



T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BEYİN İSKEMİ REPERFÜZYON RAT MODELİNDE SERBEST
RADİKALLERİN OLUŞTURDUĞU HASARIN ÖNLENMESİNDE YA
DA AZALTILMASINDA ÇEŞİTLİ ANESTEZİK MADDELERİN
(KETAMİN, TİYOPENTAL, PROPOFOL) ETKİNLİĞİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

ABDULKADİR AKSOY

YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

KAHRAMANMARAŞ 2015

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**BEYİN İSKEMİ REPERFÜZYON RAT MODELİNDE SERBEST RADİKALLERİN
OLUŞTURDUĞU HASARIN ÖNLENMESİNDE YA DA AZALTILMASINDA
ÇEŞİTLİ ANESTEZİK MADDELERİN (KETAMİN , TİYOPENTAL , PROPOFOL)
ETKİNLİĞİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

ABDULKADİR AKSOY
YÜKSEK LİSANS

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ergül Belge KURUTAŞ

Jüri Üyesi
Doç. Dr. Ali Erdinç YALIN

Jüri Üyesi
Doç. Dr. Emel ŞAHİN

KAHRAMANMARAŞ 2015

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Abdulkadir AKSOY tarafından hazırlanan “Beyin İskemi Reperfüzyon Rat Modelinde Serbest Radikallerin Oluşturduğu Hasarın Önlenmesinde Yada Azaltılmasında Çeşitli Anestezi Maddelerin (Ketamin, Tiyopental, Propofol) Etkinliğinin Karşılaştırılması.” adlı bu tez, jürimiz tarafından 25/12/2015 tarihinde oy birliği ile Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof.Dr.Ergül Belge KURUTAŞ (DANIŞMAN)
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, KSÜ

Doç.Dr.Ali Erdinç YALIN (ÜYE)
Ecz. Biyokimya Anabilim Dalı, Mersin Üniversitesi

Doç.Dr.Emel ŞAHİN (ÜYE)
Sağlık Yüksek Okulu Hemşirelik Bölümü, KSÜ

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Mehmet BOŞNAK
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Abdulkadir AKSOY

Bu çalışma Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 2013/6-3 YLS

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri

Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Eğitimim süresi boyunca her türlü bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, tezimin her aşamasında ilgi ve desteğini aldığım ve fikirlerinden faydalandığım saygıdeğer hocam Prof. Dr. Ergül BELGE KURUTAŞ'a

Tezimin Histopatolojik sonuçların değerlendirilmesinde yardımcı olan Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi hocam Prof. Dr. Figen DORAN'a, eğitimim sırasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı ve Öğretim üyesi hocalarıma, değerli çalışma arkadaşlarım Velid ÜNSAL, Betül KABAKÇI, Perihan SÜMER ve Safiye Şeyma TANER'e, Tıbbi Biyokimya yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarım ve tüm biyokimya laboratuvar çalışanlarına ve beni her zaman destekleyen aileme teşekkür ederim.

Bu araştırma, 2013/6-3 YLS kodlu proje olarak Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir.

Aralık-2015

Adı Soyadı
Abdulkadir Aksoy

**BEYİN İSKEMİ REPERFÜZYON RAT MODELİNDE SERBEST RADİKALLERİN
OLUŞTURDUĞU HASARIN ÖNLENMESİNDE YA DA AZALTIKMASINDA
ÇEŞİTLİ ANESTEZİK MADDELERİN (KETAMİN, TİYOPENTAL, PROPOFOL)
ETKİNLİĞİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Dr. Abdulkadir AKSOY

ÖZET

Serebral iskemi/reperfüzyon (I/R) oksidatif stresle ilişkili olduğu için, serbest oksijen radikallerinin üretimini düzenlenmesi, serebral I/R tedavisinde yeni yaklaşımlara neden olabilir. İskemi-reperfüzyon sebepli serebral hasar üzerine intravenöz anesteziklerin (ketamin, tiyopental ve propofol) etkisi ilgili hiç çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı serebral iskemi-reperfüzyon hasarı üzerine yaygın olarak kullanılan intravenöz anesteziklerin koruyucu etkilerini, oksidan ve antioksidan durum ve nörona spesifik enolaz (NSE) üzerine etkisini araştırmaktır.

Serebral iskemi-reperfüzyon hasarı rat modeli orta serebral arter embolizasyonu ile oluşturuldu. 45 Wistar albino ratlar beş gruba ayrıldı ve her biri dokuz hayvandan oluştu. Bunlar sham, kontrol, ketamin, tiopental ve propofol gruplarıydı. Kontrol grubundaki ratlar iskemi-reperfüzyon'lu olup hiçbir şey verilmedi. 30 dakika iskemik sürenin sonunda, 30 dakikalık reperfüzyon yapıldı ve anestezik maddeler reperfüzyondan 15 dakika önce uygulandı. Reperfüzyon süresinin sonunda, doku numuneleri, biyokimyasal ve histopatolojik değerlendirme için alındı. Bizim çalışmamızda, Oksidatif stres biyomarkırları olarak katalaz (CAT), superoksit dismutaz (SOD) ve malondialdehit (MDA) spektrofotometrik olarak ölçüldü. NSE düzeyi ELIZA ile ölçüldü. Dokuların histopatolojik analizi ışık mikroskobu altında gerçekleştirildi.

Kontrol grubunda iskemi-reperfüzyon önemli ölçüde MDA ve NSE düzeylerini arttırdığı ve antioksidan enzim düzeylerini azalttığı gözlemlendi ($p<0.05$). Bununla birlikte, ketamin, tiyopental ve propofol, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, serebral iskemi-reperfüzyonlu ratlarda belirgin şekilde MDA ve NSE düzeylerini azaldığı ve antioksidan enzim düzeylerinin sham grubuna yaklaştığı gözlemlendi ($p<0.05$). Histopatolojik incelemede kontrol grubunda hasar gözlenirken ketamin, tiyopental ve propofol gruplarında rejenerasyon bulguları saptandı.

Bu alışma anestejik maddelerin enjeksiyonu serebral iskemi reperfuzyon hasarına karşı koruduğu dair in vivo kanıt sağlamıştır.

Anahtar Kelimeler: Beyin iskemi-Reperfuzyon, Serbest Radikaller, Anestejik Maddeler

Sayfa Adedi: 86

Danışman: Prof. Dr. Ergöl BELGE KURUTAş

**BRAIN ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY IN RAT MODEL OF FREE
RADICALS FORMED BY IN PREVENTING OR REDUCTION OF VARIOUS
ANESTHETIC AGENTS (KETAMINE, THIOPENTAL, PROPOFOL)
COMPARISON OF EVENTS**

Master Thesis

MD. Abdulkadir AKSOY

ABSTRACT

Regulation of cerebral ischemia-reperfusion (I/R) production of oxygen radicals, cerebral ischemia-reperfusion injury may lead to in treatment of which is associated with oxide stress. There is no study about the effects of intravenous anesthetic (ketamine, thiopental and propofol) on cerebnal injury caused I/R. The aim of this study is to investigate the effect of the commonly used intravenous anesthetics in I/R injury on the oxidant and antioxidant status and neurons specific enolase (NSE).

Cerebral ischemia-reperfusion injury model in rats was induced by middle cerebral artery embolization. 45 Wistar rats were divided into five groups, each consisted of nine animals. These were sham, control, ketamine, thiopental and propofol groups. The rats in the control group no applied ischemia- reperfusion. At the end of the ischemic period of 30 minutes, 30 minutes reperfusion and anesthetics was applied 15 minutes before reperfusion. At the end of reperfusion period, the tissue samples were removed for biochemical and histopathological evaluation. In our study, oxidative stress biomarkers suc has catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) were measured by spectrophotometry. NSE levels were measured by ELISA. Histopathological analysis of tissues were carried out under a light microscope.

Ischemia-reperfusion increased significantly MDA and NSE levels increased significantly during ischemia-reperfusion and observed to reduce the levels of antioxidant enzymes in the control ($p < 0.05$). However, ketamine, thiopental and propofol, compared with the control group, cerebral ischemia-reperfusion rats markedly MDA was observed NSE levels decrease in antioxidant enzyme levels were close to the sham group ($p < 0.05$). Histopathological examination of the damage observed in the control group ketamine, thiopental and propofol were found signs of regeneration in the group.

The injection of anesthetic agent provided in vivo evidence to protect against cerebral ischemia reperfusion injury.

Key Words: Brain Ischemia-Reperfusion, Free Radicals, Anesthetic Agents

Page number: 86

Supervisor: Prof. Dr. Ergül BELGE KURUTAŞ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
KABUL VE ONAY	II
TEZ BİLDİRİMİ	II
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	III
ÖZET	IV
ABSTRACT	V
İÇİNDEKİLER	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	IX
1. GİRİŞ AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İskemi/Reperfüzyon Hasarı	3
2.1.1. İskemi Reperfüzyon Hasarının Mekanizması	3
2.1.2. Serbest Radikaller.....	5
2.1.2.1. Süperoksid Radikali (O ₂ ⁻)	6
2.1.2.2- Hidrojen Peroksid	6
2.1.2.3 Hidroksil Radikali (OH)	7
2.1.2.4. Singlet Oksijen	8
2.1.3. Serbest Radikallerin Biyolojik Hedefleri	8
2.1.3.1. Membran Lipidlerine Etkileri	9
2.1.3.2. Proteinlere Etkileri	10
2.1.3.3. Nükleik Asit ve DNA'ya Etkileri	10
2.1.3.4. Karbonhidratlara Etki	10
2.1.4. Vücudun Antioksidan Savunma Mekanizmaları.....	10
2.1.5. Enzimatik Antioksidanlar	11
2.1.5.1. Süperoksid Dismutaz(SOD)	11
2.1.5.2. Katalaz	12
2.5.2.3. Glutatyon Peroksidaz	12
2.1.5.4. Glutatyon Redüktaz	13
2.1.5.5. Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz	14
2.1.6. Enzimatik olmayan endojen antioksidanlar.....	14
2.1.6.1. Glutatyon	14
2.1.6.2. C Vitamini (Askorbik Asit)	15
2.1.6.3. E Vitamini (Alfa-tokoferol).....	15
2.1.6.4. Beta Karoten	16
2.1.6.5. Melatonin	16
2.1.6.6. Ürik asit (Ürat).....	16
2.1.6.7. Bilirubin	16
2.1.7. Eksojen Antioksidanlar.....	17
2.1.8. Nöron Spesifik Enolaz (NSE)	17
2.1.9. İskemi-Reperfüzyon Kaynaklı Serbest Radikallerin Oluşumu	18
2.1.9.1. Ksantin Oksidaz Sistemi	18
2.1.9.2. Lökosit (Nötrofil, lenfosit, monosit) Aktivasyonu.....	19
2.1.9.3. Hücre İçi Kalsiyum Artışı	20

2.2. Beyin Dokusunda İskemi / Reperfüzyon Hasarı	21
2.3. Çalışmada Kullanılan Etken Maddeler	24
2.3.1. Ketamin	24
2.3.2. Tiyopental	24
2.3.3. Propofol	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. Gereç	25
3.1.1. Araştırma Sırasında Kullanılan Aygıtlar	25
3.1.2. Araştırma Sırasında Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	26
3.1.3. Ratlar	28
3.2. Yöntem	28
3.2.1. Deney grupları	28
3.3. Rat Beyin Dokusu	30
3.4. Beyin Dokularının Histopatolojik İncelenmesi	31
3.4.1. Işık Mikroskopik Düzeyde İncelenmesi	31
3.5. Beyin Dokularının Biyokimyasal İncelenmesi	31
3.5.1. Homejanat Hazırlama	31
3.6. Beyin Dokusunda Protein Düzeyinin Tayini	31
3.6.1. Ayıraçlar	31
3.6.2. Standart Eğrinin çizimi	32
3.6.3. Hesaplanması	33
3.7. Beyin Dokusunda MDA Düzeyinin Tayini	33
3.7.1. Ayıraçlar	33
3.7.2. Standart Eğri Çizimi	34
3.7.3. Hesaplanması	35
3.8. Beyin Dokusunda SOD Aktivite Tayini	35
3.8.1. Ayıraçlar	36
3.8.2. Standart Eğri Çizimi	36
3.8.3. Hesaplama	37
3.9. Beyin Dokusunda CAT Aktivite Tayini	39
3.9.1. Ayıraçlar.....	39
3.9.2. Standart Eğri Çizimi	39
3.9.3. Hesaplama	40
3.10. Beyin Dokusunda NSE Düzeyinin Tayini	40
3.11. İstatistik	41
4. BULGULAR	41
4.1. Ağırlık	41
4.2. Beyin Dokusunda MDA aktivitesi	42
4.3. Beyin Dokusunda SOD aktivitesi	43
4.4. Beyin Dokusunda CAT düzeyi	44
4.5. Nörona Spesifik Enolaz (NSE) Aktiviteleri Üzerine Etkiler.....	45
4.6. Histopatolojik Analiz Sonuçları	46
4.6.1. Sham Grubu	46
4.6.2. Kontrol Grubu	46

4.6.3. Ketamin Grubu	46
4.6.4. Tiyopental Grubu	46
4.6.5. Propofol Grubu	46
4.7. Beyin Dokusunun H-E Skorları	46
5.TARTIŞMA	51
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	60
7.KAYNAKLAR	61
8.ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ	69
9.TABLolar DİZİNİ	70
10.EK-1	71
11.ÖZGEÇMİŞ	72

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

İ/R	: İskemi Reperfüzyon
AAF	: Asetilaminofloren
ATP	: Adenozin Trifosfat
ADP	: Adenozin Difosfat
α	: Alfa
CAT	: Katalaz
DEN	: Dietilnitrozamin
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
FAD	: Flavin Adenin Dinükleotit
FB	: Fenobarbital
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GSH-R	: Glutasyon redüktaz
GSSG	: Okside glutasyon
Hsp	: Isı Şok Proteinleri
H₂O₂	: Hidrojenperoksit
HOCl	: Hipoklorik Asit
L •	: Lipit radikali
LOO•	: Lipid peroksil radikali
LOOH	: Lipit hidroperoksit
MDA	: Malondialdehit
ml	: Mililitre
mU	: Mili Ünit
NSE	: Nöron Spesifik Enolaz
NO	: Nitrik oksit
NADPH	: Redükte Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
SOR	: Serbest Oksijen Radikalleri
O₂⁻	: Süperoksit Radikali
HOCl	: Hipoklorik Asit

H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
TBA	: Tiyoarbütirik asit
XO	: Ksantin Oksidaz
OD	: Optik Dansite
RNA	: Ribonükleik Asit
ROR	: Reaktif Oksijen Radikalleri
KSÜ	: Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi
O₂	: Oksijen
HO₂·	: Perhidroksi Radikali
OH·	: Hidroksil Radikali
¹O₂	: Singlet Oksijen
NO·	: Nitrik Oksit Radikali
H·	: Hidrojen Radikali
SOD	: Süperoksit Dismutaz
ROO·	: Peroksil Radikali
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
ETS	: Elektron Transport Sistemi
-SH	: Tiyol
L·	: Yağ Asidi Zincir Radikali

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bir dokuya gelen kan akımını azalması veya kesilmesine iskemi denir. Reperfüzyon ise kan akımının yeniden başlamasıdır. İskemiye maruz kalan dokuda başlayan kimyasal reaksiyonlar sonucunda hücrel disfonksiyon ve nekroz gelişir. İskemik dokunun reperfüzyonu, bir dizi reaksiyonun başlaması ile paradoksal olarak doku hasarına yol açar. Reperfüzyon döneminde başlayan reaksiyonların sitotoksik oksidanlar ile ilişkili olması nedeniyle, bu dönemde gelişen hasarın sadece iskemiden sonra oluşan hasara göre daha ciddi olduğu bildirilmiştir (17,86).

Beyin canlıların mental ve motor fonksiyonlarının oluşmasında temel ve fonksiyonel önemi olan, aynı zamanda hasarlanmaya karşı da çok hassas olan bir organdır. Yaşlanmayla birlikte aterosklerotik sürecin hızlanması sonucunda tromboembolik reaksiyonların sıklığında artış görülmekte ve bu da serebral kan damarlarının tıkanması ve iskemi oluşumu riskini artırmaktadır (1).

Bu nedenle felç modelleri üzerinde yapılan deneysel çalışmalar giderek artmıştır. Trombolitik tedavinin felçli hastalarda kullanılmaya başlanması ile reperfüzyon hasarı ve sonuçları gündeme gelmiştir (2).

İskemik dokuya yeniden kan akımının sağlanmasına rağmen, fonksiyonel düzelme beklenildiği kadar iyi sonuçlar vermemektedir. Reperfüzyon ile birlikte yeniden oksijen sağlanması, aşırı serbest radikal oluşmasına neden olur (3,4,5).

Reperfüzyon döneminde gözlenen hasarda, hücre içine moleküler oksijen girişi ile hızla oluşan serbest oksijen radikal (SOR) türevleri başta olmak üzere birçok mekanizma rol oynamaktadır. Reperfüzyon hasarına en fazla duyarlı olan hücrel yapılar, zar lipitleri, proteinler ve nükleik asitler molekülleridir (6). Normal durumlarda SOR endojen antioksidanlarla kontrol edilir. Eğer oksidatif durum antioksidan kapasite ile dengelenmezse oksidatif stres ortaya çıkar. SOR artışına oksidatif strese beyin çok hassastır(7).

Artmış SOR lipid, protein ve nükleik asitler gibi temel hücresel yapıların hasar görmesine neden olur. Sonuçta SOR artışı iskemik beyinde apoptoz, nekroz ve hücre ölümüyle sonuçlanabilir.

