

# Primer Oligodendrosit Kültüründe Metamfetamine Bağlı Hücre Ölümü

CELL DEATH DUE TO METHAMPHETAMINE IN PRIMARY OLIGODENDROCYTE CULTURE

Kürşad GENÇ\*, Şermin GENÇ\*\*, Ülker SÖNMEZ\*\*\*, Osman YILMAZ\*\*\*\*, Ataç SÖNMEZ\*, Kazım TUĞYAN\*\*\*, Bekir ERGÜR\*\*\*, Zişan BULDAN\*\*\*

*Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı\**

*Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı\*\**

*Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı\*\*\**

*Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Multidisipliner Laboratuvarları\*\*\*\**

## ÖZET

**Amaç:** Psikostimulan bir ilaç olan metamfetaminin nörotoksik etkisi in vitro ve in vivo çalışmalarla kanıtlanmıştır. Bu çalışmada ise metamfetaminin yenidoğan Wistar sıçan oligodendrosit kültürlerinde sitotoksik etkisi araştırıldı.

**Gereç ve Yöntem:** Metamfetaminin sitotoksik etkisi laktat dehidrogenaz (LDH) testiyle, apoptoz indükleyici etkisi ise apostain immunofloresan boyama yöntemiyle araştırıldı. Bu amaçla kültürler değişen konsantrasyonlarda (10-1000 µM arası) ve değişik inkübasyon sürelerinde (24-96 saat arası) metamfetamine maruz bırakıldı.

**Bulgular:** LDH ölçümleri metamfetaminin doza ve zamana bağımlı olarak oligodendrosit ölümüne yol açtığını göstermektedir. Apostain yöntemi ise metamfetaminin düşük (10 µM) ve yüksek (1000 µM) dozlarda daha belirgin apoptoza neden olduğunu işaret etmektedir.

**Sonuç:** Bu sonuçlar kronik metamfetamin kullanıcılarında gözlenen nörotoksik etkilerin kısmen bu maddenin oligodendrositler üzerine toksik etkisine de bağlı olabileceğini düşündürmektedir.

**Anahtar sözcükler :** Metamfetamin, oligodendrosit, apoptoz, sıçan, apostain

## SUMMARY

**Objective:** The neurotoxic effect of methamphetamine which is a psychostimulant drug has been established by in vitro and in vivo studies. In this study, the cytotoxic effect of methamphetamine on oligodendrocytes has been investigated.

**Material and Method:** The cytotoxic effect of methamphetamine was determined by lactate dehydrogenase (LDH) test in neonatal Wistar rat oligodendrocyte cultures. The apoptosis inducing effect of methamphetamine was evaluated by apostain immunofluorescence staining method. For this purpose cultures have been exposed to the various concentrations of methamphetamine (10-1000 µM) with various incubation time (24-96 hours).

**Results:** LDH measures show that methamphetamine leads dose and time-dependent oligodendrocyte death. Apostain method points that methamphetamine results in apoptotic oligodendrocyte death especially at low (10 µM) and high (1000 µM) doses.

**Conclusions:** These results suggest that neurotoxic effects that are observed in chronic methamphetamine users may be partly due to the toxic effect of methamphetamine on oligodendrocyte.

