir araştırma yöntemidir (10). In vitro kültür ortamında SH, akson teması olmadan uzun süre canlı kalabilmektedir. SH kültürü herhangi bir periferik sinirden kurulabilmektedir ve laboratuvar hayvanlarında en sık olarak sıyatik sinir ve brakial pleksus gibi büyük sinirler kullanılmaktadır. Erişkin insandan biyopsi ile alınan sinir örneklerinden ve fetal sinirlerden de SH kültürü hazırlanabilmektedir (10).

DM hastalarının sinir biyopsisi örnekleriyle yapılan in situ çalışmalarda ve deneysel hayvan çalışmalarında diabetik nöropati patogeneğinde SH disfonksiyonunun da rolü olduğunu düşündüren bulgular elde edilmiştir. Streptozotosin (STZ) ile indüklenen diabet modelinin oluşturulduğu sıçanların sakküler ve utriküler sinirlerinde elektron mikroskopik incelemeyle miyelin kılıfı anormallikleri saptanmıştır (12). Spontan diabet olan kedilerin periferik sinir biyopsi örneklerinde miyelin kılıfı anormallikleri ve reaktif, dejeneratif ve proliferatif SH değişiklikleri bildirilmiştir (13-15).

Diabetik nöropatili hastaların sinir biyopsi örneklerinin incelenmesinde demiyelinizasyon göze çarpan bir özelliktir. Ancak bu demiyelinizasyonun mekanizması bilinmemektedir. Çünkü diabetik kemirgenlerde insandakinin aksine sabit bir segmental demiyelinizasyon gelişmemektedir (16). Bu nedenle sıçanlarda galaktoz içeren diet uygulamasıyla oluşturulan deneysel galaktoz nöropatisi modeli sık olarak kullanılmaktadır (17). Deneysel galaktoz nöropatisi çalışmalarında ve diabetik nöropatili tip 2 DM olan hastalarla yapılan çalışmalarda reaktif, dejeneratif ve proliferatif SH yanıtları saptanmıştır (18). Deneysel galaktoz nöropatisinde hastalığın 1. haftası kadar erken bir dönemde elektron mikroskopisiyle reaktif ve dejeneratif SH değişiklikleri saptanmıştır ve aldoz redüktaz inhibitörü tedavisiyle bu değişikliklerin azaldığı bildirilmiştir (19). Diabetik

siçanlarda aldoz redüktaz inhibitörleriyle tedavinin sinir ileti hızını düzeltici etkisinin SH fonksiyonu üzerine etkisiyle olması olasıdır (2). Bir aldoz redüktaz inhibitörü olan epalrestat ile tedavi STZ ile indüklenen diabetik nöropatide azalmış olan sinir büyüme faktörü düzeyini ve in vitro SH kültüründe bu faktörün üretimini artırmaktadır (20). Polyol metabolizmasıyla bağlantılı bir hastalık modeli olan deneysel galaktoz nöropatisinde SH hasarı ve demiyelinizasyon bulunmaktadır. Çünkü polyol yolunun anabolik enzimi olan aldoz redüktaz SH'ne lokalizedir (21,22). Aldoz redüktaz ekspresyonu farklılaşmış ya da olgun SH'nin bir fonksiyonu olup bu enzimin SH'de volüm regülatörü rolü oynayabileceği düşünülmektedir. (22,23).

Yukarıda aktarılan literatür bilgileri diabetik nöropatide SH disfonksiyonunun rolü olabileceğini düşündürmektedir. Ancak SH patolojisinin mekanizmaları bilinmemektedir. Diabetik nöropatide hipoksi, hiperglisemi, ve oksidatif stress artışı doğrudan ya da dolaylı olarak SH disfonksiyonuna katkıda bulunmaktadır. Çalışmalar, diabetik nöropatide paranodal bariyer fonksiyonunun bozulduğunu, miyelin hasarı olduğunu, antioksidatif kapasitenin ve aksonlar için nörotrofik desteğin azaldığını göstermiştir (24,25).

Klinik çalışmalar diabetik nöropatinin şiddetinin kan glukoz düzeyi ile korele olduğunu göstermiştir. Hem STZ uygulanmış diabetik siçanlarda, hem de glukoz infüzyonuyla akut olarak hiperglisemi oluşturulan siçanlarda arka kök ganglion nöronlarında ve SH'de apoptotik değişiklikler saptanmıştır. In vitro arka kök ganglion nöron kültürlerinde hiperglisemi apoptotik hücre ölümünü indüklemektedir (26,27). Ancak bugüne kadar diabetik hasta serumunun Schwann hücre (SH) canlılığı üzerine etkisinin olup olmadığı henüz aydınlatılmamıştır.