Organizma iskemi-reperfüzyon sonrası oluşan serbest oksijen radikallerine karşı savunma yolları geliştirmiştir. En önemlisi antioksidan enzim sistemidir. Bu enzimler iskemi-reperfüzyon hasarında dokuda biriken serbest oksijen radikallerinin detoksifikasyonunda görevlidir. Antioksidan enzimlerden süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon peroksidaz (GPx), iskemi-reperfüzyonla oluşmuş, süperoksit (O_2^-) ve hidrojen peroksid (H_2O_2) radikallerinin hücre için daha toksik olan hidroksil radikaline ($\bullet OH$) çevrilmeden detoksifikasyonunda rol oynarlar. Ayrıca iskemi-reperfüzyonla oluşmuş serbest radikallerin hasarına bağlı olarak hücre membranındaki poliansatüre yağ asitlerinin oksidasyonu, organellerde malonildialdehit (MDA) birikimi olur. İskemi/reperfüzyon hasarını önlemek için çeşitli ajanlar ve çok sayıda antioksidan maddeler ile araştırmalar yapılmıştır (53).

Bu çalışmamızda beyin dokusunda oluşturulan İ/R'un yol açacağı hasara karşı farklı anesteziik (Ketamin, Tiyopental, Propofol) maddelerin olası etkileri incelenmesi amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 İskemi/Reperfüzyon Hasarı

Bir organa gelen kan akımının çeşitli nedenlerle (özellikle vasküler cerrahi işlemler ve organ transplantasyonu esnasında) yetersiz hale gelmesine veya durmasına iskemi denir. İskemi sonucunda doku hipokside kalır ve hipoksik doku hasarı ortaya çıkar. İskeminin uzun sürmesi sonucunda hücrelerin bütünlüğü kaybolur hatta hücrel ölüm meydana gelir. Reperfüzyon ise dokunun kanlanması yeniden başlamasıdır. İskemik bir dokuda kan akımının yeniden başlaması durumunda (reperfüzyon), özellikle dokuya gelip yerleşen polimorfonükleer lökositler (PMNL) tarafından salınan serbest oksijen radikalleri (SOR) dokudaki yıkımı artırıcı etki yapar. Bu olaya reperfüzyona bağlı doku hasarı denir (17).

İ/R hasarı, oluş mekanizması aydınlatılmış, tedavisi için çok uzun süredir birçok ilaç denenmiş ve halen üzerinde çalışılan bir klinik sorundur. Beyin için birçok faktör İ/R hasarı oluşumunda etkilidir (40).

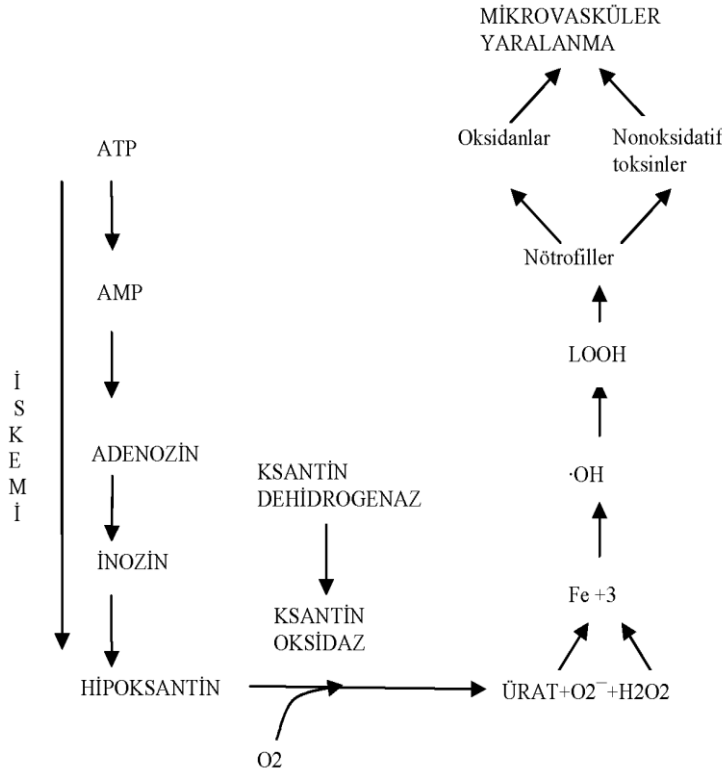
2.1.1 İskemi reperfüzyon hasarının mekanizması

Mitokondrideki oksidatif fosforilasyonun engellenmesine neden olan hipoksi, hücrede anaerobik solunumu başlatır. Hipoksi adenosin trifosfat (ATP) oluşumu yavaşlatıp durdurarak, hücre zarında aktif sodyum pompasının yetersizliğine yol açar ve hücre içi sodyum birikimine ve hücreden potasyum atılmasına neden olur. Aynı anda solid materyalin birikimiyle izoozmotik su birikimi eşlik ederek akut hücrel şişmeye neden olur. Hücrel ATP azalması adenosin monofosfat (AMP) artımı ile birlikte gerçekleşir. Bu durum fosfofruktokinaz enzimini uyarır ve anaerobik glikolizi artırarak, glikojenden ATP oluşumunu sağlar. Bu sayede hücre içi enerji kaynakları korunur. Ama glikolizde, laktik asit ve fosfat türevlerinden hidroliz sonucu oluşan inorganik fosfat birikimiyle, hücre içi pH' ı düşer. Takibinde hücre içersinde granüllü endoplazmik retikulum ribozomlardan ayrılır. Zar geçirgenliği artarak, hücre yüzeyinde tomurcuklanma oluşur. Sitoplazmada ya da dışında organel zarları gibi plazmadan köken alan konsantrik lamina (myelin şekiller) görülür. Endoplazmik retikulum genişlemiştir ve tüm hücre belirgin olarak şişmiştir. Yukarıdaki bozuklukların tümü oksijen verilince kadar geri dönüşlüdür, ancak iskemi sürerse geri dönüşümsüz zedelenme başlar (17).

Hipoksi oksidatif fosforilasyonu etkileyerek hayati önemi olan ATP yapımını durdurur. Kritik noktadan sonra öldürücü membran zedelenmesine neden olur. Aynı zamanda oluşan reperfüzyon da hücrede aşağıdaki hasarlara neden olur.

- Ksantin oksidaz kaynaklı serbest radikallerin oluşumu
- Hasarlı endotele nötrofil yapışmasında artma
- Enerji kaybı olan organa reperfüzyon sırasında Ca^{+2} taşınması
- Post iskemik dönemde adenin nükleotid sağlanmasındaki yetersizlik, hücrede enerji açığı

İskemide ATP, ADP, AMP, inozin'e ve hipoksantin'e yıkılır. Normalde hipoksantin ksantinoksidaz ile ksantin ve ürik aside okside olur. Bu birikim hipoksantin oksijenizasyonu için substrat fazlalığı yaratmaktadır. Reperfüzyonda ani ve fazla miktarda O_2 sağlandığından, hipoksantin ksantine oksidasyonu, süperoksit radikallerinin ortaya çıkmasına neden olur (17) (Şekil 1.).



Şekil 1. Ksantin oksidaz sisteminin radikal oluşturma mekanizması

2.1.2 Serbest radikaller

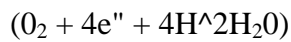
İskemik beyin hasarında, beyin fonksiyonlarının bozulmasında temel yanı sıra, yeniden reperfüzyon sağlandıktan sonra üretilen serbest radikaller de önemli bir yere sahiptir (8,28). En dış orbitada bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron taşıyan atom veya moleküle serbest radikal denir. Son orbitadaki bu eşleşmemiş elektrona bağlı olarak, bu atom veya molekül reaktif olup diğer moleküller ile reaksiyona girme eğilimindedir (16, 28, 64).

Oksijen, dış orbitada 2 tane eşleşmemiş elektronu ile biyolojik sistemlerdeki önemli bir serbest radikaldir. Oksijen ile reaksiyona giren moleküllerin oluşturduğu serbest radikaller de biyolojik sistemde önemli bir yere sahiptir (64) (Tablo 1.).

Tablo 1. Reaktif oksijen partikülleri

Radikaller	Radikal olmayanlar
Süperoksit anyon radikali (O ₂ ⁻)	Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)
Hidroksil (HO [·])	Singlet oksijen (*O ₂)
Peroksi(ROO [·])	Ozon (O ₃)
Alkoksil (RO [·])	Hipokloröz asit (HOCl)
Nitrik oksit(NO [·])	Lipit hidroperoksit (LOOH)
Semikinonon radikali (HQ [·])	Peroksinitrit (ONOO [·])
Hemoproteine bağlı serbest radikaller	Azot dioksit (NO ₂)
Organik radikaller (R [·])	N-halojenli aminler (R-NH-X)
Organik peroksit radikali (RCOO [·])	Hipohalöz asit (HOX)

Normal koşullar altında mitokondrial elektron transport sisteminde oksijene dört elektron eklenerek suya (H₂O) indirgenir.



Ancak IRH durumunda sadece bir elektron (e) transferi ile tek değerli indirgenme olur ve oldukça reaktif serbest oksijen radikalleri (SOR) meydana gelir. Bunlar süperoksit anyonu (O₂⁻), hidrojen peroksit (H₂O₂), hipoklorit asit (HOCl) ve hidroksi (OH[·]) radikalidir. Yapılan çalışmalarda serbest oksijen radikallerinin reperfüzyonun ilk birkaç dakikası içinde en fazla üretildiği dolayısıyla reperfüzyon hasarının en fazla erken dönemde olduğu gösterilmiştir (36).

Moleküler oksijen her aşamada indirgenerek yukarıda tanımlanan reaktif oksijen metabolitlerinin oluşumuna yol açar. O₂ tek başına hücre yıkımına neden olan reaksiyonları

başlatabildiği gibi, esas olarak daha reaktif oksijen radikallerinin oluşumuna yol açarak hücre toksisitesinde rol oynamaktadır.

Bu türler arasında en sık karşılaşılanlar ise:

2.1.2.1. Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$)

Zayıf reaktif bir serbest radikal olan süperoksit anyonu moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu meydana gelir. Süperoksit oluşumu özellikle mitokondri iç zarındaki solunum zincirinde elektrondan zengin aerobik ortamda spontan olarak meydana gelir. Süperoksit radikali ksantin oksidaz ve bir grup flavoenzimler tarafından oluşturulmaktadır. Diğer süperoksit üreten enzimler lipooksijenaz ve siklooksijenazdır. Fagositik hücrelerin NADPH bağımlı oksidaz enzim kompleksi fazla miktarda süperoksit radikali oluşturmaktadır. İki molekül süperoksit molekülü süperoksit dismutaz (SOD) tarafından hızla hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşür (16).

1. H_2O_2 ile tepkimeye girerek hidroksil radikali (OH^{\cdot}) ve singlet oksijen (1O_2) oluşturabilir.



2. Hidroksil radikali ile tepkimeye girerek singlet oksijen yapımına neden olur.



Serbest radikallere karşı organizmanın uzun süreli korunmasız kalması bu maddelerin düşük konsantrasyonlarının bile biyolojik açıdan önemli moleküllerin tahribatı ile sonuçlanır ve sonuçta DNA' da mutasyona, doku tahribatına ve hastalıklara yol açar.



2.1.2.2. Hidrojen peroksit

Hidrojen peroksit iki yol ile oluşur

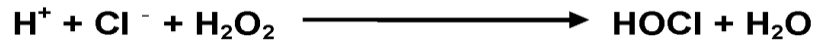
1- Oksijenin iki elektronla indirgenmesi sonucu H_2O_2 ortaya çıkar.



2-Biyolojik sistemlerde sıklıkla görülen süperoksidin üretimi yoluyla oluşmaktadır ve böylece iki süperoksid anyon radikali birbiriyle, hidrojen peroksit ve oksijeni verecek şekilde reaksiyona girerler (45).



Süperoksit radikallerinin temizlendiği bu tepkimeye dismutasyon tepkimesi denir. Bu reaksiyon SOD tarafından veya spontan olarak oluşabilir. H_2O_2 bir serbest radikal değildir, fakat biyolojik membranlara kolaylıkla girebilmesinden dolayı oldukça önemlidir. Nötrofil fagozomlarında bulunan myeloperoksidaz enzimiyle çok reaktif serbest oksijen radikali olan HOCl oluşumuna sebep olur.

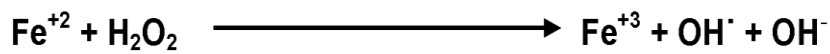


H_2O_2 geçiş metallerinin varlığında en önemli serbest oksijen radikali (SOR) olan OH^\cdot radikalinin oluşumunu sağlar. H_2O_2 'nin diğer önemli bir görevi de hüreiçi sinyal molekülü olarak rol almasıdır. H_2O_2 oluşuktan sonra katalaz, glutatyon peroksidaz ve peroksiredoksinler adında üç enzim sistemi tarafından uzaklaştırılır (54).

2.1.2.3. Hidroksil radikali (OH^\cdot)

(OH^\cdot) biyolojik sistemlere diğer SOR' den daha fazla hasar veren, biyomoleküllerle reaksiyona girebilen güçlü bir radikaldir. Oluşması için ortamda geçiş metalleri gereklidir (54).

Demir (Fe) katalizli - Haber Weiss reaksiyonu (Fenton Reaksiyonu)



Katalize olmayan Haber Weiss reaksiyonunda ise, süperoksidin direk olarak hidrojen peroksitle reaksiyona girmesidir.



OH[·] radikali canlı hücrelerde bulunan bütün moleküllerle reaksiyona girebilmektedir. Lipit peroksidasyonunu başlatabilir, DNA iplikçiklerinde kırılmalara neden olabilir ve hemen her organik molekülü, ayırım yapmadan okside edebilir (16,45).

2.1.2.4. Singlet oksijen

Enerji absorpsiyonu ile oksijenin paylaşılmamış dış elektronlarını değiştirerek aynı veya farklı orbitale yerleşebilirler. Uyarılmış haldeki bu oksijene singlet oksijen denir. Reaktif olmayan ancak reaktif oksijen radikallerinden biri olan singlet oksijen DNA, RNA, proteinler, lipitler ve sterollerini kapsayan çok sayıda biyolojik hedeflerle reaksiyona girerek hücrede zararlı etkilere sebep olur (21,73).

2.1.3. Serbest radikallerin biyolojik hedefleri

Serbest radikaller hücre ve dokularda birçok zarara yol açmaktadır. Bu zararlar şöyle sıralanabilir:

1. DNA' nın tahrip olması,
2. Nükleotit yapılı koenzimlerin yıkımı,
3. Lipid peroksidasyonu zar yapısı ve fonksiyonunun değişmesi,
4. Enzim aktivitelerinde ve lipit metabolizmasındaki değişiklikler,
5. Protein ve lipitlerle kovalan bağlantılar yapması,
6. Zar proteinlerinin tahribi, taşıma sistemlerinin bozulması,
7. Seroid ve yaş pigmenti denilen bazı maddelerin birikimi,
8. Proteinlerin tahrip olması ve protein döngüsünün artması,

9. Tiollere bağımlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulması, hücre ortamının tiol/disülfid oranının değişmesi,
10. Kolojen ve elastin gibi uzun ömürlü proteinlerdeki oksido-redüksiyon olaylarının bozularak kapillerlerde aterofibrotik değişikliklerin oluşması,
11. Mukopolisakkaritlerin yıkımı şeklinde özetlenebilir (17).

2.1.3.1. Membran lipidlerine etkileri

Lipid peroksidasyonunda, hücre membran fosfolipidlerindeki poliansatüre yağ asidi (PAYA) ile oksijen radikali, lipid hidroperoksitlerini oluşturmak için reaksiyona girer. Peroksidasyon şiddeti, lipidlerin doymamışlık derecesi ile orantılı olarak artar. PAYA' ların oksitlenmesi ile yağ asidi radikali oluşur. Buna oksijenin eklenmesi ile lipid peroksi radikali oluşur. Peroksi radikali zincir reaksiyonunun taşıyıcısıdır. Eğer E vitamini ve/veya erdostein gibi bir antioksidan tarafından önlenmezse komşu PAYA moleküllerini okside eder (81).

Bu durumda yeni radikallerin ve toksik aldehytlerin oluşmasına neden olan lipid hidroperoksitleri meydana gelir. Lipid peroksidasyonu membran yapısına ve diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Membran geçirgenliği ve membran akışkanlığı ciddi şekilde etkilenir. Lipid peroksitlerinin yıkımından oluşan ürünlerden biri malondialdehittir (MDA). Bu, protein ve fosfolipidlerle çapraz bağ ve polimerizasyon yaparak özelliklerinin kaybolmasını sağlar.

MDA; deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir. Hücrenin her tarafına dağılarak, özellikle sülfidril içeren enzimleri inaktive eder. Nükleik asitlerle etkileşmeye girerek genetik şifrede mutasyona yol açar. Sonuç olarak iyon transport bozuklukları, enzim aktivite değişiklikleri, hücre bileşenlerinin agregasyonu gibi değişiklikler ortaya çıkabilir (24,27).

Membranda lipid peroksidasyonu sonucu:

- a- Membran transport sistemleri bozular,
- b- Hücre içi ve hücre dışı iyon dengeleri bozular,
- c- Hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artar ve buna bağlı olarak proteazlar aktive olur,

d- Hücre içi organellerde oluşan lipid peroksidasyonu ve litik enzimlerin salgılanmasına bağlı hücre hasarı gelişir.

2.1.3.2. Proteinlere etkileri

Proteinlerin serbest radikallerden ne derecede etkileneceği aminoasit kompozisyonlarına bağlıdır. Triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, sistein gibi aminoasitler kolaylıkla etkilenirler. Çünkü doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksektir. Etkileşim proteinlerin spesifik bölgeleri üzerinde yoğunlaşmışsa hücrenin canlılığını olumsuz yönde etkileyebilir (16).

2.1.3.3. Nükleik asit ve DNA'ya etkileri

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyon ve ölüme yol açarlar. DNA serbest radikallerden kolayca etkilenir. Çünkü hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girebilir. Nötrofillerden kaynaklanan H₂O₂, membranlardan kolayca geçip hücre nükleusuna ulaşarak DNA hasarı, hücre disfonksiyonu ve ölüme yol açabilir (17).

2.1.3.4. Karbonhidratlara etki

Özellikle monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelir. Bir okzoaldehit olan glikozil, DNA ve RNA arasında çapraz bağ oluşturma özelliğinden dolayı antimitotik etki gösterir. Yine süperoksit ve hidrojen peroksitin in vitro olarak hyaluronik asidi parçaladıkları gösterilmiştir (27).