**Key words:** Methamphetamine, oligodendrocyte, apoptosis, rat, apostain

Kürşad GENÇ

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Fizyoloji Anabilim Dalı

İnciraltı, 35340, İzmir

Tel : 232-2595959/4475

e-mail: sermingenc@hotmail.com

Metamfetamin, kötü amaçlı kullanımı tüm dünyada giderek artan bir yaygınlıkta görülen psikostimulan bir ilaçtır (1). Kronik metamfetamin kullanımı kardiyotoksik ve nörotoksik komplikasyonlar doğurmaktadır (1). Ayrıca doğum öncesi dönemde metamfetamine maruz kalan fetüslerde sinir sistemini de içine alan teratojenik etkiler gözlenmektedir (2-4). Bugüne kadar yapılan in vivo ve in vitro deneysel çalışmaların sonuçları metamfetaminin nöronlar üzerine toksik etki gösterdiğini ve apoptotik nöron ölümüne yol açtığını göstermiştir (1,5-8). Kronik metamfetamin kullanıcılarında yapılan fonksiyonel görüntüleme incelemeleri bu maddenin beyaz cevher hasarına da yol açtığını düşündürmektedir (9). Bu nedenle metamfetamin nöronlar yanısıra oligodendroglial hücreler üzerine de sitotoksik etki gösteriyor olabilir. Fakat bu maddenin oligodendroglial hücreler üzerine in vitro toksik etkisinin bulunup bulunmadığını araştıran bir çalışma henüz yayınlanmamıştır.

Bu çalışmada metamfetaminin yenidoğan Wistar sıçan oligodendrosit kültürlerinde sitotoksik etkisinin bulunup bulunmadığını ve apoptotik oligodendrosit ölümüne yol açıp açmadığını araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla değişik konsantrasyonlarda metamfetamin ile değişik sürelerde enkübe edilen oligodendrosit kültürlerinde sitotoksisite laktat dehidrogenaz (LDH) testiyle, apoptotik hücre ölümü ise apostain immünfloresan boyama yöntemiyle araştırılmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada Wistar suşu yenidoğan sıçanlar kullanıldı. Çalışma için Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Komitesinden etik kurul onayı alındı. Yenidoğan sıçan yavrularının beyinleri steril koşullarda çıkarıldıktan sonra mekanik olarak ayrıştırıldı ve penisilin, streptomisin ve %10 oranında fetal sığır serumu içeren DMEM/F12 (Biochrom KG) kültür ortamında hücre süspansiyonu hazırlandı. Hücre süspansiyonları mikst glial hücre kültürleri olarak 75 cm<sup>2</sup>lik kültür flasklarına 3 beyin/flask yoğunlukta ekildi ve karbondioksit enkübatöründe enkübe edildi. Kültürlerin ortamı iki günde bir taze ortam ile değiştirildi. Ekim işleminden 7-9 gün sonra mikst glial kültürlerden shaking-aderans yöntemi ile oligodendroglial hücreler

izole edildi (10). Bu amaçla kültür kaplarına shaking işlemi 100 rpm hızda ve 24 saat süreyle uygulanarak mikroglial ve oligodendroglial hücrelerin kültür kaplarından ayrılması sağlandı. Mikroglial hücreleri uzaklaştırmak amacıyla da yüzer duruma geçen bu hücreler yeni kültür kaplarına ekilerek 15 dakika aderans işlemi uygulandı. Bu sürenin sonunda kültür kabına henüz yapışmayan oligodendroglial hücreler toplanarak polilizin (Sigma) ile kaplanmış yeni kültür kaplarına 5 x 10<sup>4</sup> hücre/cm<sup>2</sup> yoğunlukta ekildi. LDH testi için 24 yada 96 kuyucuklu, apostain yöntemi için ise 6 kuyucuklu kültür plakları kullanıldı. Galaktoserebrozid C immünfloresan boyaması için hücreler 35 mm'lik petri kaplarının içine konulan lamellere ekildi. Ekimin ertesi günü oligodendrosit kültürlerinin ortamı serumuz ve %1 oranında insülin-selenit-transferrin içeren kültür ortamıyla değiştirildi ve kültürlere 0-1000 µM arasında değişen konsantrasyonlarda stok metamfetamin (Sigma) solüsyonu (100 mM) eklendi. 24-96 saat arasında değişen enkübasyon sürelerinin sonunda sitotoksisite LDH testiyle, apoptotik hücre ölümü ise apostain immünfloresan boyama yöntemiyle araştırıldı. Oligodendrosit kültürlerinin sağlığının belirlenmesi amacıyla lamellere ekilen hücrelerde galaktoserebrozid C'ye yönelik monoklonal antikorla immünfloresan boyama yapıldı.