Bu çalışmada, 3 - (4,5 - dimethylthiazol - 2 - yl) - 2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) testi kullanılarak, ısıyla inaktive edilmiş diabetik hasta serumunun siçan sıyatik sinirinden hazırlanan SH kültüründe hücre canlılığı üzerine etkisinin bulunup bulunmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmada erişkin siçan sıyatik sinirinden kurulan SH kültürleri kullanıldı. Bu amaçla eter anestezisi

altında ve steril koşullarda çıkarılan erişkin siçan sıyatik sinirleri kullanıldı. Sinir dokusu kas ve yağ dokusundan temizlendikten sonra kollajenaz enzimi içeren kültür ortamı içinde enzimatik dissosiasyona tabi tutuldu ve bu sırada mekanik dissosiasyon da uygulandı. Yaklaşık iki saatlik enkübasyon süresinin sonunda santrifüj ile hücre süspansiyonu elde edildi ve kültür flasklarına ekim yapıldı. 24 saat sonra kültür ortamlarına 10^{-5} M konsantrasyonda sitozin arabinozid eklendi ve 72 saatlik enkübasyon uygulandı.

In vitro deneyler için SH hücreleri 96 kuyucuklu kültür plaklarına %2 fetal inek serumu içeren kültür ortamı içinde ve 100 000 hücre/kuyucuk/ 200 µl ortam yoğunlukta ekildi. Ekimin ertesini günü kültürlere %1-10 arasında değişen oranlarda ve ısıyla inaktive edilmiş diabetik hasta serumu ya da kontrol insan serumu eklendi. Bütün deneylerde her ayrı kültür koşulu için en az üç eş örnek (triplicate) kullanıldı. Kültürler 24 saat süreyle enkübe edildikten sonra MTT testi ile hücre canlılığı değerlendirildi (28).

MTT yöntemiyle bir hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kolorimetrik yöntemle kantitatif olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem sağlam hücrelerde mitokondrinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Bu reaksiyon fragil bir mitokondrial enzim olan süksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağlıdır. Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır. Bu yöntem hücrelerin MTT boyasıyla enkübasyonu, presipite reaksiyon ürününün solubilize edilmesi ve reaksiyon ürününün kolorimetrik olarak ölçümü basamaklarından oluşmaktadır (29-31).

Uygulama sonrasında elde edilen kültür plağı DEÜTF Hematoloji laboratuvarında bulunan ELISA plak okuyucusuna konularak absorban değerleri 595 nm dalga boyunda okutuldu. Referans dalga boyu olarak 650 nm dalga boyu kullanıldı. Herhangi bir ajan eklenmeyen kontrol kültürlerinden elde edilen absorban değerlerinin aritmetik ortalaması % 100 olarak

kabul edildi. Serum eklenen kültür koşullarından elde edilen absorbans değerlerinin herbiri ortalama kontrol absorbans değerine oranlandı ve bu değer in yüzdesi olarak gösterildi.

SH kültürlerinin fenotipik özelliğini doğrulamak amacıyla anti-S100 monoklonal antikoruyla (sekonder antikor) immünfloresan boyama yapıldı (32,33).