2.1.4. Vücudun antioksidan savunma mekanizmaları

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmada koruyucu mekanizmalar vardır. Bu mekanizmalardan bir kısmı serbest radikal oluşumunu, bir kısmı ise oluşmuş serbest radikallerin zararlı etkilerini önlemektedir. Bu işlevleri yapan maddelerin tümüne birden genel olarak antioksidanlar denir. Antioksidan maddeler, serbest radikal oluşumunu engelleyerek, oluştuklarında onları yok ederek, radikalleri kendilerine bağlayıp reaksiyon zincirini kırarak, okside olarak zarar görmüş hücresel yapıları onararak etki gösterirler (17, 4, 9, 84). (Tablo 2..)

Tablo 2. Antioksidan

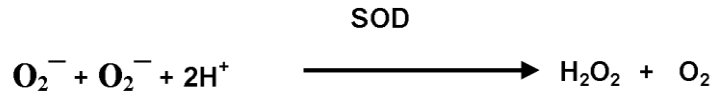
Enzimatik Antioksidanlar	Enzimatik olmayan antioksidanlar
Primer:	1-Vitamin E
1-Süperoksit dismutaz	2-Vitamin C
2-Glutatyon peroksidaz	3-Flavonoidler
3-Glutatyon transferaz	4-Butillenmiş hidroksianizol
4-Katalaz	5-Butillenmiş hidroksitoluen
Sekonder:	6-Ebselen
1-NADPH-Kinon oksidoredüktaz	7-P-karoten
2-Glutatyon S-transferaz	8-Ürat
3-Epoksit hidrolaz	9-Seruloplazmin
4-Glukronil transferaz	10-Transferrin
5-Sulfonil transferaz	11-Albumin
6-Glutatyon redüktaz	12-Haptoglobin
7-Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz	13-Likopen
8-6-fosfoglukonat dehidrojenaz	14-Metallotiyonein
9-İzositrat dehidrojenaz	15-Bilirubin
10-Okside glutatyon ve konjugat taşıyıcıları	16-Ubikinon
	17-Deferoksamin
	18-Melatonin

2.1.5. Enzimatik Antioksidanlar

2.1.5.1. Süperoksit dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz, süperoksit radikalini hidrojen perokside dönüştüren dismutasyon reaksiyonunda görevli metalloprotein yapısında enzimdir. Süperoksitler, radikal tepkimeleri başlatarak hidroksil radikali, singlet oksijen ve organik radikallerin oluşumuna neden olurlar. Radikal zincir tepkimelerinin başlaması ile birlikte reaktif ve toksik etkili radikallerin yapımı SOD tarafından engellenir. Serbest radikallere karşı organizmada ilk savunma SOD enzimiyle gerçekleşir. Organizmada oksidan stresin arttığı durumlarda SOD aktivitesi artarak koruyucu etkinliği sürdürmeye çalışır. Özellikle diğer enzimatik radikal temizleyicilerin aktivitelerinde azalma söz konusu olduğunda SOD aktivitesinde artma gösterilmiştir. SOD, katalaz ve

glutasyon peroksidazdan farklı olarak serbest radikali substrat olarak kullanır. Süperoksitin hidrojen peroksida dönüşümü reaksiyonunu katalizler.

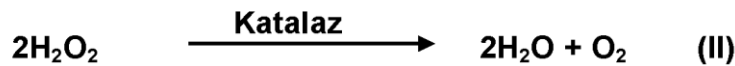
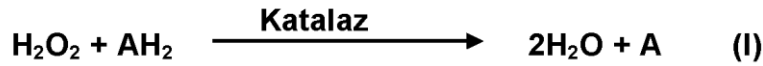


Süperoksit dismutaz, bu reaksiyonda hem oksidan hem de redüktan olarak hareket eder. Oksijen radikalleriyle oluşan hasara karşı SOD, katalaz ve glutasyon enzim sistemiyle birlikte çalışan bir savunma mekanizmasıdır. Böylece oluşan hidrojen peroksit, katalaz veya glutasyon peroksidaz enzimleri tarafından su ve oksijene indirgenmektedir. Peroksit radikalinin dismutasyonu ile oluşan hidrojen peroksit doku için biyolojik avantaj sağlar.

2.1.5.2. Katalaz

Katalaz, tüm hücre tiplerinde değişik konsantrasyonlarda bulunan dört tane hem grubu içeren bir hemoproteindir. Hidrojen peroksidi moleküler oksijen ve suya katalizler.(79)

Hidrojen peroksidin; düşük hızlarda üretildiği durumlarda peroksidatik reaksiyon (I) ile, yüksek hızda üretildiği durumlarda ise katalitik reaksiyon (II) ile etki gösterir.



Daha çok peroksizomlarda lokalizedir. Katalaz'ın indirgeyici aktivitesi hidrojen peroksit ile metil, etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerine etki etmez. Kan, kemik iliği, mukoz membranlar, karaciğer ve böbreklerde yüksek miktarda bulunmaktadır (79, 29, 66, 62).

2.1.5.3. Glutasyon Peroksidaz

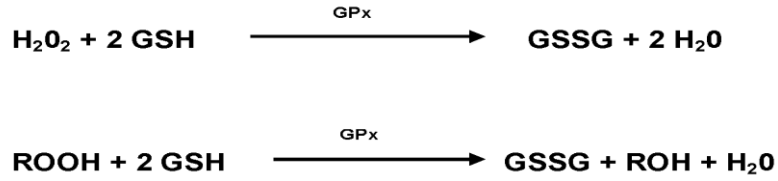
İlk olarak 1957 yılında Mills tarafından memeli eritrositlerinde gösterilmiştir. Bu sitozolik enzim tetramerik dört selenyum atomu ihtiva etmektedir. Glutasyon peroksidaz; H_2O_2 ve organik hidroperoksitlerin detoksifikasyonunu sağlayarak hücre membran lipidlerini oksidatif hasara karşı korumaktadır. Özellikle eritrositlerin membran bütünlüğünün

sağlanmasında görev yapmaktadır (6,37).Glutatyon peroksidaz enzimi iki farklı kategoride ele alınmaktadır;

Selenyuma bağımlı GPx: Bu sitozolik enzim, monomerik yapıda selenyum ihtiva etmektedir. Özellikle eritrositlerde bulunan glutatyon peroksidaz selenyuma bağımlı olarak görev yapmaktadır

Selenyumdan bağımsız GPx: Diğer dokularda olmakla birlikte özellikle karaciğer mitokondrilerinde aktivitede bulunmaktadır.

Glutatyon peroksidaz aşağıda belirtilen reaksiyon basamaklarında rol almaktadır:



Antioksidan etkinliği kanıtlanmış olan vitamin E'nin özellikle membranlarda sınırlı olduğu durumlarda GPx, membranları peroksidasyona karşı korumaktadır.

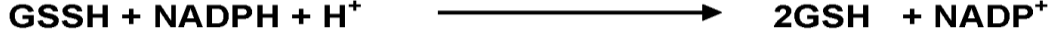
Fagositik hücrelerde GPx'in önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GPx solunum patlaması sırasında, serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmelerini engellemektedir. Glutatyon peroksidaz aktivitesi düşük olan makrofajlarda, zimosanla başlatılan solunum patlamasını takiben, hidrojen peroksid salınışının arttığı gösterilmiştir. Eritrositlerde de oksidan strese karşı en etkili antioksidan olan GPx'in aktivitesindeki bir azalma, hidrojen peroksidin artmasına ve şiddetli hücre hasarına neden olmaktadır (50,51).

2.1.5.4. Glutatyon redüktaz

Glutatyon redüktaz, bir flavin enzimidir ve koenzimi NADPH ve prostetik grubu FAD' dir. Hem sitozol hem de mitokondride bulunmaktadır. Hidroksiperoksitlerin redükte olması ile meydana gelen oksitlenmiş glutatyon (GSSG), glutatyon redüktazın katalizlediği reaksiyon ile tekrar glutatyon'a (GSH) dönüşmektedir:

Okside glutatyon hücreyi antioksidanlara karşı koruyamaz. Okside glutatyon, tiol içeren proteinlerin konformasyonu ve aktivitesi üzerine zararlı etkili prooksidan bir madde olduğu için bu okside formun ileride kullanılmak üzere tekrar, deposu sınırlı olan GSH'a dönüştürülmesi gerekmektedir. Hücre, elektron kaynağı olarak NADPH'ı kullanan glutatyon

redüktazın katalizlediği bir reaksiyon ile indirgenmiş glutatyonu tekrar oluşturur. NADPH, hidrojen peroksidin indirgenmesinde indirekt olarak elektronları sağlar. Oluşan NADP⁺ ise Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi yardımıyla NADPH' a dönüştürülür (50).



2.1.5.5. Mitokondriyal sitokrom oksidaz

Solunum zincirinin son enzimi olan sitokrom oksidaz, aşağıdaki reaksiyonla süperoksidi detoksifiye eden enzimdir.



Bu reaksiyon, fizyolojik şartlarda sürekli cereyan eden normal bir reaksiyon olup, bu yolla yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanır ve bol miktarda enerji üretimi sağlanır (25, 74, 31).

2.1.6. Enzimatik olmayan endojen antioksidanlar

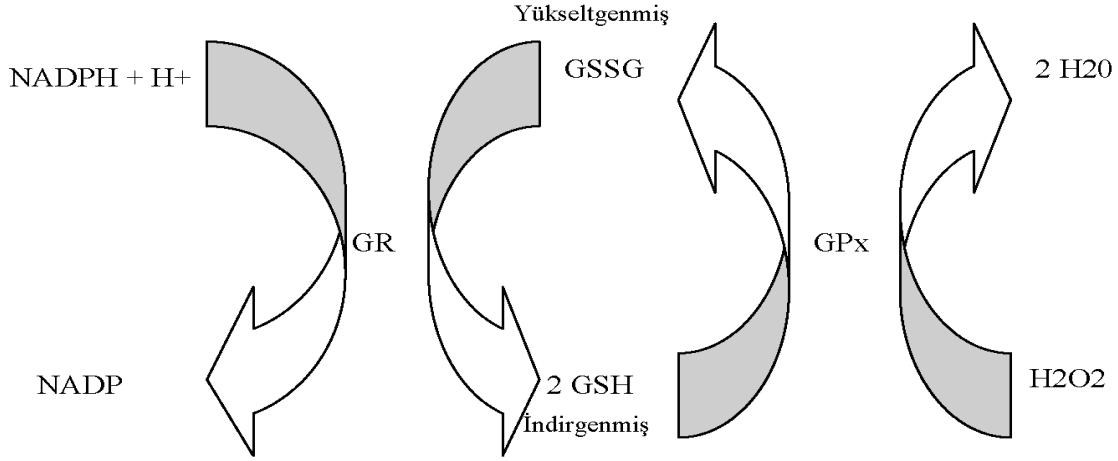
Katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzimler reaktif hidroksil türlerinin oluşturdukları zararlı etkilere karşı sınırlı ve direkt koruma sağlayabilirler. Bununla birlikte enzimatik olmayan antioksidanlar direk reaksiyona girerek oksidanları daha az zararlı ve daha stabil türevlere dönüştürebilirler.

2.1.6.1. Glutatyon

Tripeptit yapıdaki bu antioksidan glutamik asit, sistein ve glisin aminoasitlerinden oluşmaktadır. Hemen hemen tüm hücrelerde bulunmakta ve antioksidan olarak metabolik faaliyetler sırasında çok önemli rol oynamaktadır. İndirgenmiş glutatyon sentezi ATP'nin de kullanıldığı iki basamaklı bir reaksiyonla oluşmaktadır (47,85).

İndirgenmiş glutatyon, GPx ve GR gibi ksenobiyotiklerin, karsinojenlerin, serbest radikallerin ve lipopolisakkaridler gibi endojen ve eksojen zararlı bileşiklerin detoksifikasyonunda önemli rol oynayan çok önemli bir antioksidan olarak bilinmektedir. İndirgenmiş glutatyonun peroksitlerle ve disülfidlerle GPx enzimi varlığında reaksiyonu sonucu GSSG (okside glutatyon) oluşmaktadır. Oksitlenmiş glutatyon konsantrasyonunda

artış, oksidatif stresin bir göstergesi olmaktadır. Okside glutatyon, tiol içeren proteinlerin konformasyonu ve aktivitesi üzerine zararlı etkileri olan prooksidan bir madde olduğu için hızla redüklenmesi gerekmektedir. Glutatyon redüktaz enzimi NADPH varlığında GSSG'yi GSH'na redüklemektedir (54).(Şekil 2.)



Şekil 2. GSH redoks döngüsü

Hidrojen peroksid miktarının yükselmesi GPx aktivitesinde bir artışa yol açmaktadır. Bunun sonucu olarak başlıca çözünen redoks-aktif kofaktör, indirgenmiş şekilden okside şekle dönüşmektedir. Bu değişikliklere sitozolik Ca⁺² konsantrasyonunun artışı eşlik ederek oksidan baskı ile ilişkili hücre hasarına yol açmaktadır.

2.1.6.2. C Vitamini (Askorbik Asit)

Güçlü bir indirgeyici ajan ve antioksidan olup süperoksit, peroksit ve hidroksil radikalleri ile reaksiyona girerek bir ara ürün olan semidehidroaskorbat yoluyla metaboliti dehidro askorbik asiti oluştururlar. Membran içindeki ve ekstraselüler dokulardaki lipid peroksidasyonunu önlerler.

2.1.6.3. E Vitamini (Alfa-tokoferol)

Lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu serbest radikal temizleyicilerindedir. E vitamini zincir kırıcı bir antioksidan olup, her bir E vitamini molekülü iki oksidasyon zincirini durdurabilir. Aynı zamanda singlet oksijenin kuvvetli bir tutucusudur. Ayrıca hidroksil

radikali, peroksi radikali ve süperoksitle direkt olarak reaksiyona girebilirler. Okside olan E vitamini, parçalanmadan önce askorbik asit ve glutatyon tarafından tokoferole geri çevrilebilir (70).

2.1.6.4. Beta karoten

A vitamini ön maddesi olan beta karoten, etkili bir singlet oksijen ve radikal tutucu antioksidanlardandır (31).

2.1.6.5. Melatonin

Pineal bezden salgılanan direkt radikal temizleyici, indirekt olarak da antioksidan enzim düzeylerini artıran ve nitrik oksit sentetaz gibi preoksidatif enzimleri baskılayan antioksidan bir hormondur (31).

2.1.6.6. Ürik asit (Ürat)

Ürik asit, ksantin oksidazın oksipürünleri (ksantin, hipoksantin gibi) oksitlemesi ile oluşur. İnsan ve gelişmiş primatlarda pürin metablozmasının son ürünüdür. Ürat, fizyolojik koşullarda singlet oksijen, hipoklorid ve hidroksil radikali gibi reaktif bileşikleri baskılar, fakat süperoksit radikali ile doğrudan reaksiyona girmez, peroksit kaynaklı lipid peroksidasyonuna karşı korur. Bu da ürik asidin antioksidan etkilerinin olduğunu göstergesidir (11).

2.1.6.7. Bilirubin

Hem katabolizmasının son ürünü olan bilirubin aynı zamanda singlet oksijen, peroksinitrit ve hipoklorik asit gibi reaktif oksijen ve nitrojen türevlerini baskılar, ayrıca peroksil radikallerine karşı hidrojen donörü olarak davranarak lipid peroksidasyonunun zincir devam ettirici radikalini de etkisiz hale getirir. Bu arada biliverdin ise bilirubine göre daha etkili biçimde peroksil radikallerini baskılar (75).Yine plazmadaki ürik asit ve sistin, seruloplazmin ve transferrin radikal tutucu etkiye sahip diğer moleküllerdir (64,16).

2.1.7. Eksojen Antioksidanlar

A-Enzim inhibitörleri: Pterin aldehit, allopürinol, oksipürinol, folik asit, tungsten, NADPH oksidaz inhibitörleri (non-steroid antienflamatuar ilaçlar, adenozin, lokal anestetikler, kalsiyum kanal blokerleri).

B-Non-enzimatik serbest radikal toplayıcıları: Dimetilsülfoksit, mannitol.

C-Demir-redoks döngüsü inhibitörleri: Desferroksamin, serüloplazmin.

D-Nötrofil adezyon inhibitörleri

E-Gıda antioksidanları: Butylated hydroxytoluene, propylgalate, butylated hydroxyanisole, sodyum benzoat, etoxyquin.(46)

2.1.8. Nöron Spesifik Enolaz (NSE)

Nöron spesifik enolaz (NSE) ilk kez beyin dokusunda saptanmış olup sitoplazmik enzim enolazın nöral izoenzimidir. Enolaz ise glikolizde rol alan bir enzimdir ve 2-fosfogliseric asidden fosfoenol pirüvik asidi oluşturur (62). Nöron spesifik enolaz sinir dokusunda ve nöroendokrin sistemde bulunur. Üst limit 12 mg/l, yarı ömrü 14 gündür. Enolaz yaygın olarak bulunan glikolitik enzim 2- fosfo-D- Gliserat hidrolaz' ın bir izomeridir (66). Enolaz, 2- fosfogliseratı fosfoenol pruvata çeviren glikolitik bir enzimdir. Enolaz α , β , γ alt birimlerinden oluşan dimerik bir enzimdir. Enolaz $\alpha\alpha$, $\beta\beta$, $\gamma\gamma$, $\alpha\beta$, $\alpha\gamma$ şeklinde beş dimerik izoenzim ayırt edilmiş, $\beta\gamma$ izoenzimi ayırt edilememiştir. Dokularda α izoenzimi en yaygın olarak bulunmaktadır. Kas enolazı $\alpha\alpha$, karaciğer enolazı $\beta\beta$ dimerlerinden oluşur. NSE α ve γ dimerlerinden oluşur. Beyinde en fazla $\alpha\alpha$ dimerleri bulunmakla beraber, $\alpha\gamma$ ve $\gamma\gamma$ dimerleri de bulunmaktadır (68,70,71). NSE nöronların stoplazmasında ve periferik santral nöroendokrin hücrelerde (APUD hücreleri) lokalizedir (69). Deneysel çalışmalarda, travmatik ve iskemik beyin hasarından sonra BOS' da önemli oranda artışlar gösterdiği bildirilmiştir. Klinik çalışmalarda da; SSS' ni ilgilendiren pek çok durumda (inme, kafa travması, multipl skleroz, Alzheimer hastalığı ve epileptik nöbetler) BOS' daki NSE düzeylerinde benzer şekilde artışlar saptanmıştır (67). Nöroendokrin kökenli tümörlerde immünoreaktif NSE gösterilmiştir. NSE küçük hücreli akciğer kanserine karşı yüksek spesifite ve sensitivite göstermektedir(63). Başta küçük hücreli akciğer kanseri ve nöroblastom olmak üzere, feokromasitoma, melanoma, tiroid medüller kanseri ve pankreas nöroendokrin tümörlerinde yüksek serum düzeyleri gösterilmiştir (64,65). NSE ölçümü; hasara uğrayan dokuların daha çok glial ya da nöronal mı olduğunun tahmininde, hastalık prognozunun saptanmasında, hasar

büyüklüğü ve uygulanacak tedavi stratejisinin belirlenmesinde, hastalıkların ayırıcı tanısında ve tedavi etkinliğinin değerlendirilmesinde değerli bilgiler verir.