LDH testi için Cytotoxicity Detection Kit (Roche) kullanıldı ve en az üçlü eş kültür örnekleri çalışıldı. LDH testinde kontrol olarak metamfetaminin eklenmediği kültür koşulları (kuyucuklar) kullanıldı. Maksimal LDH salınımının belirlenmesi için ise metamfetamin ile aynı zamanda ve yalnızca %1'lik TritonX-100 deterjan maddesi eklenen kuyucuklar kullanıldı. Değişik enkübasyon sürelerinin ardından her kuyucuktan 50 µl süpernatant örneği alınarak ELISA plağına aktarıldı. Her bir kuyucuğa 50 µl hacimde ve taze hazırlanan LDH reaksiyon karışımı eklendi. ELISA plak okuyucusuna yerleştirilen plaktan 492 nm dalga boyunda okutma yapıldı. Referans dalga boyu olarak 620 nm seçildi. Her bir kuyucuğa ait absorbans değerinden ortalama zemin absorbans değeri çıkarılarak net absorbans değerleri elde edildi. Zemin absorbans değeri yalnız kültür ortamının 100 µl ha-

cinde eklendiği ve LDH reaksiyon karışımı eklenmeyen kuyucuklardan okutulan absorbands değerlerinin ortalamasıdır. Her bir kültür koşulu için hücre ölümü yüzdesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı: (Bulunan absorbands değeri – Kontrol absorbands değeri) x 100/ (Maksimal absorbands değeri – Kontrol absorbands değeri). Kontrol absorbands değeri herhangi bir toksik ajan, koruyucu ajan ya da TritonX-100 eklenmeyen kültür koşullarından elde edilen absorbands değerlerinin aritmetik ortalamasıdır ve bu hücrelerden enkübasyon süresi içerisinde spontan LDH salınımının ölçüsüdür. Maksimal absorbands değeri yalnızca TritonX-100 eklenen kültür koşullarından elde edilen absorbands değerlerinin aritmetik ortalamasıdır ve bu hücrelerden enkübasyon süresi içerisinde maksimal LDH salınımının ölçüsüdür (11).

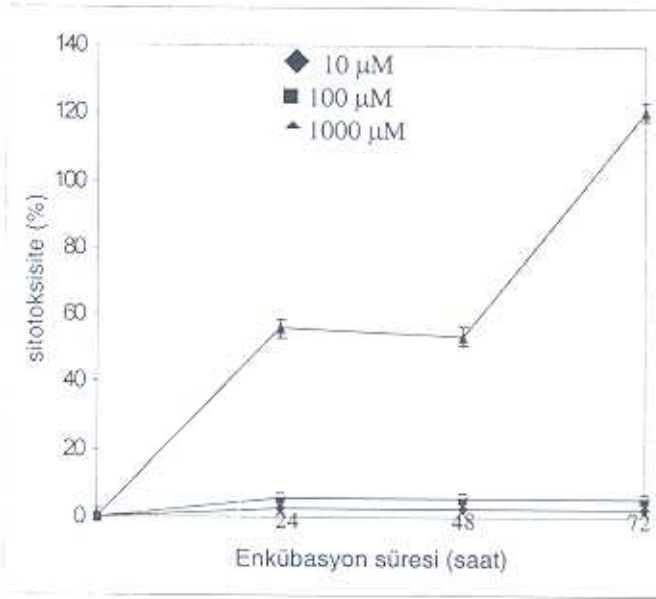
Apoptotik hücre ölümünü saptamak için kullanılan apostain yönteminin ilkesi apoptotik hücrelerdeki DNA'nın ısıyla denatürasyona duyarlılığının artmış olmasına dayanmaktadır. Bu yöntemde DNA, formamidin varlığında ısıyla denatüre edilmekte ve single strand DNA'ya spesifik antikorla boyanmaktadır (12). Bu amaçla hücreler kültür kabından tripsin/EDTA solüsyonuyla kaldırılarak santrifüj edildi ve PBS ile resüspende edildikten sonra soğuk metanol içinde 16 saat bekletilerek fikse edildi. Fiksasyon sonrası hücre süspansiyonları santrifüj edildi ve supernatant uzaklaştırılarak pellet, 0.25 ml hacimde ve distile su ile sulandırılan % 50'lik formamid (Sigma) ile resüspende edildi. Örnekler daha sonra 75° sıcaklığa getirilmiş su banyosunda 10 dk tutuldu. Hücre süspansiyonlarına 2 ml %3'lük ve yağ içermeyen, distile su ile çözülmüş ve PBS ile sulandırılmış süt tozu (Nestle) eklendi. Örnekler enkübasyon süresinin sonunda tekrar santrifüj edildikten sonra supernatant uzaklaştırıldı ve pellet 100 µl/ örnek hacimde F7-26 antikoruyla (Alexis Biochemicals) resüspende edildi. Antikor solüsyonu hazırlamak için 1 ml hacimde 100 µg F7-26 antikoruna PBS ile sulandırılmış %1'lik süt tozu süspansiyonundan 9 ml eklendi. Örnekler antikor solüsyonuyla oda sıcaklığında 15 dk enkübe edildi. Enkübasyon süresinin sonunda örneklerle 1 ml PBS eklendi. Santrifüj aşamasından sonra supernatant