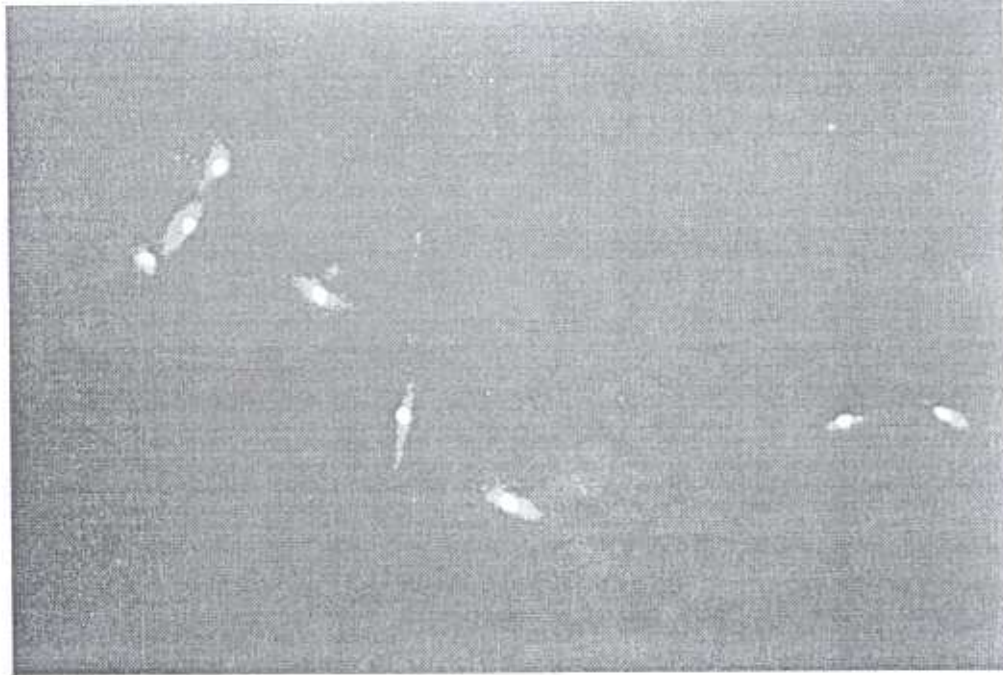
Bu çalışmada verilerin istatistik analizi için SPSS programı (version 8.0) kullanıldı. İstatistik analizde değişik kültür koşullarında saptanan hücre canlılığı oranı parametre olarak seçildi. Grupların ortalama değerleri Students' t testiyle karşılaştırıldı. 0,05'ten küçük p değerleri anlamlı kabul edildi. Sonuçlar aritmetik ortalamaya \pm standart hata biçiminde verildi.

BULGULAR

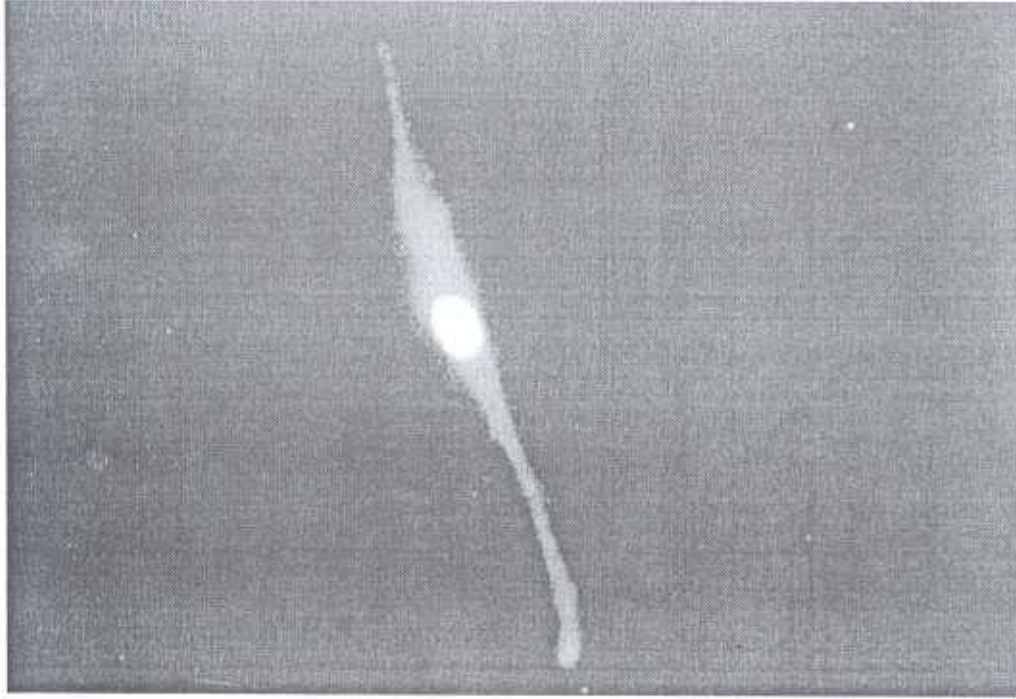
Bu çalışmada SH kültürünün saflığı bu hücrelere

şpecifik bir marker olan S100 proteinine yönelik immünfloresan boyamayla doğrulandı. Şekil 1 ve 2'de anti-S100 boyamasıyla pozitif boyanan sıçan SH örnekleri gösterilmiştir.