2.1.9. İskemi- Reperfüzyon Kaynaklı Serbest Radikallerin Oluşumu

Arteriyel ya da venöz kan akımı azalmasına bağlı organ ve dokunun yetersiz perfüzyonu sonucu bu doku veya organların oksijenden yoksun kalması şeklinde tanımlanan iskemi, hücrel enerji depolarının boşalması ve toksik metabolitlerin birikmesi sonucunda hücre ölümüne yol açmaktadır. İskemik dokuya hem hücrenin rejenerasyonu, hem de toksik metabolitlerin temizlenmesi için yeniden kan akımı gerekir. Ancak, iskemik dokunun reperfüzyonu dokuda paradoksal olarak sadece iskemi ile oluşan hasara göre çok daha ciddi bir hasara yol açar. Reperfüzyon döneminde gözlenen hasarda, hücre içine moleküler oksijen girişi ile hızla oluşan serbest oksijen radikal (SOR) türevleri başta olmak üzere birçok mekanizma rol oynamaktadır. Bunlardan bazıları:

2.1.9.1. Ksantin Oksidaz Sistemi

Ksantin oksidaz (KO) enziminin, reperfüzyon sırasında açığa çıkan O_2 radikallerinin üretiminde rolü olabileceği ilk kez Granger ve ark. tarafından ortaya atılmıştır. Bu konudaki diğer gelişmelerde Granger ve ark'nın ortaya koyduğu bu çatı altında gelişmektedir. Bu araştırmacılar, iskemi sırasında KO enziminin Ksantin dehidrogenaz (KD)' a dönüştüğünü ve ATP' nin de hipoksantine katabolize olduğunu göstermişler ve reperfüzyon döneminde KO enziminin, hipoksantinine ksantine dönüşümünü katalizlerken elektron alıcısı olarak NAD^+ yerine O_2 ' yi kullanarak, O_2 radikalini oluşturduğunu ortaya koymuşlardır (30).

McCord postiskemik dokularda, doku harabiyetini oluşturan en önemli; faktörün KO enziminden kaynaklanan O_2 radikalini olduğunu ve bu hasar sonucu gelişen fonksiyonel bozuklukların organdan organa farklılık gösterdiğini bildirmiştir (44).

Paller ve ark'nın yaptıkları çalışma, I/R hasarının böbreklerde KO kaynaklı mekanizmayı göstermesi açısından büyük önem taşımaktadır (51).

Araştırmacılar sıçanlarda 60 dakikalık böbrek arteri oklüzyonunu takiben, 15 dakikalık reperfüzyon safhasında, böbreklerde lipid peroksidasyon artışını göstermişler ve bu toksik oluşumun allopurinol verilmesiyle azaldığını, organ fonksiyonlarının korunmasını sağlandığını göstermişlerdir. McCord, $KD \rightarrow KO$ dönüşümünün böbreklerde 30 dakikalık

iskemi süresini gerektirdiğini ve bu sürenin O₂ radikali oluşumu için yeterli olduğunu bildirmiştir(58).

45 dakikanın altındaki iskemi sürelerinde, iskemi-reperfüzyon hasarında KO sisteminin önemli bir oksidan kaynak olduğunu ve böbrek dokusunda KD^KO dönüşümü için 45 dakikanın altındaki iskemi sürelerinin yeterli olduğunu bildirmişlerdir (41).

2.1.9.2.Lökosit (Nötrofil, lenfosit, monosit) Aktivasyonu

Reperfüzyon hasarının önemli bir nedeni de iskemik bölgeye lökositlerin, özellikle PMNL olan nötrofillerin infiltrasyonudur. Nötrofil kemotaksisine, ksantin oksidaz reaksiyonu sırasında ortaya çıkan süperoksid anyon radikalleri neden olur. Reoksijenasyon ile aktive olan diğer kemotaktik ajanlar ise C5a, C3a, araşidonik asid metabolitleri, özellikle LökotrienB₄, nitrikoksit, trombosit aktive edici faktör ve interlökin (1, 4, 6, 8), interferon ve tümör nekroz faktör gibi sitokinlerdir (35).

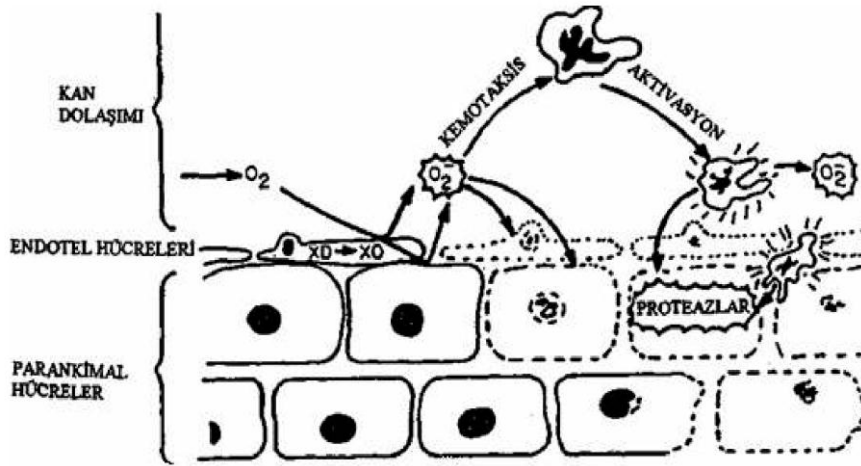
Nötrofiller, üzerinde bulunan glikoprotein yapısındaki adhezyon molekülleri ile etkileşime girdikleri endotel hücreleri arasına ilerleyerek ekstravasküler dokuya göç ederler. Aktive olmuş nötrofiller, antimikrobial savunma sisteminde kullandıkları mekanizma olan NADPH oksidaz enzimi aktivasyonu ile reperfüzyonda gelen moleküler oksijenden seri reaksiyonlar sonucunda oluşan süperoksid anyon radikali, hidroksil radikali, hidrojen peroksid, hipoklorik asid ve kloraminleri oluşturarak ileri doku hasarına neden olur (46,80).

İskemik dokuda serbest radikaller de dahil olmak üzere diğer bazı kemoatraktanların etkisi ile göç eden nötrofiller, aşağıdaki mekanizmalar ile reperfüzyonda doku hasarının ilerlemesine yol açmaktadırlar:

- Salgıladıkları enzimler (proteazlar elastaz, jelatinaz v.b) ile endotel hücre parçalanmasına neden olurlar.
- Nötrofillerin kapillerlerdeki agregasyonları ile kan akımının geri dönmesine engel olan kapiller tıkaçların oluştuğunu bildirilmiştir.
- Salgıladıkları vazokonstrüktör ajanlar ve trombosit aktive edici faktör ile daha büyük damarlarda da daralmaya neden olmaktadır.

Reperfüzyon döneminin en ağır mikrovasküler patolojisi olan kan akışının yeniden durması fenomeni' ne (no reflow phenomen) aktive olmuş nötrofillerin yol açtığı gösterilmiştir (55).

Bir araşidonic asit metaboliti olan l katrien B4'  salgılayarak, süperoksid anyon radikali üretimine ve nötrofillerin kemotaksisine neden olmaktadır. Böylece pozitif bir feed back mekanizması ile toplanmış olan nötrofillerden salgılanan kemotaktik faktörler yeniden serbest radikal üretimine ve nötrofil infiltrasyonuna neden olmaktadır. Nötrofillerde  retilen O₂ in eritrositlerin agregasyonunu da hızlandırdığı ve bu etkinliğin kapiller tıkanmayı daha arttırıcı olabileceğini bildirilmiştir (32).



şekil 3. Nötrofil İnfiltasyonu

2.1.9.3. Hücre İçi Kalsiyum Artışı

İskemi reperfüzyon hasarının gelişmesinde çok önemli diğer bir olay hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun artışıdır. Hücre içi kalsiyum artışı; hücre dışından kalsiyum girişi, hücre içi kalsiyum depolarından kalsiyum salınması ve hücre içi kalsiyum düzeyini kontrol eden mekanizmalarının bozulması şeklinde   yoldan gerçekleşmektedir. İskemide hücre içinde serbest kalsiyum artışı ile birlikte başlıca; lipoliz, proteoliz, DNA hasarı, mitokondri elektron transport zincir hasarı görülmektedir (59,71).

Doku hasarına yol açan serbest oksijen radikal formasyonunun, hücresel kalsiyum dengesini bozarak da etkili olduğu bilinmektedir. Oksidatif stres sonucu açığa çıkan SOR, glutasyon redüktaz düzeyini düşürerek, intrasellüler Ca⁺² dağılımını bozar. Daha sonra Ca⁺² ATPaz inaktivasyonuna bağlı olarak, endoplazmik retikulum ve mitokondriumlardan Ca⁺² serbestleşir ve sitozolik Ca⁺² düzeyi yükselir. Plazma-membran Ca⁺² ATPaz sisteminin de

inaktivasyonu, ekstrasellüler kalsiyumun hücre içine akımı izlenir. Sonuçta sitozolik ve mitokondriyal kalsiyum içeriği daha da artar. Bu da mitokondriyal disfonksiyona yol açar ve hücreyi ölüme götüren kaskad sistemlerinin tetiğini çeker. Bu durum, temel olarak hücre ATP' nin ve dolayısıyla hücre enerji düzeyinin azalmasına sekonder gelişmektedir.

Hücre içinde biriken Ca^{+2} irreverzibl hücre hasarına ve hücre ölümüne neden olur. Ca^{+2} un hücre içine girmesi proteazları aktive ederek hücre membranını parçalar. Aktive olan proteazlardan biri hücre yüzeyini balonlaştırarak hücre iskeletinin çökmesine neden olur. Kalsiyum ile aktive edilen ve 'kalpein' olarak tanımlanan ikinci sitozolik proteaz enzimi ise, ksantin dehidrogenaz'dan ksantin oksidaz oluşumunu indükler. Ayrıca, fosfolipaz A₁ ve A₂'yi aktive ederek, mitokondri ve hücre membranındaki fosfolipitler parçalanır. Membran fosfolipidlerinin parçalanması sonucu serbest yağ asitleri oluşur. Serbest yağ asitlerinin en önemlisi araşidonik asittir. Araşidonik asit, serbest radikallere, prostoglandinlere ve lökotrienlere metabolize olabilir. Bu maddeler, nötrofillerin endotelyuma adhezyonunu arttırarak, IRH'nın oluşmasında önemli rol oynarlar (52).

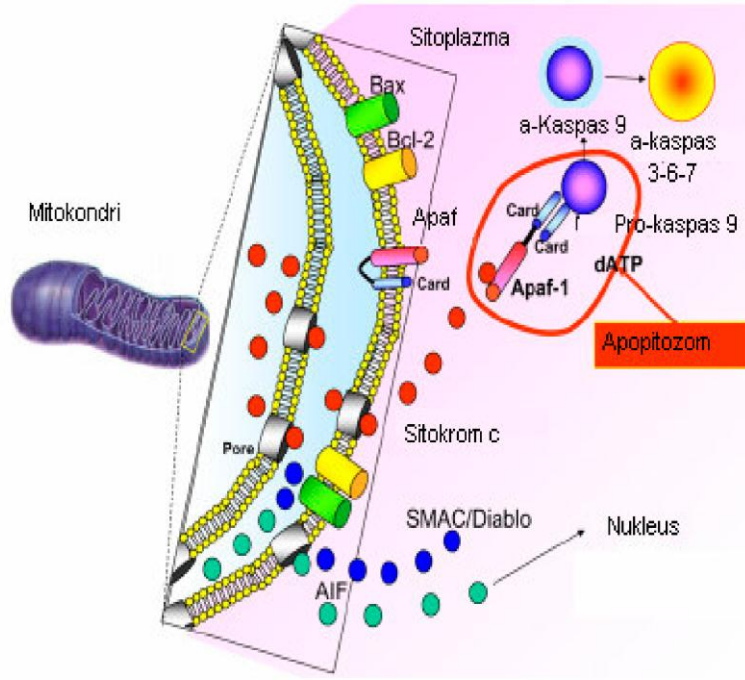
2.2. Beyin Dokusunda İskemi / Reperfüzyon Hasarı

İskemiye duyarlılığı son derece yüksek olan beyin dokusunda iskemi sırasında, hücre düzeyinde giderek artan enerji eksikliği hücre içi asidoza neden olur. Bunun sonucunda proteinler ve nükleik asitler gibi makromoleküllerin sentezi durur. Hücre membranındaki iyon pompalarının çalışmaması sonucu hücre içi ve dışı iyon dengesi bozulur. Böylece hipoksantin ve ksantin gibi ATP yıkım ürünleri hücre içinde birikir. Tüm bu süreçlerin sonunda ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri hücrenin makromoleküllerini zedeleyerek hücre ölümüne neden olur (24,28).

Serbest oksijen radikalleri doğrudan oluşan nöron hasarının dışında hücre içinde apoptotik süreci ve ekzitotoksik nöron hasarını başlatan yolları aktive ederek hücre ölümüne yol açar. Apoptotik nöron ölümü in vitro ve invivo global-fokal iskemi/reperfüzyon modellerinde çalışılmıştır. Apoptozise, hücre içi yaşam/ölüm sinyal yollarının aktivasyonu neden olur. Hücre içi ölüm sinyal yolları mitokondri ve hücre ölüm reseptör ailesi ile ilişkilidir (27).

Mitokondrideki hücre ölüm sinyal yollarından biri olan sitokrom c, mitokondri membran proteinlerinden biridir ve aynı zamanda mitokondriyal solunum zincirinde yer alır. Geçici fokal iskemiye maruz bırakılmış serebral dokuda mitokondriden sitozolik

kompartmana salınır. Geçici global iskemiye maruz kalmış serebral dokuda hipokampal nöronlarda sitozolik sitokrom *c* artışı gözlenir. Sitokrom *c* CED-4 homolog, Apoptotik proteaz active edici faktor (Apaf-1), Deoksiadenozin Trifosfat ile etkileşerek apoptozomu oluşturur. Aynı zamanda aspartate-spesifik sistein proteaz'ı (kaspas-9) aktive eder. Sitokrom *c* ilişkili kaspas kaskadının başlangıcı olan kaspas-9 sırasıyla kaspas-3,-2,-6,-8 ve -10 aktive eder. Kaspas-3, kaspas-3 ilişkili Deoksiribonükleikaz proteaz'ı (DNAaz) aktive ederek DNA hasarına yol açar (21,24).



Resim 1. Serabral iskemi sonrası mitokondrideki oksidatif stres sinyalleri

Apoptozisin reseptör ailesi, tip 1 glikolize transmembran (FAS) reseptörleri ve Tümör Nekroz Faktör (TNF) ile ilişkilidir. Ekstraselüler Fas ligandı reseptöre bağlandığında bir adaptör protein olan Fas ilişkili ölüm domain proteini sentezlenir ve bu protein prokaspas-8'i aktive eder. Kaspas-8, kaspas-3, Poliadenindifosfat-riboz polimeraz (PARP) ve aktive Kaspas ilişkili Deoksiribonükleikaz (CAD) yoluyla DNA hasarı ilişkili hücre ölümüne neden olur²⁴. İskemi sonucu gelişen ekzitotoksik nöron ölümünde mekanizma eksitatör nörotransmitterler ile ilişkilidir. Nöronal hücrede ATP bağımlı iyon kanallarının iskemi sonucu çalışamaz hale gelmesi membran bütünlüğünde bozulmaya yol açar. Hücre içinde depolanmış durumda bulunan glutamat gibi ekstatör nörotransmitterlerin ortama salınması

ile glutamat konsantrasyonu 3-10 kat artar. Glutamatı hücre içine alan enerji bağımlı mekanizmaların da çalışmaması ile ortamda biriken glutamat, glutamat reseptör alttıpi olan N-Metil-D-Aspartat (NMDA) reseptörünün aktivasyonuna neden olur. NMDA reseptörünün aktivasyonu nöronda aşırı depolarizasyon oluşturur. Nöronda meydana gelen bu aşırı aktivasyon hücre içi iyon dengesini bozar ve hücre içinde aşırı kalsiyum birikmesi ile ekzitotoksik hücre ölümü meydana gelir (6,24,25).

Sonuç olarak; beynin vasküler yapıları ve parankim dokusu iskemi/reperfüzyon sonucu gelişen olayların kümülatif etkileri ile ortaya çıkan iskemi/reperfüzyon hasarına uğrar. Serebral kan akımındaki azalmanın beyin dokusundaki sonuçları Çizelge 2.3'de gösterilmiştir (1,6,22,25,26).