uzaklaştırıldı. Pellet 100 µl/ örnek hacimde FITC-konjuge keçi-anti-fare sekonder antikoruyla (Caltag) resüspende edildi. Sekonder antikor ile oda sıcaklığında 15 enkübasyon işleminin ardından örneklerle 1 ml PBS eklendi. Santrifüj aşamasından sonra pellet tekrar PBS ile resüspende edildi. Floresan mikroskopisi incelemesi için boyanmış hücre süspansiyonları lam üzerine yayıldı. Lamaların üzerine DAPI-antifade eklendi ve lamel kapatıldı. Floresan mikroskopisi incelemesinde FITC florokromu için yeşil FITC filtresi, DAPI için ise UV filtresi kullanıldı. Her lamda 5 ayrı alanda, 100 hücre sayılarak apostain pozitif boyanan hücrelerin oranı saptandı.

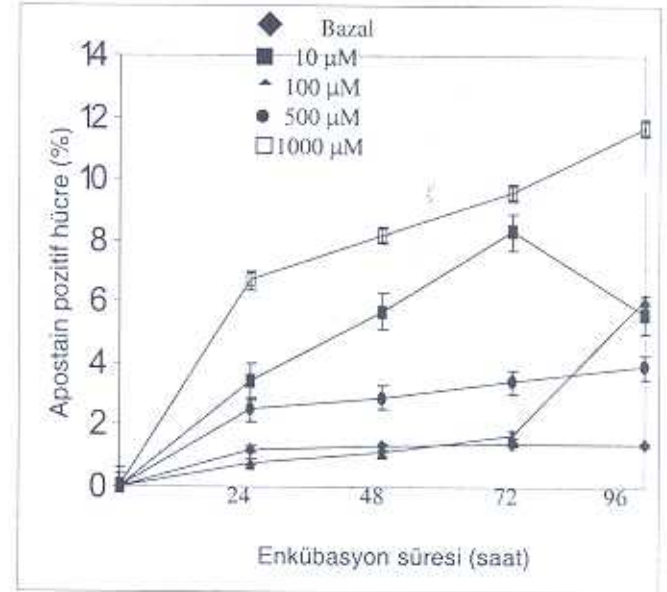
Bu çalışmada elde edilen verilerin istatistik analizi için SPSS programı (version 8.0) kullanıldı. İstatistik analizde sitotoksosite oranı ve apostain pozitif boyanan hücre oranı değerlendirilecek parametreler olarak seçildi. Grupların ortalama değerleri Student t testiyle karşılaştırıldı. 0.05'den küçük p değerleri anlamlı kabul edildi. Sonuçlar aritmetik ortalama ± standart hata biçiminde gösterilmiştir. İn vitro deneyler aynı koşullarda bağımsız olarak en az üç kez tekrarlanmış ve her deneyde en az üç eşli örnek çalışılmıştır.