Diabetik hasta serumunun SH canlılığı üzerine etkisinin araştırılması amacıyla MTT testi kullanıldı. MTT testinin sonuçlarına göre 24 saatlik enkübasyon süresinin sonunda değişik konsantrasyonlarda diabetik hasta serumu hücre canlılığı üzerine anlamlı inhibitör etki göstermemektedir. Bazal (serum eklenmeyen) kültür koşullarında elde edilen ortalama absorbans değerleri %100 kabul edildiğinde %1, %5 ve %10 oranında diabetik hasta serumu eklenmesiyle elde edilen ortalama hücre canlılığı değerleri sırasıyla $86,5 \pm 4,6$, $87,9 \pm 7,1$ ve $84,8 \pm 4,3$ bulundu. Kontrol değerleriyle karşılaştırıldığında bu değerler anlamlı istatistik farklılık göstermemektedir ($p > 0,05$).



Şekil 1. SH kültüründe anti-S100 boyamasına ait bir örnek görülmektedir. Boyama için sekonder antikor olarak TR konjuge anti-fare IgG antikorunu kullanılmıştır (20 X).



Şekil 2. SH kültüründe anti-S100 boyamasına ait bir örnek görülmektedir. Boyama için sekonder antikor olarak TR konjuge anti-fare IgG antikorunu kullanılmıştır (100 X).

TARTIŞMA

Bu çalışmada anti-S100 IF boyamasıyla gösterildiği gibi primer SH kültürlerinin saflığı deneyler süresince %95'den aşağı düşmemiştir. Primer SH kültürlerinin saflığı içerebilecekleri diğer glial ve nöronal hücrelerin ve fibroblastların sitotoksikite deneylerinin sonuçlarını etkileyebilmesi açısından önemlidir (34).

DeneySEL diabet modellerinde ve in vitro SH kültürlerinde hipergliseminin apoptotik nöron ve SH ölümüne yol açtığı gösterilmiştir. DeneySEL hayvan modelleri ve insan sural sinir biyopsi örneklerinde yapılan çalışmalar diabetik nöropatiye oksidatif stresin, mitokondrial membran depolarizasyonunun ve apoptotik hücre ölümünün eşlik ettiğini göstermektedir. STZ ile oluşturulan deneySEL diabet modelinde arka kök ganglion nöronlarında ve SH'de apoptotik değişiklikler saptanmıştır. SH-SY5Y insan nöronal hücre hattı, sıçan sensoriyel nöron ve sıçan SH kültürlerinde 20 mM gibi yüksek glukoz konsantrasyonları reaktif oksijen ürünlerinin üretimini artırmaktadır. Oksidatif

stress artışına mitokondrial membran hiperpolarizasyonu ve ardından depolarizasyonu eşlik etmektedir. Sinir büyüme faktörü gibi growth faktörler bu fonksiyon bozukluklarını önlemekte ve apoptotik hücre ölümünü baskılamaktadır. Bu bulgular DM'da gözlenen hiperglisemik koşullara oksidatif stresin indüklediği nöron ve SH ölümünün eşlik ettiğini düşündürmektedir (25).

STZ uygulanan sıçanlarda arka kök ganglionlarının elektron mikroskopik incelemesi SH'de apoptotik değişikliklerin varlığını göstermektedir. Hiperglisemik serumsuz kültür ortamında bisbenzamid boyamasıyla SH'de nükleer vakuolizasyon gibi apoptotik değişiklikler saptanmıştır (11). Yüksek glukoz konsantrasyonu SH kültüründe kaspaz parçalanmasına yol açmakta ve kaspaz inhibitörü bok-asp-fmk kaspaz aktivasyonunu önlemektedir. In vivo ve in vitro deneySEL koşullarda Bcl-xL ekspresyonu değişmeden kalmaktaysa da kültürde SH'de Bcl-xL proteininin ekspresyon artışı hiperglisemiyle indüklenen SH apopto-

rozunu önlemektedir. Sonuç olarak hiperglisemi in vivo ve in vitro SH'de apoptotik ölümle uyumlu kaspaz aktivasyonunu ve morfolojik değişiklikleri indüklemektedir (11).