Tablo 3. İskemide serebral kan akımı düzeyindeki azalmaların dokuya etkileri

Serebral Kan Akımı (mL/100g/dk)	Dokudaki Etkisi
35-55	Bozulmuş protein sentezi
40-50	Selektif gen ekspresyonu (hsp-70 vb.)
25-35	Azalmış glukoz kullanımı
20-30	Uyarıcı amino asit salınımı, asidoz
15-30	ATP azalması
10-15	İyon denge kaybı ve anoksik depolarizasyon

2.3. Çalışmada Kullanılan Etken Maddeler

2.3.1. Ketamin

Ketamin medulla spinalisteki polisınaptik refleksleri, beynin bazı bölümlerinde uyarıcı nörotransmitter etkilerini inhibe eder. Formatio retikularisten gelen duyuşal uyarıları beyin korteksine gönderen talamusu duyuşal algılardan sorumlu limbik korteksten ayırır (dissosiasyon). Intravenöz (IV) ya da intramusküler (IM) yolundan kullanıldığında analjezi ve disosiyatif durum denilen katalepsiye benzeyen "çevreden kopma" durumuna neden olur. Ketamin yapısal olarak halüsinojen bir madde olan phencyclidine (PCP) analogudur. IV veya IM uygulanır. Maksimum plazma düzeyine IM enjeksiyonundan 10 -15 dakika sonra çıkar. Yağda tiyopentalden daha fazla çözünür, proteine düşük oranda bağlanır. Kalp debisini ve beyin kan akımını artırır. Dağılım yarı süresi kısadır (10 -15 dakika). Karaciğerde oluşan metabolitlerinin bir kısmı aktiftir. Yarılanma süresinin kısa oluşu (2 saat) yüksek hepatik atılımına bağlıdır. Biyotransformasyonun son ürünleri renal olarak atılır. Kan basıncını kalp debisini ve atım hızını artırır. Indirek kardiyovasküler etkileri sempatik stimülasyona bağlıdır. Uygulanan ketamin dozlarından solunum fazla etkilenmez. Ketamin güçlü bir bronkodilatördür (54).

2.3.2. Tiyopental

Sodyum tiyopental güçlü bir intravenöz anesteziik maddedir. Barbitürik asit derivesi olan barbitüratlar grubundadır. Retiküler aktivasyon sisteminde depresyon yaparlar. Anestezi indüksiyonunda genellikle IV olarak uygulanırlar. Proteine yüksek oranda bağlanmasına rağmen, yağda çok çözünmesi ve non iyonize fraksiyonunun fazla olması nedeniyle beyindeki en yüksek konsantrasyonuna 30 saniyede ulaşır. Karaciğerde suda çözünen ve aktivitesi olmayan maddelere dönüşürler. Proteine çok bağlanmaları, glomerüler klirensi azaltır. Yağda çok çözünmeleri ise renal tübüler reabsorbsiyonlarını artırır. Renal kan akımı ve glomerüler filtrasyon, kan basıncındaki düşme ile orantılı olarak azalır (39).

2.3.3. Propofol

Propofol intravenöz yoldan kullanılan anesteziik maddedir. Genel anesteziik etkisi gamma-aminobütirik asit inhibisyonunu kolaylaştırmasıyla açıklanır. Propofol (2,6 diisopropyl phenol) iki isopropil grubu bağlanmış bir fenol halkasıdır. Suda erimez. Soya yağı, gliserol ve yumurta lesitini emulsiyonunda (10 % soya yağı, 1.2 % yumurta fosfatidi,

2.25 % gliserol) eritilmiştir. Yağda kolay eridiğinden etkisi çok çabuk başlar. Dağılım yarı süresi 2 -8 dakikadır. Karaciğerdeki konjugasyonu sonucunda inaktif metabolitleri oluşur. Metabolitleri idrarla atılır.

Propofolün potansiyel antioksidan özelliği endojen antioksidan vitamin E' ye benzemektedir. Nöroprotektif etkisi de propofolün fenol halka yapısının antioksidan özelliği ile bağlantılı olabilir. Propofol lipid peroksil radikalleri ile etkileşir ve nisbeten daha stabil olan propofolfenoksi radikalleri oluşturarak, lipid peroksidasyonunu inhibe eder. Ayrıca propofol lipid peroksidasyonu başlamasında oldukça güçlü reaktif metabolit olan peroksinitriti temizler. Peroksinitrit bakterisidal olduğundan dolayı, propofolün peroksinitrit temizleyici etkisi, muhtemelen bu ilaca fagositoz suprese edici özellik kazandırıyor. Akut akciğer hasarı gibi peroksinitrit oluşumunun önemli olduğu hastalıklarda yaralı olabileceği gösterilmiştir (42).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Araştırma Sırasında Kullanılan Aygıtlar

-Cam Kalem

-Enjektör

-Fotoğraf makinesi

-Hassas Teraz

-Hayvan Kafesi

-Homojenizatör düzeneği

-Kronometre

-Lam

-Lamel

- Manyetik Karıştırıcı
- Mezür (25ml,50 ml,100 ml,250 ml,500 ml)
- Mikroskop
- Operasyon Takımı
- Otomatik pipet
- Pastör pipeti
- Pipet uçları (1000 ve 100)
- Soğutmalı santrifüj
- Spektrofotometre(Shimadzu UV-1601)
- Su Banyosu
- Vorteks
- Buzdolabı
- Buz Makinesi
- Distile Su
- Derin ucu
- pH metre

3.1.2. Araştırma sırasında kullanılan kimyasallar

NSE (Nürona spesifik Enolaz)

-% 30 H₂O₂

.HCl

- Formaldehit (HCHO)
- Metanol (CH₄O)
- Sodyumkarbonat (Na₂CO₃)
- .Sodyumhidroksit (NaOH)
- Sodyum- Potasyum tartarat (Na-K tartarat)
- Folin Cioacalteu
- Ketamin
- Sodyum Dodesil Sülfat(SDS)
- %20'lik Asetik Asit
- Tiyobarbitürik Asit
- Butanol
- Tiyopental
- Piridin
- Tris-Baz
- Tris-HCl
- Propofol
- Na₂ EDTA
- Ksantin
- CAPS
- .CuSO₄ (Bakır 2 Sülfat)

3.1.3. Ratlar

Bu çalışma Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulu onayı alınarak Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı tarafından, KSÜ Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışmalar standart deneysel hayvan çalışmalarına uygun olarak yapıldı. Deneylede kullanılan toplam 45 adet dişi Sprague-dawley cinsi sıçan KSÜ Tıp Fakültesi Deney hayvanları barınağından alındı. Sıçanlar 225 ± 20 gram ağırlığında 4-5 aylıktır. Sıçanlar $21\pm 1^{\circ}$ C oda sıcaklığında 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık periyodunda tutularak standart rat yemi ve su verilerek beslendi. Bir hafta adaptasyon süresi beklendikten sonra başlangıç ağırlıkları kaydedilmiştir ve deneye başlanmıştır. Deney sonunda sakrifiye edilerek beyin dokuları alınmıştır.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Deney grupları

Bu çalışmada, 45 adet Sprague-dawley cinsi rat kullanıldı.. Hayvanlar 5 eşit gruba ayrıldı. Ratlar supine pozisyonda sabitlendi. Servikal orta hattan basit bir insizyonla bilateral karotis kommunis arterler ortaya konacak ve her iki karotis kommunis, Yasargil anevrizma klip'leri ile 30 dk.süre ile kliplendikten sonra klipler açılarak reperfüzyon sağlanacak. Anestezik maddeler intraperitoneal yolla verilecek. Son olarak İskemiden 30 dakika sonra hayvanlar sakrifiye edilecek. Deney öncesi hayvanlar 24 saat aç bırakılacaktır.

1-Sham Grubu: Bu gruptaki hayvanlar servikal orta hatta bir insizyonla bilateral karotis komunis arterler ortaya çıkarılarak 30 dk. süre ile beklenildi ve kapatıldı. 30 dakika sonra hayvanlar sakrifiye edildi.

2-Kontrol Grubu : Bu gruptaki hayvanlar servikal orta hatta bir insizyonla bilateral karotis komunis arterler ortaya çıkarılarak 30 dakika boyunca anevrizma klipleri kullanılarak kliplendi ve klipler açılarak 30 dakika boyunca reperfüzyon sağlandı. 30 dakika sonra sakrifiye edildi.

3-Ketamin Grubu: Bu gruptaki hayvanlar bilateral karotis kommunis arterler 30 dakika boyunca anevrizma klipleri kullanılarak kliplendi ve klipler açılarak 30 dakika boyunca reperfüzyon sağlandı. Klipler açıldıktan 15 dakika sonra 20 mg/kg Ketamin intraperitoneal olarak verildi. 30 dakika sonra sakrifiye edildi.

4-Tiyopental Grubu: Bu gruptaki hayvanlar bilateral karotis kommunis arterler 30 dakika boyunca anevrizma klipleri kullanılarak kliplendi ve klipler açılarak 30 dakika boyunca reperfüzyon sağlandı. Klipler açıldıktan 15 dakika sonra Tiyopental 20 mg/kg intraperitoneal olarak verildi. 30 dakika sonra sakrifiye edildi.

5-Propofol Grubu: Bu gruptaki hayvanlar bilateral karotis kommunis arterler 30 dakika boyunca anevrizma klipleri kullanılarak kliplendi ve klipler açılarak 30 dakika boyunca reperfüzyon sağlandı. Klipler açıldıktan 15 dakika sonra 25 mg/kg Propofol intraperitoneal olarak verildi. 30 dakika sonra sakrifiye edildi.



Resim 2. Makroskobik görünümü



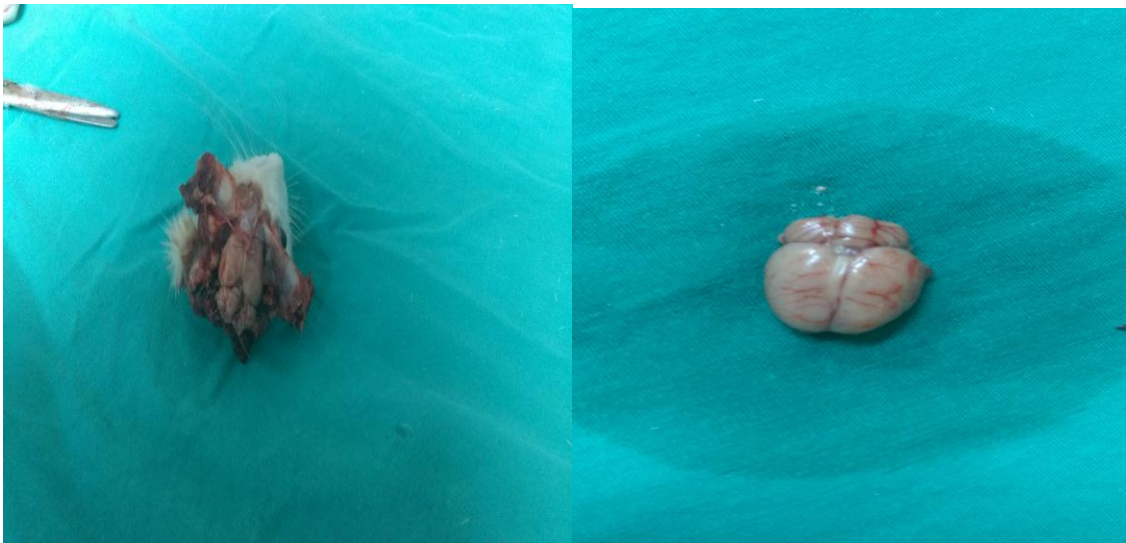
Resim 3. Bilateral karotis komunis arterler



Resim 4. Bilateral karotis komunis arterlerin klemlenmesi

3.3. Rat Beyin Dokusu

Sıçanlar servikal dislokasyon tekniği ile (sıçanı boyun kısmından tutup diğer elle kuyruk hızla çekilerek) öldürülmüştür. Daha sonra süratle bir pens ve makas yardımıyla memeler tek tek çıkarılmıştır. Ardından da beyin dokuları çıkarılmıştır. Taze dokulardan alınan belirli parçalardan biri ışık mikroskopik düzeyde incelenmesi için %10'luk formaldehit solüsyonuna konularak patoloji laboratuvarına gönderilmiştir. Geri kalan doku parçalarında biyokimyasal analizlerin yapılabilmesi için doku parçaları -70°C 'de muhafaza edilmiştir. Analiz zamanı geldiğinde beyin dokularının tartımını yapmadan önce kurutma kağıdı ile kurutulmuş, total dokular tartılıp, ağırlıkları kaydedilmiştir. Şekil 3.4.'de beyin dokusu çıkarılışı gösterilmiştir.



Resim 5. Beyin dokusunun çıkarılışı

3.4. Beyin Dokularının Histopatolojik İncelenmesi

3.4.1. Işık mikroskopik düzeyde incelenmesi

Taze alınan doku parçaları %10'luk formaldehidde fikse edilmiş ve rutin işlemlerden sonra 5 µm kalınlığındaki doku kesitleri Harris hematoxilen-eosin boyası ile boyanarak ışık mikroskopunda değerlendirilmiştir (51)

3.5. Beyin Dokularının Biyokimyasal İncelenmesi

3.5. 1. Homojenat hazırlama

Rat beyin dokuları çıkarılır çıkarılmaz buza konulmuştur. Kurutma kağıdı ile kurutulmuş, tartılmış ve ağırlıkları kaydedilmiştir. 1 g doku 5 hacim (hacim/ağırlık) soğuk %1.15 KCl ile bir buz kabı içinde homojenizatörde 15-20 dakika homojenize edilmiştir. Homojenat daha sonra +4 C'de 14000rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiş ve üstteki süpernatant'da protein ve MDA, NSE düzeyleri ile SOD ve CAT enzim aktive ölçümleri yapılmıştır.

3.6. Beyin Dokusunda Protein Düzeyinin Tayini

Bu metot proteinlerin içerdiği trozin ve triptofan rezidülerinin fosfotungustik – fosfomolibdik asit ile verdiği renk reaksiyonunun spektrofotometrik yöntemle 750 nm'deki absorbans ölçümüne dayanır.

3.6.1. Ayırıcılar

1. A çözeltisi:

%2 Na₂CO₃ 2 g hazırlanır

0,1 N NaOH ile 100 ml'ye tamamlanır.

2. B Çözeltisi: B₁ ve B₂ çözeltilerinden oluşur.

a) B₁ Çözeltisi:

% 1 CuSO₄.5H₂O 1g hazırlanır

Saf suyla 100 ml'ye tamamlanır.

b) B₂ Çözeltisi:

%2 Na-K tartarat 2g hazırlanır

Saf suyla 100 ml'ye tamamlanır.

3. C Çözeltisi(Günlük hazırlanır)

50 ml A + 1 ml B (0,5 ml B₁+0,5 ml B₂) karıştırılır.

4. D Çözeltisi (Günlük hazırlanır)

Folin Cioacaltea 1: 1,5 (v/v) oranında saf su ile sulandırılır .

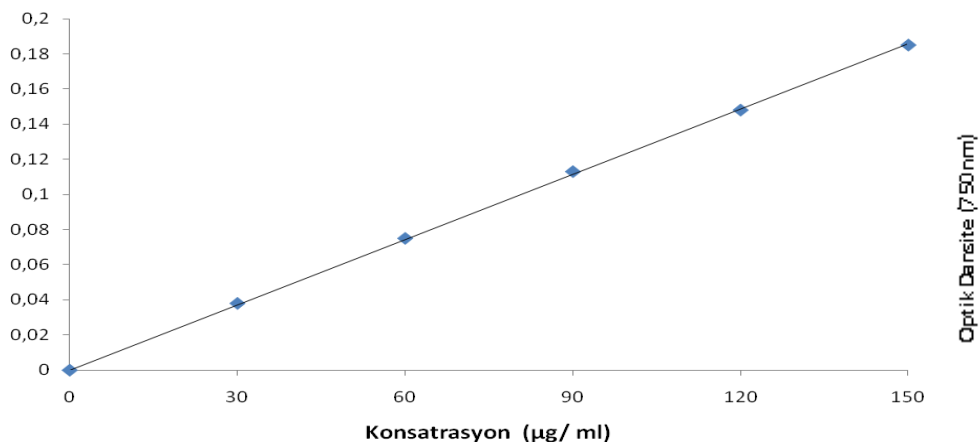
3.6.2. Standart eğrinin çizimi

Stok standart için 0,3 g/dl bovin albumin hazırlanır. Hazırlanan stok standarttan 5 ml alınıp 100 ml 'ye serum fizyolojik ile tamamlandığında 150 µg/ml konsantrasyon elde edilir. Bundan seri sulandırma ile 150, 120, 90, 60, 30 µg/ml' lik konsantrasyonlar elde edilerek 750 nm'de verdikleri absorbanslar kaydedilir. Bu verilere göre konsantrasyon-absorbans eğrisi çizilir ve her numune ölçümünde standart eğri tekrarlanır (Tablo 4.)

Tablo 4. Protein standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı

Tüp no	Kör	1	2	3	4	5
Konsantrasyon (µg/ml)	0	30	60	90	120	150
Standart bovin albumin (ml)	-	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Serum fizyolojik (ml)	0.3	-	-	-	-	-
C Çözeltisi (ml)	3	3	3	3	3	3
15 dakika oda ısısında bekletilir						
D Çözeltisi (ml)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3

Oda ısısında 30 dakika bekletilir ve 750 nm'de köre karşı okunur.



Şekil 4. Protein standart eğrisi

Doku Örnek Çalışması

Beyin dokularından hazırlanan süpernatant'da protein tayinini yapmak için, süpernatant 1: 50 oranında serum fizyolojik ile sulandırılır ve protein tayini yapılır. Bunun için üç tüp alınır ve çözeltiler aşağıdaki şekilde tüplere konulur.

Tablo 5. Doku örneğinde protein tayini için tüplerin hazırlanışı

	Kör (ml)	Standart (ml)	Örnek (ml)
Serum fizyolojik	0.3	-	-
Standart	-	0.3	-
Süpernatant	-	-	0.3
C Çözeltisi	3	3	3
15 dakika oda ısısında bekletilir			
D Çözeltisi	0.3	0.3	0.3

Oda ısısında 30 dakika bekletilir ve 750 nm'de köre karşı okunur.