## BULGULAR

Bu çalışmada kullanılan oligodendrosit kültürlerinin saflığı anti-Galaktoserebrozid C immünfloresan boyamasıyla araştırıldı ve kültürlerin saflığının %95'in altında olmadığı saptandı. LDH testinin sonuçları metamfetaminin 10 ve 100 µM konsantrasyonlarının 24-72 saat arasındaki enkübasyon sürelerinde belirgin bir sitotoksik etkiye yol açmadığını göstermektedir (Şekil 1). 1000 µM konsantrasyonda metamfetamin ise 24. saatte başlayan belirgin bir sitotoksik etkiye neden olmaktadır (ortalama % 55.8 ± 2.8). 48. saatteki ortalama sitotoksosite değeri (ortalama % 53.5 ± 3.1) 24. saatteki sitotoksik etkiyle belirgin bir fark göstermediği halde (p=0.47), 72. saatlik enkübasyon süresi sonunda sitotoksitenin (ortalama %120.7 ± 11.5) 24. ve 48. saat değerlerine göre anlamlı olarak artış gösterdiği saptandı (p = 0.001). Bu sonuçlar metamfetaminin bu hücre kültürü sisteminde oligodendrogial hücreler üzerine doza ve zamana bağımlı sitotoksik bir etkisi olduğunu göstermektedir.

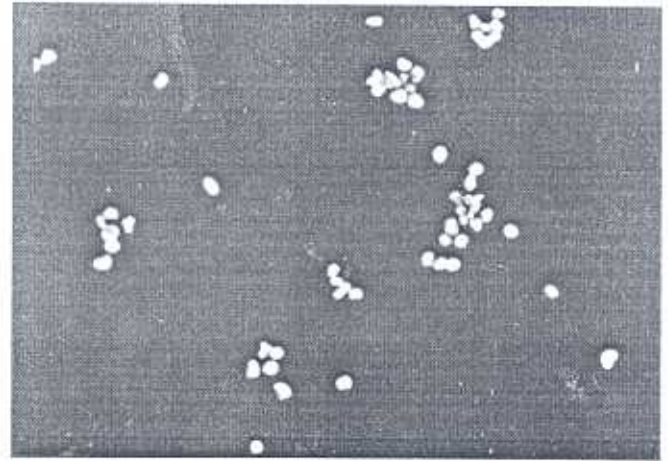


Şekil 1. Metamfetaminin oligodendrosit kültürlerinde sitotoksitesi indükleyici etkisi.



Şekil 2. Metamfetaminin oligodendrosit kültürlerinde apoptotik hücre ölümünü indükleyici etkisi.

Apoptain boyama yönteminin sonuçları metamfetaminin fare oligodendrosit kültürlerinde doza bağımlı bir apoptoz indükleyici etkisinin olduğunu göstermektedir (Şekil 2-4). Metamfetamin eklenmeyen oligodendrosit kültürlerinde %2'yi aşmayan bir apoptoz oranı saptanmışken (48. ve 96. saatte  $1.4 \pm 0.1$ ) (Şekil 3) bu oran 1000 µM konsantrasyonda metamfetamin eklenen kültürlerde % 10'u bulmaktadır (48. saatte  $9.6 \pm 0.4$ , 96. saatte  $11.7 \pm 0.2$ ) (Şekil 4). Apoptain boyama sonuçları 48. saatte metamfetamin dozuna bağlı bifazik bir apoptotik hücre ölümünü göstermektedir. Düşük (10 µM) ve yüksek metamfetamin dozları (1000 µM) bazal değerlerle karşılaştırıldığında (sırasıyla  $8.3 \pm 0.1$  ve  $9.6 \pm 0.4$ ) apoptotik hücre ölümünü anlamlı olarak indüklemektedir ( $p = 0.001$ ). 96. saatte bu etki 100 µM ve 1000 µM dozlarında ortaya çıkmaktadır (sırasıyla  $6.1 \pm 0.8$  ve  $11.7 \pm 0.2$ ) ve bu değerler ortalama bazal değere ( $1.4 \pm 0.1$ ) göre anlamlı olarak yüksektir (sırasıyla  $p=0.008$  ve  $0.001$ ).