Klinik çalışmalar diabetik nöropatinin şiddetinin kan glukoz düzeyi ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Hem STZ uygulanmış diabetik sıçanlarda, hem de glukoz infüzyonuyla akut olarak hiperglisemi oluşturulan sıçanlarda arka kök ganglion nöronlarında ve SH'de apoptotik değişiklikler saptanmıştır. İn vitro arka kök ganglion nöron kültürlerinde hiperglisemi apoptotik hücre ölümünü indüklemektedir (26).

Tip 1 ve tip 2 DM hastalarında bir serum faktörünün ya da faktörlerinin diabetik nöropati patogenezinde rol oynadığını düşündüren bulgular bildirilmiştir. Nöropatisi olan tip 1 DM hastalarının serumları nöroblastoma hücre hattı kültürlerine eklendiğinde apoptotik hücre ölümünü indüklemektedir (3-6). Nöropatisi olan tip 2 DM hasta serumlarının da apoptotik nöronal hücre ölümünü indüklediği saptanmıştır (7). Ancak bugüne kadar diabetik hasta serumunun Schwann hücre (SH) canlılığını etkileyip etkilemediği henüz aydınlatılmamıştır.

Bu çalışmada diabetik hasta serumunun in vitro SH canlılığı üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Diabetik hasta serumunun değişik konsantrasyonlarının erişkin kemirgen SH kültüründe hücre canlılığı üzerine herhangi bir etkisi MTT hücre canlılığı testiyle saptanamamıştır. Fakat bu çalışmada diabetik hasta serumu diabetik nöropatisi olmayan hastalardan sağlanmıştır. Nöron kültürü çalışmalarında gösterildiği gibi, yalnızca diabetik nöropatisi olan hastaların serumlarının SH kültüründe hücre canlılığını etkileyebileceği olasılığının araştırılması gerekmektedir. Bir başka olasılık ise erişkin ve yenidoğan SH kültürlerinin diabetik hasta serumuna yanıtının farklı olabileceğidir.

Sonuç olarak bu çalışmada erişkin sıçan sıyatik sinirinden kurulan SH kültürlerinde diabetik hasta serumunun hücre canlılığını azaltıcı bir etkisi bu kültür sisteminde saptanamamıştır.

TEŞEKKÜRLER: Bu çalışma 2000-2002 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı'nca desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Greene DA, Sima AA, Stevens MJ, Feldman EL, Lattimer SA. Complications, neuropathy, pathogenetic considerations. *Diabetes Care* 1992;15:1902-1925.
2. Tomlinson DR. Future prevention and treatment of diabetic neuropathy. *Diabetes Metab* 1998;24:79-83.
3. Pittenger GL, Liu D, Vinik AI. The toxic effects of serum from patients with type I diabetes mellitus on mouse neuroblastoma cells: a new mechanism for development of diabetic autonomic neuropathy. *Diabet Med* 1993;10:925-932.
4. Vinik AI, Erbas T, Stansberry KB, Pittenger GL. Small fiber neuropathy and neurovascular disturbances in diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2001; 109: 451-473.
5. Pittenger GL, Liu D, Vinik AI. The neuronal toxic factor in serum of type 1 diabetic patients is a complement-fixing autoantibody. *Diabet Med* 1995; 12: 380-386.
6. Pittenger GL, Liu D, Vinik AI. The apoptotic death of neuroblastoma cells caused by serum from patients with insulin-dependent diabetes and neuropathy may be Fas-mediated. *J Neuroimmunol* 1997; 76: 153-160.
7. Srinivasan S, Stevens MJ, Sheng H, Hall KE, Wiley JW. Serum from patients with type 2 diabetes with neuropathy induces complement-independent, calcium-dependent apoptosis in cultured neuronal cells. *J Clin Invest* 1998; 102: 1454-1462.
8. Mirsky R, Jessen KR. The neurobiology of Schwann cells. *Brain Pathol* 1999; 9: 293-311.
9. Mirsky R, Jessen KR, Brennan A et al. Schwann cells as regulators of nerve development. *J Physiol Paris* 2002; 96:17-24.
10. Morgan L. Schwann cell culture. In 'Neural Cell Culture. A Practical Approach' J. Cohen, G.P. Wilkin eds. Oxford: Oxford University Press, 1995; 221-239.
11. Delaney CL, Russell JW, Cheng HL, Feldman EL. Insulin-like growth factor-I and over-expression of Bcl-xL prevent glucose-mediated apoptosis in Schwann cells. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; 60: 147-160.
12. Myers SF. Myelin-sheath abnormalities in the vestibular nerves of chronically diabetic rats. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;119:432-438.
13. Mizisin AP, Shelton GD, Wagner S, Rusbridge C, Powell HC. Myelin splitting, Schwann cell injury and