3.6.3. Hesaplama

Doku örneğinin absorbansı standartın absorbansı ile karşılaştırılarak veya doğrudan standart eğrisinden değerlendirilir ve dilüsyon katsayısı ile çarpılarak sonuç verilir.

3.7. Beyin Dokusunda MDA Düzeyinin Tayini

Aerobik şartlarda pH 3.40'de tiyobarbitürik asit (TBA) ile örneğin 90-95 C°'de inkübasyonu sonucu oluşan lipit peroksidasyonunun sekonder ürünü olan MDA'nın TBA ile pembe renkli kompleks oluşturma esasına dayanır. Oluşan bu renk şiddeti ortamdaki MDA konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. 532 nm'de spektrofotometrik olarak değerlendirilir .

3.7.1. Ayıraçlar

1. SDS %8,1'lik

Sodyum Dodesil Sülfat(SDS)

2. Asetik Asit %20'lik (pH 3,5)

3. Tiyobarbitürik Asit(TBA) %0.8 lik

4. N-Butanol/Piridin Çözeltisi (14/1)(v/v)

5. Stok Standart 1.1.3.3 tetramethoksiopropan (yoğunluk =0.99 g/ml)

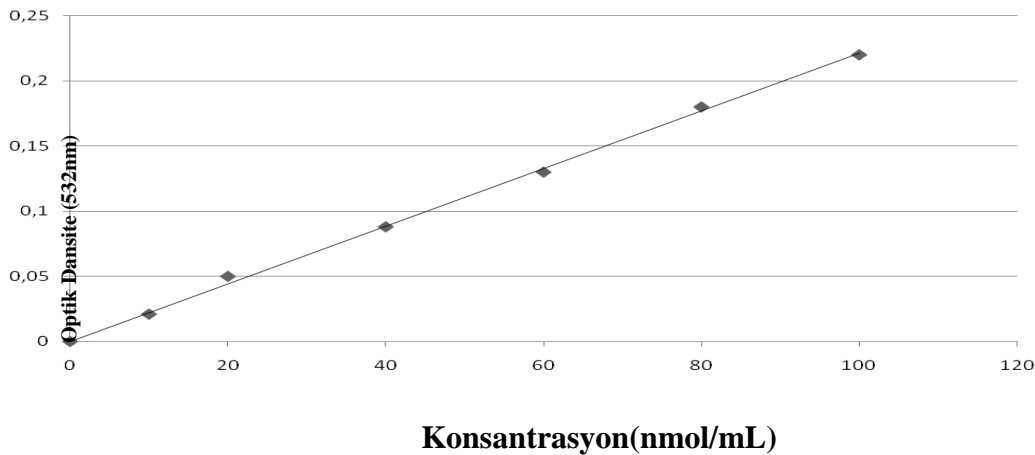
3.7.2. Standart eğri çizimi

Standart eğri çizimi yapılırken stok sandarttan 6,6 µl alınıp 100 ml'ye saf su ile tamamlanarak günlük standart hazırlanır. Daha sonra 10, 20, 40, 60, 80 ve 100 nmol/ml konsantrasyonunda çalışma standartları hazırlanır. Ayraçlar tüplere aşağıda belirtildiği şekilde ilave edilirler.

Tablo 6. MDA standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı

Tüp No.	0	1	2	3	4	5	6
Konsantrasyon(nmol/ml)	0	100	80	60	40	20	10
Standart(ml)	-	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
SDS (ml)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Asetik Asit (ml)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
TBA(ml)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Saf su (ml)	0.8	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
Vorteksle karıştırılır.60 dk 90 C° de inkübe edildikten sonra musluk suyu altında soğutulur.							
Saf su(ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
N-Butanol/Piridin	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Vorteksle karıştırılır.4000 rpm 'de 10 dakika santrifüj edilir.							

Tüpler n-Butanol /Piridin ilavesinden sonra iyice karıştırılır. Daha sonra 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir, üstteki organik kısım (üst faz) alınarak 532 nm'de absorbans fotometrik olarak okunur ve standart eğri grafiği çizilir (Şekil 5.)



Şekil 5. MDA (Malondialdehit) standart eğrisi grafiği

Dokuda MDA düzeyinin tayini için örnek çalışması yapılırken de yukarıdaki tabloda verildiği gibi tüpler belirli hacimde hazırlanır, doku örneği alınır ve MDA tayini yapılır. Ayrıntılı bilgi Tablo 7.'da gösterilmiştir.

Tablo 7. Doku örneğinde MDA düzeyinin tayini için tüplerin hazırlanışı

	Örnek	Standart	Kör
Homojenat(Örnek)	0.1 ml	-	-
Standart	-	0.1 ml	-
%8.1 SDS	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
%20 Asetik Asit	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml
%0.8 TBA (sulu)	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml
Saf su (ml)	0.7 ml	0.7 ml	0.8 ml
Vorteksle karıştırılır.60 dk 90 C°'de inkübe edildikten sonra musluk suyu altında soğutulur.			
Saf su (ml)	1 ml	1 ml	1 ml
N-Butanol/Piridin	5 ml	5 ml	5 ml

Tüpler n-Butanol /Piridin ilavesinden sonra iyice karıştırılır. Daha sonra 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir, üstteki organik kısım(üst faz) alınarak 532 nm'de absorbans fotometrik olarak okunur. Sonuç standart eğrisinden değerlendirilir.

3.7.3. Hesaplama

nmol/ml biriminden ölçülen MDA düzeyi hem nmol/mg protein birimlerinden verilmiştir.

$$\text{MDA Düzeyi (nmol/mg protein)} = \frac{\text{MDA değeri (nmol/ml)}}{\text{protein (mg/ml)}}$$

3.8. Beyin Dokusunda SOD Aktivite Tayini

Süperoksit dismutaz, oksidatif enerji üretimi sırasında oluşan toksik süperoksit radikallerinin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandırır. Bu yöntem, ksantin ve ksantin oksidaz kullanılarak oluşturulan süperoksit radikallerinin, 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolium klorid (piyodonitrotetra zolium viyole: INT) ile meydana getirdiği kırmızı renkli formazan boyasının 505 nm dalga boyunda verdiği optik dansitenin (OD) okunması esasına dayanmaktadır. Örnekte bulunan SOD, süperoksit

radikallerini ortamdan uzaklaştırarak 2 numaralı formazan reaksiyonunu inhibe eder. Sonuçta oluşan kırmızı rengin OD'si SOD yokluğunda oluşan renge göre azalır, bu aradaki farkın belirlenmesiyle de SOD aktivitesi ölçülür (58).

3.8.1. Ayıraçlar

1. CAPS Tamponu(3-sikloheksilamino)-1-propan sülfonik asit) (pH: 10.2)

50.00 mM CAPS 1.1065 gr

0.94 mM EDTA 0,035 gr

Doymuş NaOH 11.1 µl

Saf su ile 100 ml 'ye tamamlanır.

2. Substrat Karışımı

0.05 mM Ksantin 0,00076 gr

INT 0,00060 gr

Bu karışım CAPS tamponuyla 100 ml'ye tamamlanır.

3. 80 Ü/L Ksantin oksidaz

50 Ü Ksantin oksidaz 3.04 µl

Saf su ile 1 ml'ye tamamlanır.

4. 0.01 M Fosfat tamponu (pH:7 ayarlanır)

Na₂PO₄ 54.91 mg

NaH₂PO₄ 3.58 mg

Saf su ile 100 ml 'ye tamamlanır.

5. Standart (S6): 5,6 Ü/ml SOD içeren Ransod kitinin standardıdır.

3.8.2. Standart Eğri Çizimi

Liyofilize (hızlı dondurulmuş, mikroorganizma içermeyen, steril) olarak hazırlanmış SOD standardı 10 ml bidistile su ile sulandırılır. Standart eğri çiziminde kullanılacak olan diğer SOD derişimleri fosfat tamponuyla Tablo 8'deki gibi hazırlanır. 2-8 °C 'de saklandığında 2 hafta süreyle dayanıklıdır.

Tablo 8. SOD standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı

Kullanılacak Standartlar	Standart Solüsyonun Hacmi	M Fosfat Tamponunun Hacmi	SOD derişimi (Ü/ml)
S5	6 ml S6	5 ml	2.8
S4	5 ml S5	5 ml	1.4
S3	5 ml S4	5 ml	0.7
S2	3 ml S3	5 ml	0.23

S1: K r (fosfat tamponu)

Yöntem de; süperoksit dismutaz aktive tayini yapılırken, böbrek doku hücrelerinden hazırlanan süpernatantlar %30 ile %60 arasında % inhibisyon aralığı olacak şekilde 0.01 M

Tablo 9. Doku  rneğinde SOD standart eğri çizimi için kuvars küvetlerin hazırlanışı

	K�r (�l)	Standart(�l)
Standart	-	25
0.01 M Fosfat Tamponu	25	-
Substrat Karışımı	850	850
Küvetler iyice karıştırılır.		
Ksantin oksidaz	125	125

Ksantin oksidaz eklendikten sonra tekrar karıştırılır 30 saniye sonra çalışma k r n n ve standardın 37  C'de, 505 nm dalga boyunda havaya karşı başlangıç absorbansları (A₁) okunur. Aynı anda kronometre çalıştırılarak 3 dakika sonra son absorbansları (A₂) tekrar okunur.

3.8.3. Hesaplama

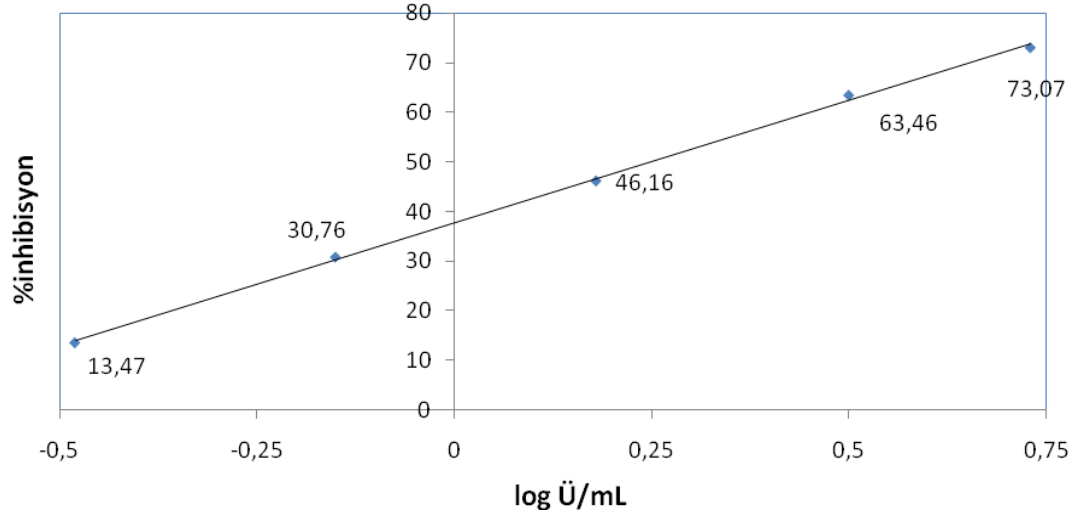
Çalışma k r  SOD içermediği için inhibisyona uğramamış reaksiyon olarak kabul edilir ve değeri %100 olarak alınır. Tüm standartlar için % inhibisyon değeri bunlara ait çalışma k r yle oranlanarak hesaplama yapılır.

$$\Delta A/\text{dak. standart} = A_2 - A_1 / 3 \text{ dakika}$$

$$\% \text{ inhibisyon standart} = 100 - \frac{\Delta A/\text{dak. standart} \times 100}{A \text{ çalışma k r }}$$

A  alışma k r 

Hesaplama yapıldıktan sonra x yatay eksenine SOD derişimlerinin (Ü/ml) logaritmik dönüşüm değerleri, Y (dikey) eksenine standartlara ait % inhibisyon değeri yazılarak standart eğri elde edilir.



Şekil 6. SOD standart eğrisi

Örnek Çalışması

Tablo 10. Doku örneğinde SOD aktivite tayini için kuvars tüplerin hazırlanışı

	Kör (µl)	Standart(µl)
Standart	-	25
0.01 M Fosfat Tamponu	25	-
Substrat Karışımı	850	850
Küvetler iyice karıştırılır.		
Ksantin oksidaz	125	125

Tüpler tekrar karıştırıldıktan 30 saniye sonra 37°C'de, 505 nm dalga boyunda havaya karşı başlangıç absorbands(A1) okunur. 3 dakika sonra absorbands (A2) tekrar okunur.

Hesaplama:

$$\Delta A/\text{dak. standart} = A_2 - A_1 / 3 \text{ dakika}$$

$$\% \text{ inhibisyon standart} = 100 - \frac{\Delta A/\text{dak. standart} \times 100}{\Delta A \text{ çalışma körü}}$$

$$\Delta A \text{ çalışma körü}$$

Örneğe ait hesaplanan yüzde inhibisyon değerine karşılık gelen SOD değeri standart eğri kullanılarak bulunur. Ü/ml biriminden ölçülen SOD aktivitesi Ü/mg protein birimi olarak verilmiştir.

$$\text{SOD spesifik aktivitesi}(\ddot{U}/\text{mg protein}) = \frac{\text{SOD aktivitesi} (\ddot{U}/\text{ml})}{\text{Protein (mg/ml)}}$$

3.9. Beyin Dokusunda CAT Aktivite Tayini

Katalaz, H_2O_2 'nin yıkımını katalize eder. H_2O_2 'nin CAT tarafından yıkım hızı, H_2O_2 'nin 230 nm'de ışığı absorbe etmesinden yararlanılarak spektrofotometrik olarak ölçülebilir (147).

3.9.1. Ayrıraçlar

1M Tris-HCl, 5mM Na_2 EDTA tamponu, pH 8.0

Tris-Baz	5.358 gr
Tris-HCl	8.787 gr
Na_2 EDTA	0.1461 gr

Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

1 M Fosfat tamponu, pH 7.0

K_2HPO_4	6.723 gr
KH_2PO_4	8.344 gr

Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

10 mM H_2O_2 %30' luk peroksitten 10 μl alınır ve 9.990 ml saf suyla tamamlanır.

Etanol (%95'lik)

3.9.2. Standart eğri çizimi

Katalaz aktivite tayini için, doku süpernatanı 1: 50 oranında saf su ile sulandırılır ve 1 ml'sine 20 μl saf etanol ilave edilir, karıştırılır ve aktivite tayini yapana kadar tüplerin ağzı kapalı bekletilir. Deneye başlamadan önce, günlük olarak hazırlanan 10 mM H_2O_2 konsantrasyonunun doğru ayarlanıp ayarlanmadığı fosfat tamponu ile kontrol edilir. Bunun için fosfat tamponu 1: 10 oranında saf su ile sulandırılabilir. Ayarlanma yapılırken 1ml'lik küvete 900 μl saf su 100 μl fosfat tamponu koyulur karıştırılır ve bu karışımın 900 μl ' 230 nm'de fotometrik olarak okunur OD_1 olarak kaydedilir. Daha sonra aynı küvete hazırladığımız 10 mM 'lık peroksitten (H_2O_2) 100 μl koyulur ve tekrar okuma yapılır absorbans değeri OD_2 olarak kaydedilir. $\text{OD}_2 - \text{OD}_1 = 0.071$ olmalıdır. Bu değer bulunduktan sonra hazırlanan peroksidin konsantrasyonu tam 10 mM'dır denilir ve deneye aşağıda gösterildiği gibi başlanır.

Tablo 11. Doku örneğinde CAT aktivite tayini için kuvars küvetlerinin hazırlanışı

	Kör (µl)	Numune (µl)
1M Tris-HCl, 5mM Na ₂ EDTA tamponu, pH 8.0	50	50
10 mM H ₂ O ₂	-	900
Saf su	930	30
37 °C’de 10 dakika inkübe edilir.		
Örnek (sulandırılmış)	20	20

Tüpler 37 °C’de 10 dakika inkübe edildikten sonra daha önce 1:5 0 oranında dilüe ettiğimiz örnekten 20 µl alınarak tüplere ilave edilir ve 230 nm’de 2,5 dakika kinetik okuma yapılır. Her numune teker teker çalışılarak kaydedilir (56).

3.9.3. Hesaplama

$$\text{CAT Aktivitesi (Ü/ml)} = \frac{\Delta\text{OD} \times V_T (1.0 \text{ ml})}{0.071 \times V_H (0.02 \text{ ml})}$$

ΔOD: Dakikadaki optik dansite değişimi

VH: Örnek hacmi VT: Toplam hacim

0.071: 10mM H₂O₂ yıkım hızının verdiği OD değeridir.

Ü/ml biriminden ölçülen CAT aktivitesi örnekte saptanan protein değerine bölünerek dokudaki enzim spesifik aktivite sonucu Ü/mg protein biriminden verilir.

$$\text{CAT Spesifik Aktivitesi (Ü/mg protein)} = \frac{\text{CAT Değeri (Ü/ml)}}{\text{Protein (mg/ml)}}$$

3.10. Beyin Dokusunda NSE Düzeyinin Tayini

NSE, Dia Metra marka ELISA kiti kullanılarak ELİZA cihazında ölçüldü. Standart, kontrol, numune örnekleri ve konjugat kuyucuklara eklendi. Mevcut NSE biotinize antikora bağlandı. Bağlanmayanlar yıkandıktan sonra TMB-subtrat eklendi.15 dakika inkübasyonun ardından NSE konsantrasyonu ile orantılı renk değişimi oldu ve reaksiyon asidik solüsyon eklenerek durduruldu. Rengin yoğunluğu 450 nm de ölçüldü. Absorbanslar NSE

konsantrasyonuyla doğru orantılıydı. Standart NSE konsantrasyonlarına karşılık gelen absorpsiyon değerleri ile standart eğrisi çizildi. Bu standart eğrisi kullanılarak numunelerin NSE konsantrasyonları ng/ml cinsinden hesaplandı.