Şekil 3. Apoptain boyama sonuçlarına göre metamfetamin eklenmeyen oligodendrosit kültüründe bazal apoptotik hücre ölümü oranı çok düşüktür (20 X).



Şekil 4. 96 saat süreyle 1000  $\mu$ M konsantrasyonda metamfetamin ile enkübe edilen bu kültürde apostain pozitif boyanan hücreler parlak görünmektedir (20 X).

## TARTIŞMA

Bu çalışmada metamfetaminin yenidoğan sıçan oligodendrosit kültürlerinde doza ve zamana bağımlı sitotoksik ve apoptotik hücre ölümüne yol açtığı ilk kez gösterilmiştir. Çalışmada anti-galaktoserebrozid C boyamasıyla gösterildiği gibi primer oligodendrosit kültürlerinin sağlığı deneyler süresince %95'den aşağı düşmemiştir. Primer oligodendrosit kültürlerinin sağlığı içerebilecekleri diğer glial hücrelerin sitotoksikite ve koruyuculuk deneylerinin sonuçlarını etkileyebilmesi açısından önemlidir (13). Kullanılan toksik ajanın oligodendrosit kültürlerine karışmış olabilen astroglial ve mikroglial hücrelerin ürettikleri nitrik oksid gibi toksik ya da trofik faktörler gibi koruyucu maddelerin üretimini uyarabilme ya da baskılayabilme olasılığı bulunmaktadır. Deneylerde kullanılan kültürlerde bu tür kontaminasyon kaynağı hücrelerin varlığı deneylerde test edilen toksik ajanın oligodendrositler üzerine sitotoksik etkisini artırıcı ya da azaltıcı yönde de etki gösterebilir. Bu durum da *in vitro* bulgularda artefaktı gündeme getirecektir. Fakat bu çalışmada oligodendrosit kültürlerinin saflık oranının yüksek olması ile bu olasıklar dışlanmıştır.

Oligodendroglial hücre topluluğu farklı gelişim evrelerinde bulunan (pre-oligodendrosit, immatür ve matür oligodendrosit) hücreleri içermesi açısından yine

de heterojenlik gösterebilmektedir (10). Bu çalışmada matür oligodendrosit marker'ı olan anti-miyelin basic protein antikoru, pre-oligodendrosit marker'ları olan anti-O4 ve öncü hücre marker'ı olan anti-A2B5 antikoları kullanılmamıştır. Kullanılan tek spesifik oligodendrosit marker'ı olan galaktoserebrozid C, pre-oligodendrosit ile immatür oligodendrosit geçiş aşamasında hücre yüzeyinde ekspresse edilmeye başlanmakta ve ekspresyonu matürasyon boyunca sürmektedir (10). Bu nedenle bu marker oligodendrosit gelişim evrelerinden tek birine özgü değildir. Ancak kültürlerin faz kontrast mikroskop altında izlenmesi sırasında oligodendroglial hücrelerin morfolojik olarak uzantı sayılarına göre değerlendirildiğinde immatür oligodendrosit aşamalarına uyduğu saptanmıştır. Değişik deneylerde kültürlerde galaktoserebrozid C pozitif boyanan hücre sayısının %95'den az olmaması da pre-oligodendrosit oranının düşük olduğunu düşündürmektedir. Çok sayıda uzantısı ve miyelin membran yapısı gösteren matür oligodendrosit morfolojisine uyan hücre sayısı ve bipolar uzantılı pre-oligodendrosit sayısı her kültürde birkaç hücreden fazla olmamıştır. Hücreler 3-4'ten fazla uzantılı olmaları özelliğiyle immatür oligodendrosit aşamasındaki hücrelere uyaktadır (10). Primer oligodendrosit kültürlerinde hücrelerin büyük bir bölümünün aynı gelişim evresinde bulunması farklı gelişim evrelerindeki oligodendrositlerin hasara karşı yanıtları farklı olabileceği için aranan bir özelliktir. İmmatür ve matür oligodendrositlerin hipoksi, iskemi ve sitokinlerle indüklenen hasar modellerine karşı yanıtlarının ve duyarlılıklarının farklı olduğu daha önceki çalışmalarla gösterilmiştir (14). Benzer biçimde değişik gelişim aşamalarındaki oligodendroglial hücrelerin metamfetamin ile oluşturulan hasara karşı duyarlılıkları da farklı olabilir. Fakat bu henüz araştırılmamış bir konudur. Bu çalışmada metamfetaminin oligodendrosit öncüsü hücreler ya da farklılaşmış matür oligodendrositler üzerine etksi araştırılmamıştır. Bu tür deneyler ayrı ayrı homojen immatür ya da homojen matür oligodendrosit kültürlerinde yapılmalı ya da değişik gelişim aşamalarında oligodendroglial hücreler içeren mikst oligodendrosit kültürlerinde gelişim evrelerine özgül marker'ların da kullanılacağı deneyler planlanmalıdır.