- demyelination in feline diabetic neuropathy. *Acta Neuropathol* 1998;95:171-174.
14. Mizisin AP, Shelton GD, Burgers ML, Powell HC, Cuddon PA. Neurological complications associated with spontaneously occurring feline diabetes mellitus. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002;61: 872-884.
 15. Mizisin AP. Comparative neuropathology and diabetic autonomic neuropathy. *Am J Pathol* 2003; 163: 1703-1706.
 16. Jaffey PB, Gelman BB. Increased vulnerability to demyelination in streptozotocin treated diabetic rats. *J Comp Neurol* 1996; 373: 55-61.
 17. Sima AF, Sugimoto K. Experimental diabetic neuropathy: an update. *Diabetologia* 1999; 42: 773-788.
 18. Kalichman MW, Powell HC, Mizisin AP. Reactive, degenerative, and proliferative Schwann cell responses in experimental galactose and human diabetic neuropathy. *Acta Neuropathol* 1998; 95: 47-56.
 19. Mizisin AP, Powell HC. Schwann cell changes induced as early as one week after galactose intoxication. *Acta Neuropathol (Berl)* 1997; 93: 611-618.
 20. Ohri T, Saita K, Furukawa S et al. Therapeutic effects of aldose reductase inhibitor on experimental diabetic neuropathy through synthesis/secretion of nerve growth factor. *Exp Neurol* 1998;151:215-220.
 21. Forcier NJ, Mizisin AP, Rimmer MA, Powell HC. Cellular pathology of the nerve microenvironment in galactose intoxication. *J Neuroapthol Exp Neurol* 1991; 50: 235-255.
 22. Mizisin AP, Powell HC. Schwann cell injury is attenuated by aldose reductase inhibition in galactose intoxication. *J Neuropathol Exp Neurol* 1993; 52: 78-86.
 23. Wong E, Mizisin AP, Garrett RS, Miller AL, Powell HC. Changes in aldose reductase after crush injury of normal rat sciatic nerve. *J Neurochem* 1992; 58: 2212-2220.
 24. Eickersley L. Role of the Schwann cell in diabetic neuropathy. *Int Rev Neurobiol* 2002; 50: 293-321.
 25. Vincent AM, Brownlee M, Russell JW. Oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 959: 368-383.
 26. Russell JW, Sullivan KA, Windebank AJ, Herrmann DN, Feldman EL. Neurons undergo apoptosis in animal and cell culture models of diabetes. *Neurobiol Dis* 1999; 6: 347-363.
 27. Vincent AM, Brownlee M, Russell JW. Oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 959: 368-383.
 28. Delaney CL, Russell JW, Cheng HL et al. Insulin-like growth factor-I and over-expression of Bcl-xL prevent glucose-mediated apoptosis in Schwann cells. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001;60:147-160.
 29. McGahon AJ, Martin SJ, Bissonnette RP et al. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis *in vitro*. In "Methods in Cell Biology, Vol 46, Cell Death", LM Schwartz and BA Osborne eds. San Diego: Academic Press, 1995; 150-181.
 30. Ying HS, Gotttron FJ, Choi DW. Assessment of cell viability in primary neuronal cultures. *Current Protocols in Neuroscience* 2000;7.18.1-7.18.17.
 31. Genç K, Genç S, Kizildag S et al. Methamphetamine induces oligodendroglial cell death in vitro. *Brain Research* 2003; 982: 125-130.
 32. Genç S, Genç K, Kumral A, Baskin H, Ozkan H. Bilirubin is cytotoxic to rat oligodendrocytes in vitro. *Brain Res* 2003; 985: 135-141.
 33. Barnstable CJ. Identification of cell types in neural cultures. In "Practical Cell Culture Techniques" AA Boulton, GB Baker, W Walz eds., New Jersey: Totowa: Humana Press, 1992; 21-63.
 34. Barnstable CJ. Identification of cell types in neural cultures. In "Practical Cell Culture Techniques" AA Boulton, GB Baker, W Walz eds. New Jersey: Totowa: Humana Press, 1992; 21-63.