3.11. İstatistik

Sonuçlar ortalama \pm SD olarak verildi ve istatistik değerlendirmeler için gruplar arasındaki karşılaştırmalarda Kruskal-Wallis testi, ikili karşılaştırmaların değerlendirilmesinde ise Mann-Whitney U testi kullanıldı, $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi

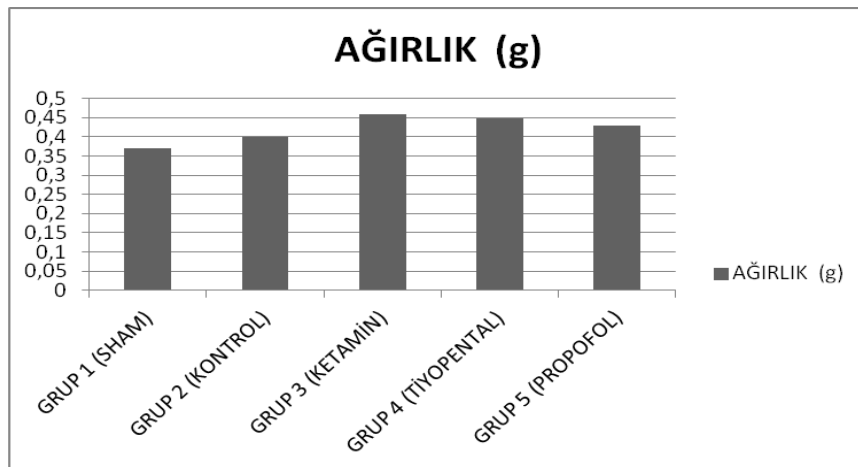
4.BULGULAR

4.1 Ağırlık

Tüm grupların beyin ağırlıkları Tablo 12’ de gösterilmiştir.

Tablo 12. Tüm grupların beyin ağırlıkları

n	Ağırlık(g)		
	n	Ort \pm SD	Min-Max
GRUP 1 (SHAM)	9	0,371 \pm 0,090	0,24-0,50
GRUP 2 (KONTROL)	9	0,401 \pm 0,80	0,26-0,51
GRUP 3 (KETAMİN)	9	0,459 \pm 0,067	0,34-0,58
GRUP 4 (TİYOPENTAL)	9	0,447 \pm 0,135	0,23-0,64
GRUP 5 (PROPOFOL)	9	0,430 \pm 0,066	0,36-0,54



Şekil 7. Gruplar arası beyin dokusu ağırlık düzeyleri

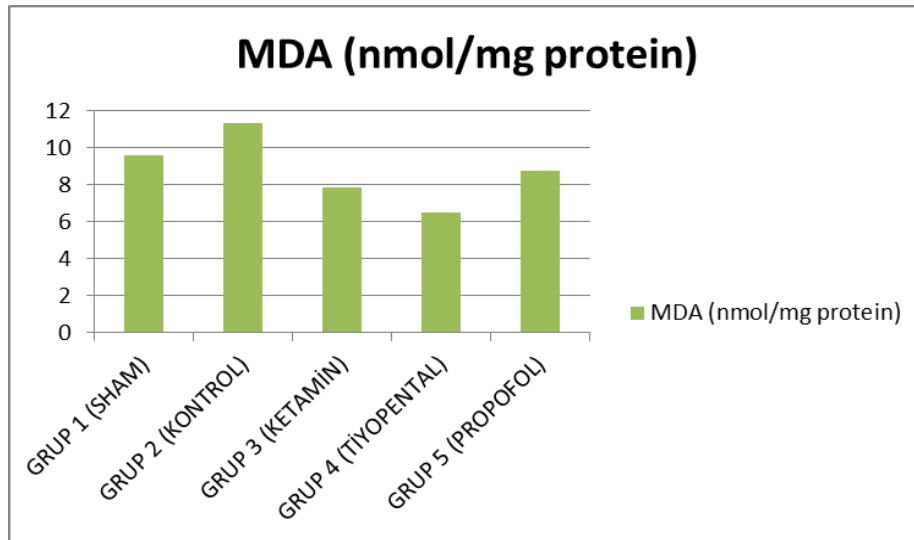
4.2. MDA değerleri üzerine etkiler

Tablo 13. : Gruplarda beyin dokusunda MDA düzeyleri

n	MDA (nmol/mg protein)		
	n	Ort ± SD	Min-Max
GRUP 1 (SHAM)	9	9,575±4,729	2,46-18,93
GRUP 2 (KONTROL)	9	11,327±4,241	5,63-18,14
GRUP 3 (KETAMİN)	9	7,862±1,279	6,58-10,22
GRUP 4 (TİYOPENTAL)	9	6,504±1,323	3,76-7,99
GRUP 5 (PROPOFOL)	9	8,761±3,413	4,99-17,39

Gruplar arasındaki MDA düzeyleri kıyaslandığında;

- Grup 2. ile Grup 1. arasında MDA aktivitesi bakımından anlamlı fark saptanmadı. (p=0,064)(p>0,05)
- Grup 1. ile Grup 3. , Grup 4. ve Grup 5. arasında MDA aktivitesi bakımından anlamlı farklılıklar saptandı. p=0,034 , p=0,041 , p=0,007 (p<0.05)
- Grup 2. ile Grup 3. , Grup 4. ve Grup 5. arasında MDA aktivitesi bakımından anlamlı fark saptanmadı. p=0,650 , p=0,257 , p=0,07 (p>0.05)
- Grup 3. ile Grup 4. ve Grup 5. arasında MDA aktivitesi bakımından anlamlı fark saptanmadı. p=0,496 , p=0,112 , (p>0.05)
- Grup 4. ile Grup 5. arasında MDA aktivitesi bakımından anlamlı fark saptanmadı. p=0,326 (p>0.05)



Şekil 8. Gruplar arası MDA düzeyleri

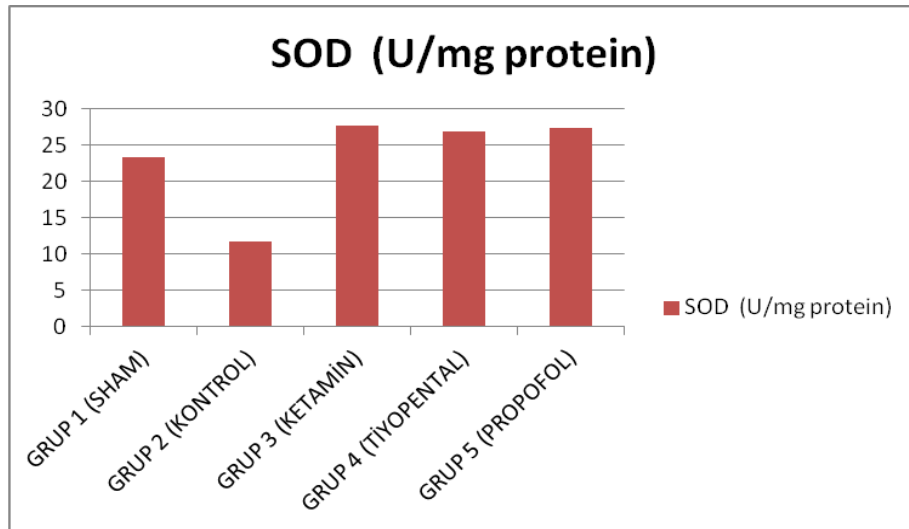
4.3. SOD aktivitesi üzerine etkileri

Tablo 14. Gruplarda beyin dokusunda SOD düzeyleri

	n	SOD (U/mg protein)	
		Ort ± SD	Min-Max
GRUP 1 (SHAM)	9	23,311± 7,689	13,66-38,03
GRUP 2 (KONTROL)	9	11,658± 2,766	7,26- 17,16
GRUP 3 (KETAMİN)	9	27,753±25,767	8,25-82,84
GRUP 4 (TİYOPENTAL)	9	26,808±15,809	15,42-59,64
GRUP 5 (PROPOFOL)	9	27,382±12,431	9,81-49,62

Gruplar arasındaki SOD düzeyleri kıyaslandığında;

- Grup 1. ile Grup 2. arasında SOD aktivitesi bakımından anlamlı farklılıklar saptandı. $p=0,001$, ($p<0.05$)
- Grup 1. ile Grup 3. arasında SOD aktivitesi bakımından anlamlı bir fark saptanmadı. $p=0,199$ ($p>0.05$)
- Grup 2. ile Grup 4. arasında SOD aktivitesi bakımından anlamlı fark saptanmadı. $p=0,880$ ($p>0.05$)
- Grup 4. ile Grup 5. arasında SOD aktivitesi bakımından anlamlı fark saptanmadı. $p=0,762$ ($p>0.05$)
- Grup 3. ile Grup 4. arasında SOD aktivitesi bakımından anlamlı fark saptanmadı. $p=0,226$, ($p>0.05$)



Şekil 9. Gruplar arası SOD düzeyleri

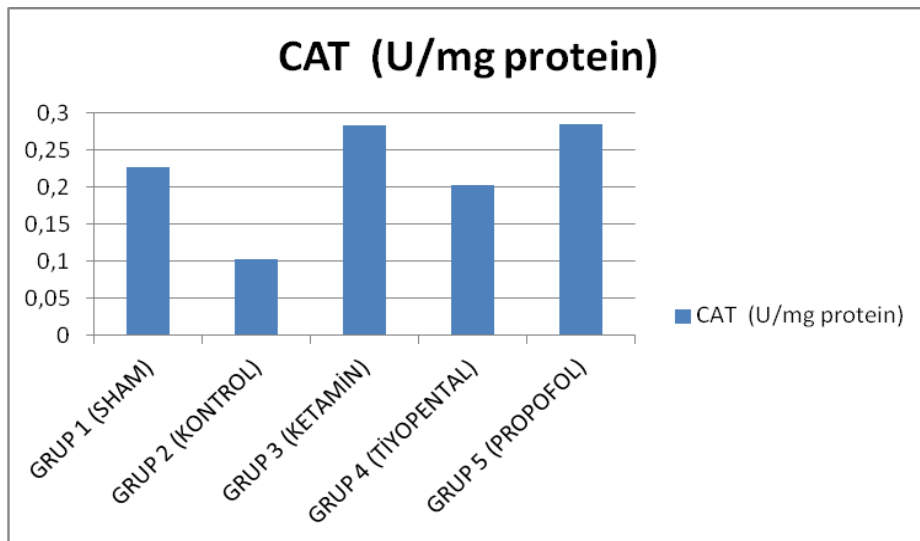
4.4. Katalaz aktivitesi üzerine etkiler

Tablo 15. Gruplarda beyin dokusunda CAT düzeyleri

	n	CAT (U/mg protein)	
		Ort ± SD	Min-Max
GRUP 1 (SHAM)	9	0,227± 0,111	0,09-0,40
GRUP 2 (KONTROL)	9	0,103±0,154	0,08-0,57
GRUP 3 (KETAMİN)	9	0,284±0,131	0,15-0,51
GRUP 4 (TİYOPENTAL)	9	0,203±0,121	0,07-0,40
GRUP 5 (PROPOFOL)	9	0,285±0,142	0,16-0,70

Gruplar arasındaki CAT düzeyleri kıyaslandığında;

- Grup 1. ile Grup 2. , Grup 3. ve Grup 4. arasında CAT aktivitesi bakımından anlamlı fark saptanmadı. $p=0,240$, $p=0,161$, $p=0,543$ ($p>0.05$)
- Grup 1. ile Grup 5. arasında CAT aktivitesi bakımından anlamlı farklılıklar saptandı. $p=0,015$ ($p<0.05$)
- Grup 2. ile Grup 4. arasında CAT aktivitesi bakımından anlamlı fark saptanmadı. $p=0,111$ ($p>0.05$)
- Grup 3. ile Grup 5. arasında CAT aktivitesi bakımından anlamlı fark saptanmadı. $p=0,069$ ($p>0.05$)
- Grup 4. ile Grup 5. arasında CAT aktivitesi bakımından anlamlı farklılıklar saptandı. $p=0,012$ ($p>0.05$)



Şekil 10. Gruplar arası CAT düzeyleri

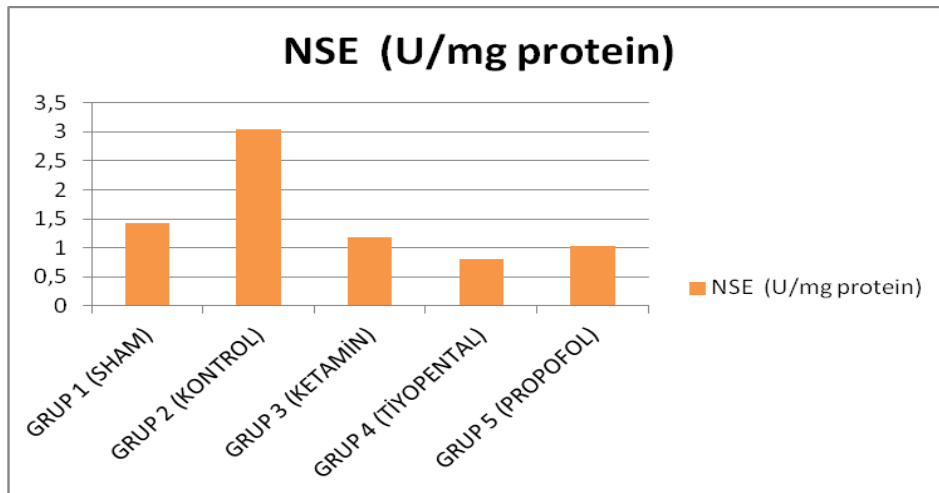
4.5. Nörona spesifik enolaz aktivitesi üzerine etkiler

Tablo 16. Gruplarda beyin dokusunda NSE düzeyleri

	n	NSE (U/mg protein)	
		Ort ± SD	Min-Max
GRUP 1 (SHAM)	9	1,431± 0,179	0,013-1,538
GRUP 2 (KONTROL)	9	3,048± 1,166	2,261- 5,160
GRUP 3 (KETAMİN)	9	1,175±0,025	0,525-1,254
GRUP 4 (TİYOPENTAL)	9	0,808±0,015	0,154-1,034
GRUP 5 (PROPOFOL)	9	1,031±0,013	0,718-1,209

Gruplar arasındaki NSE düzeyleri kıyaslandığında;

- Grup 1. ile Grup 2, arasında NSE aktivitesi bakımından anlamlı fark saptandı. $p=0,603$, ($p>0.05$)
- Grup 1. ile Grup 3, 4, ve 5. arasında NSE aktivitesi bakımından anlamlı fark saptanmadı. $p=0,341$, $p=0,211$, $p=0,443$ ($p>0.05$)
- Grup 2. ve Grup 3, 4, ve 5. arasında NSE aktivitesi bakımından anlamlı fark saptanmadı. $p=0,307$, $p=0,117$, $p=0,431$ ($p>0.05$).
- Grup 3 ile Grup 4. arasında NSE aktivitesi bakımından anlamlı farklılıklar saptandı. $p=0,035$ ($p<0.05$)
- Grup 3. ile Grup 5. arasında NSE aktivitesi bakımından anlamlı fark saptanmadı. $p=0,069$ ($p>0.05$)
- Grup 4. ile Grup 5. arasında NSE aktivitesi bakımından anlamlı farklılıklar saptandı. $p=0,024$ ($p<0.05$)



Şekil 11. Gruplar arası NSE düzeyleri

4.6. Histopatolojik Analiz Sonuçları

4.6.1. Sham grubu: Sol beyin lobunda hafif iskemik nekroz ve kapiller vasküler yapılarda proliferasyon gözlenirken (Resim 6.), Sağ beyin lobunda hafif iskemi ve hafif reaktif değişiklikler gözlendi (Resim 7.)

4.6.2. Kontrol grubu: Belirgin iskemik nekroz çevresinde reaktif değişiklikler ve kapiller damar proliferasyonu gözlenirken (Resim 8.), sağ beyin lobunda fokal iskemi ve çevresinde glial ve endotelyal hücre proliferasyonu (Resim 9.) gözlendi.

4.6.3. Ketamin grubu: Sol beyin lobunda santral sinir dokusunda hafif iskemik değişiklikler ve hafif reaktif glial hücre proliferasyonu gözlenirken (Resim 10.), Sağ beyin lobunda hafif iskemik değişiklikler, çevrede reaktif morfolojik bulgular gözlendi (Resim 11.).

4.6.4. Tiyopental grubu: Sol beyin lobunda İskemi çevresinde gliaafif I hücreler hiperplazik, çevre beyin dokusunda ayrıca hafif konjesyon gözlenirken (Resim 12.), Sağ beyin lobunda çok hafif iskemik değişiklikler, tam bir nekroz izlenmedi, hafif reaktif glial hücre hiperplazisi gözlendi (Resim 13.).

4.6.5. Propofol grubu: Sol beyin lobunda beyinde hafif iskemik hasarlanma, iskemik bölge çevresinde glial hücre hiperplazisi, çevre dokuda hafif konjesyon gözlenirken (Resim 14.), Sağ beyin lobunda beyin dokusunda çok hafif iskemik değişiklikler, hafif glial hücre proliferasyonu, hafif vasküler proliferasyon gözlendi (Resim 15.).