Apoptozun gösterilmesinde apostain yönteminin kullanılması spesifik olarak yalnızca apoptotik hücrelerin boyanmasını sağlamakta ve apoptozu nekrozdan kesin olarak ayırmaktadır. Yöntemin DNA kırıklarından bağımsız olması önemlidir, çünkü çift sarmal DNA kırıklarını saptayan TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) gibi yöntemler apoptoz için spesifik değildir (12,15,16).

Sıçan oligodendrosit kültürlerinde yapılan bu çalışmanın insan oligodendrosit kültürlerinde de tekrarlanması uygun olacaktır. Çünkü kemirgen ve insan oligodendrositleri arasında toksik ajanlara yanıt açısından farklılıklar bulunabilir (14). Ayrıca hücre kültürü çalışmalarında elde edilen sonuçlar in vivo çalışmaların tasarlanması açısından önemliyse de in vivo duruma özgü çok daha kompleks hücreler arası etkileşimler in vitro deney sonuçlarından daha farklı sonuçlara varılmasına yol açabilir. Örneğin metamfetamin in vivo reaktif astrogliazise yol açtığı için (17) oligodendroglial hücreler üzerine olası toksik etkisi astroglial hücreler tarafından tamponlanıyor olabilir. Bu nedenle bu in vitro deney sonuçlarının in vivo çalışma sonuçlarıyla da doğrulanması önemlidir.

Bu çalışmanın sonuçları metamfetaminin doza bağımlı bir biçimde oligodendroglial hücrelerde hem nekrotik, hem de apoptotik hücre ölümüne yol açtığını düşündürmektedir. Fakat bu etkinin hücresel mekanizmaları henüz bilinmemektedir. Nöronal hücrelerde yapılan çalışmalar metamfetaminin reaktif oksijen ve nitrojen ürünlerinin üretimini artırma, glutamat eksitotoksitesini iletme, apoptotik hücre ölümü sürecinde anti-apoptotik protein ekspresyonunu azaltma ve pro-apoptotik protein ekspresyonunu artırma, mitokondrial hasar ve dopamin otooksidasyonu, nöroinmün mekanizmaları tetikleme gibi çok değişik mekanizmalarla hücre ölümüne yol açabildiğini düşündürmektedir (1,6,8,18-20). Benzeri mekanizmaların oligodendrosit hasarında oynadığı rolü aydınlatmak için daha ileri çalışmalara gerek vardır.

Metamfetaminin nöronal hasar yanısıra bu çalışmanın gösterdiği oligodendroglial toksik etkisi in vivo çalışmalarla da desteklenirse bu durumun klinik açıdan

bazı önemli sonuçları olabilir. Bu durumda metamfetamin toksisitesini önlemeye yönelik tedavi araştırmalarında nöronal hasar yanısıra oligodendrosit hasarını ve beyaz cevher hasarını da önlemeyi hedef alan tedavi yaklaşımları daha etkin sonuçların alınmasını sağlayabilir.

#### KAYNAKLAR

1. Davidson C, Gow AJ, Lee TH, et al. Methamphetamine neurotoxicity: necrotic and apoptotic mechanisms and relevance to human abuse and treatment. *Brain Res Brain Res Rev* 2001;36:1-22.
2. Zimmerman EF. Substance abuse in pregnancy: teratogenesis. *Pediatr Ann* 1991;20:541-544.
3. Yamamoto Y, Yamamoto K, Abiru H, et al. Effects of methamphetamine on rat embryos cultured in vitro. *Biol Neonate* 1995;68:33-38.
4. Cho DH, Lyu HM, Lee HB, et al. Behavioral teratogenicity of methamphetamine. *J Toxicol Sci* 1991;16:37-49.
5. Choi HJ, Yoo TM, Chung SY, et al. Methamphetamine-induced apoptosis in a CNS-derived catecholaminergic cell line. *Mol Cells* 2002;13:221-227.
6. Cadet JL, Ordonez SV, Ordonez JV. Methamphetamine induces apoptosis in immortalized neural cells: protection by the proto-oncogene, bcl-2. *Synapse* 1997;25:176-184.
7. Deng X, Wang Y, Chou J, et al. Methamphetamine causes widespread apoptosis in the mouse brain: evidence from using an improved TUNEL histochemical method. *Brain Res Mol Brain Res* 2001;93:64-69.
8. Deng X, Cai NS, McCoy MT, et al. Methamphetamine induces apoptosis in an immortalized rat striatal cell line by activating the mitochondrial cell death pathway. *Neuropharmacology* 2002;42:837-845.
9. Ernst T, Chang L, Leonido-Yee M, et al. Evidence for long-term neurotoxicity associated with methamphetamine abuse: A IH MRS study. *Neurology* 2000;54:1344-1349.
10. De Vellis J, Espinosa de los Monteros A. Oligodendrocytes. In "Practical Cell Culture Techniques" A. A. Boulton, G. B. Baker, W. Walz (eds), p. 323-353, Humana Press, Totowa, New Jersey, 1992.
11. Ying HS, Gottron FJ, Choi DW. Assessment of cell

- viability in primary neuronal cultures. *Current Protocols in Neuroscience* 2000;7:18.1-7.18.17.
12. Frankfurt OS. Detection of apoptosis in leukemic and breast cancer cells with monoclonal antibody to single-stranded-DNA. *Anticancer Res* 1994;14:1861-1869.
  13. Benn T, Halfpenny C, Scolding N. Glial cells as targets for cytotoxic immune mediators. *Glia* 2001;36:200-211.
  14. Casaccia-Bonnel P. Cell death in the oligodendrocyte lineage: a molecular perspective of life/death decisions in development and disease. *Glia* 2000;29:124-135.
  15. Charriauf-Marlangue C, Ben-Ari J. A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. *Neuroreport* 1995;7:61-64.
  16. Stadelmann C, Bruck W, Bancher C, et al. Alzheimer disease: DNA fragmentation indicates increased neuronal vulnerability, but not apoptosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998;57:456-464.
  17. Stadlin A, Lau JW, Szeto YK. A selective regional response of cultured astrocytes to methamphetamine. *Ann N Y Acad Sci* 1998;844:108-121.
  18. Ladenheim B, Krasnova IN, Deng X, et al. Methamphetamine-induced neurotoxicity is attenuated in transgenic mice with a null mutation for interleukin-6. *Mol Pharmacol* 2000;58:1247-1256.
  19. Jayanthi S, Deng X, Bordelon M, et al. Methamphetamine causes differential regulation of pro-death and anti-death Bcl-2 genes in the mouse neocortex. *FASEB J* 2001;15:1745-1752.
  20. Thiriet N, Jayanthi S, McCoy M, et al. Methamphetamine increases expression of the apoptotic c-myc and L-myc genes in the mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res* 2001;90:202-204.