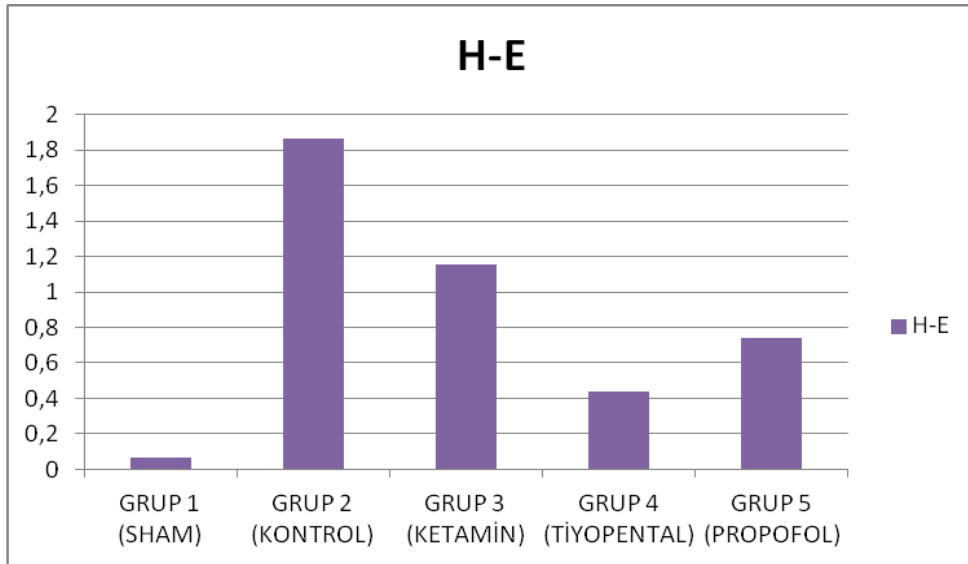
4.7. Beyin Dokusunun H-E Skorları

Grupların histopatolojik analizinde sham grubunda hasar oluşmazken, kontrol grubu en fazla hasarın gözlendiği grup olmuştur. Beyin dokusunun Hematoksilen–Eosin ile boyanıp incelenmesi ile elde edilen skorların ortalama değerleri: Sham grubunda 0,0651; Kontrol grubunda 1,8630; Ketamin grubunda 1,1542; Tiyopental grubunda 0,4361; ve Propofol grubunda 0,7392 olarak saptanmıştır (Tablo 17.)

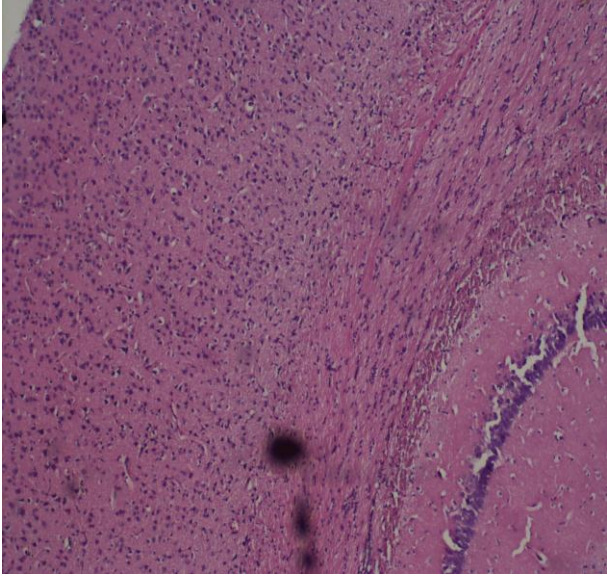
Tablo 17. Gruplarda beyin dokusunda H-E düzeyleri

	*Sham	Kontrol	*Ketamin	*Tiyopentan	*Propofol
Ortalama	0,0651	1,8630	1,1542	0,4361	0,7392
Standart Sapma	0,2340	0,6543	0,5120	0,532	0,6024
Min-Max	(0-1)	(0-3)	(0-2)	(0-2)	(0-3)

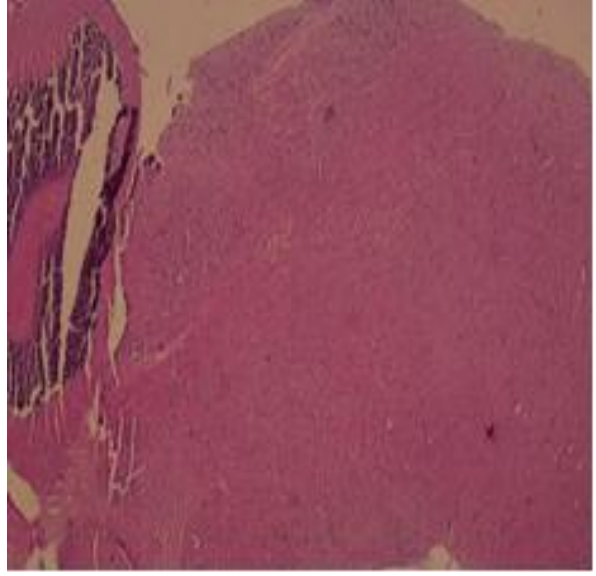
*: Kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha iyi sonuç ($p<0.05$)



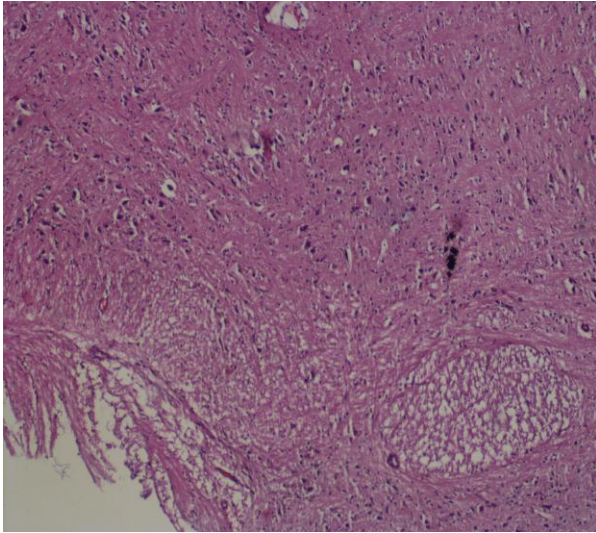
Şekil 12. Gruplar arası H-E düzeyleri



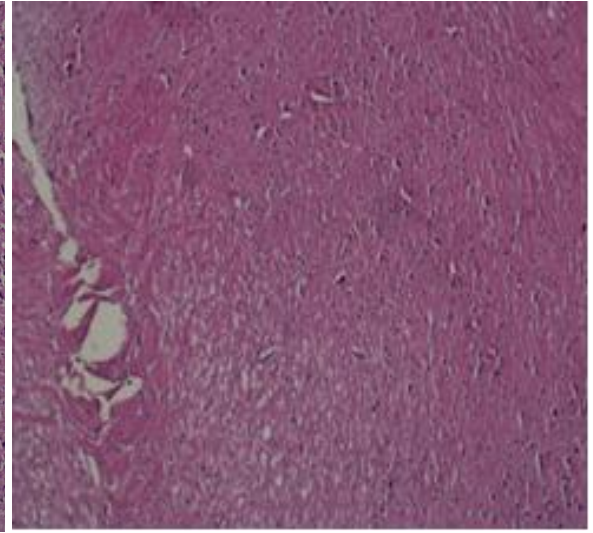
Resim 6. Sham Grubu Sol Beyin
Lobu (H&E x100)



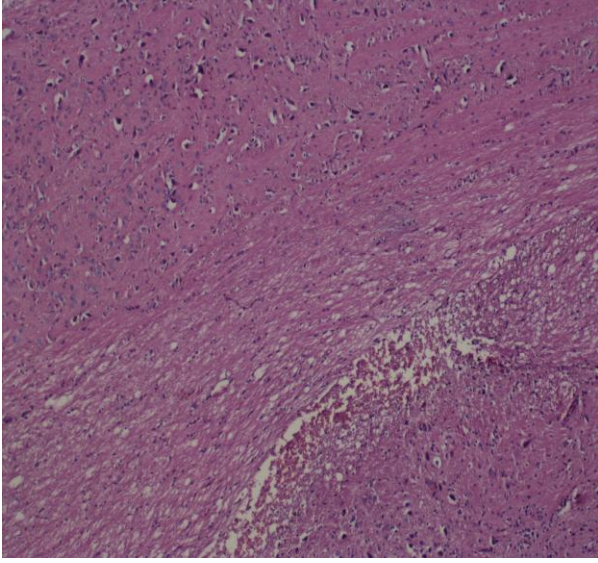
Resim 7. Sham Grubu Sağ Beyin
Lobu (H&E x100)



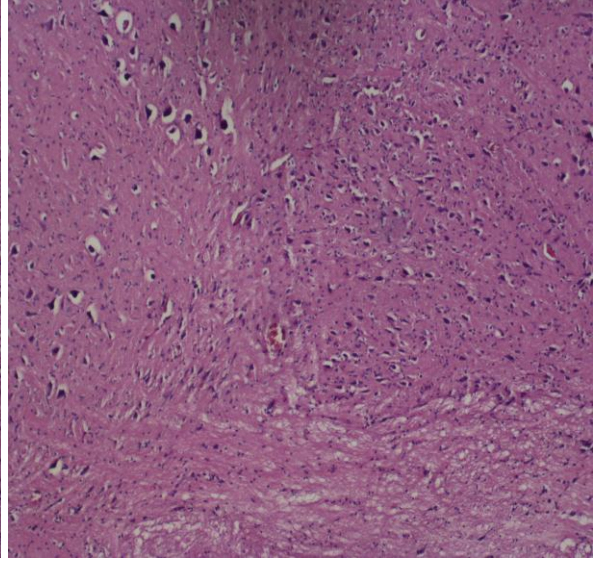
Resim 8. Kontrol Grubu Sol Beyin
Lobu (H&E x100)



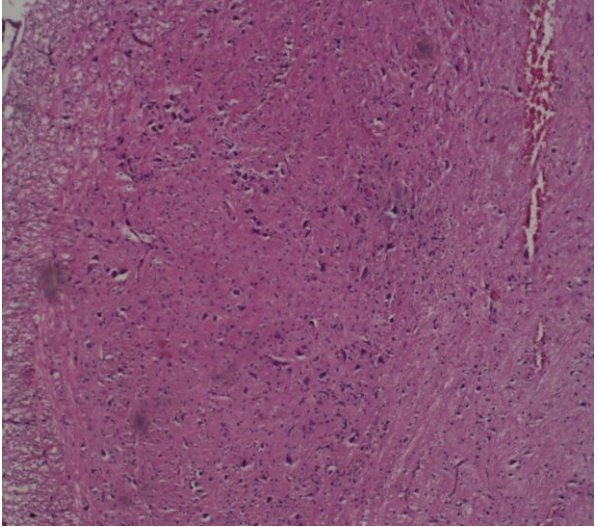
Resim 9. Kontrol Grubu Sağ Beyin
Lobu (H&E x100)



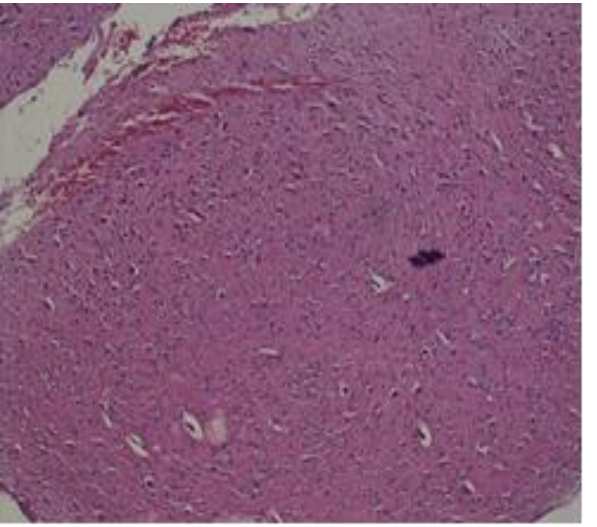
Resim 10. Ketamin Grubu Sol Beyin
Lobu (H&E x100)



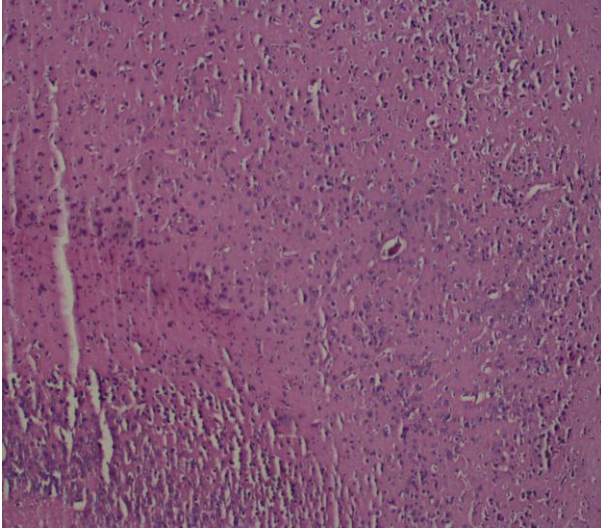
Resim 11. Ketamin Grubu Sağ Beyin
Lobu (H&E x100)



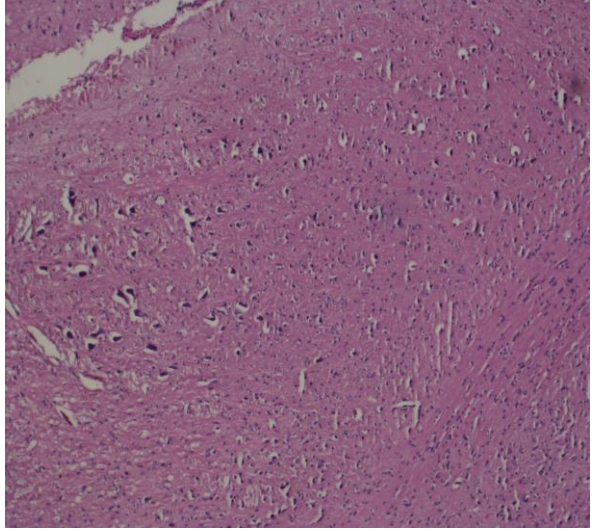
Resim 12. Tiyopental Grubu Sol Beyin
Lobu (H&E x100)



Resim 13. Tiyopental Grubu Sağ Beyin
Lobu (H&E x100)



Resim 14. Propofol Gurbu Sol Beyin
Lobu (H&E x100)



Resim 15. Propofol Gurbu Sağ Beyin
Lobu (H&E x100)

5.TARTIŞMA

İ/R hasarı pek çok cerrahi girişim sonrası karşılaşılan ve dokuda hasar oluşturan ciddi bir durumdur (72). İskemi sonrası esas hedef reperfüzyonun sağlanması iken bu durum her zaman için olumlu sonuçlar doğurmamakta aksine reperfüzyonun başlaması doku hasarını indükleyebilmektedir (73). İskemi, reperfüzyon ve no-reflow fenomeni cerrahi sırasında doku hasarının potansiyel kaynaklarıdır (74). Arkus aorta anevrizmalarının tamiri serebral dolaşımın geçici süre kesilmesini içeren girişimlerle mümkün olabilmektedir. Ancak, merkezi sinir sistemi anoxia'ya oldukça duyarlı olduğu için bu ameliyatlar sonrası oluşabilecek nörolojik hasar en korkulan komplikasyonlardır (75). Bu esnada oluşan serebral iskemiden beyini korumak amacıyla; hipotermik arrest, selektiv serebral perfüzyon ve retrograd serebral perfüzyon gibi stratejiler geliştirilmiştir (76,77). Ancak dolaşımın yeniden sağlanması da hasarı artırabilmektedir. Serebral iskemi de beyin kan akımında azalma ile enerji açığının tetiklediği moleküler olayları başlatmaktadır. Glukoz metabolizmasında değişiklikler oluşur, ATP ve fosfokreatin gibi enerji metabolitlerinin düzeyi azalır, laktat düzeyleri ise artar. Bunun sonucunda metabolik dengesizlik meydana gelir. ATP'deki azalma membran depolarizasyonuna ve geçirgenliğinde bozulmaya yol açarak hücre içinde sodyum, kalsiyum, klor, hücre dışında ise potasyum seviyelerinde artmaya neden olur. Böylece hücre dışına glutamat, glisin ve GABA salınır (78,79). Glutamat, NMDA kanallarını aktive ederek hücre içi kalsiyum artışına neden olur. Hücre içi kalsiyum birikimi de NO oluşumuna neden olan NOS yolunun aktivasyonu ile serbest radikal oluşumunu uyarır. NMDA reseptörlerinin aşırı aktivasyonu da apoptozise giden olayları başlatmaya katkıda bulunur (80,81). Deneysel çalışmalarda birçok ilaçla bu apoptotik süreci azaltmak veya yavaşlatmak, reperfüzyonla da bir kısım fonksiyonların tekrar kazanılması hedeflenmiştir. Serebral İ/R hasarı patogenezinde SOR'un önemli rolü vardır. Son yıllarda, serebral korumayı artırmak amacıyla İ/R hasarını önleme veya azaltma üzerine olumlu etkileri olduğu bilinen antioksidanlar kullanılmaktadır. Ancak ketamin, tiyopental, propofol gibi çeşitli anesteziik maddelerin beyinde İ/R hasarını önlemedeki etkilerininin ne olduğuna dair çalışmalar bulunmamaktadır. Biz de deneysel serebral İ/R modelinde oluşan hasarı ve bu hasarı önlemede anesteziik maddelerin etkisini biyokimyasal ve histopatolojik olarak araştırdık.

Serbest radikal ilişkili reperfüzyon hasarını araştırdığımız bu çalışmada; biz de ratlarda oluşturduğumuz deneysel İ/R modelinde serebral İ/R hasarını araştırdık. Çalışmada Wistar tipi erkek sıçanlar kullanıldı. Ağırlıkları ortalama 225±20 gramdı. Denek olarak sıçan

seçilmesinin nedeni; dayanıklı olmaları, kolay bulunabilir olmaları ve İ/R modellerinde sık olarak kullanılmalarıydı.

İ/R süresi çeşitli organlar için değiştiği gibi, beyin için de farklı çalışmalarda farklı süreleri uygulayan modeller mevcuttur. Beyinde 10 dakika gibi kısa bir sürede iskemik hasarın oluştuğunu ve reperfüzyon hasarının oluşması için de 15 dakikalık bir sürenin yeterli olduğunu gösteren yayınlar vardır (82, 83). Biz de 30 dakikalık iskemiye takiben 30 dakikalık reperfüzyon ile hasar oluştuğunu gözlemledik.

Araştırmamızda kullandığımız etken maddeler ketamin, tiyopental ve propofol klinikte halen anestezi indüksiyonu ve idamesinde kullanılan maddelerdir. Bunlardan propofol'un klinikte kullanılan formları %10'luk lipid emülsiyonları halinde hazırlanmış preparatlardır. Bu maddelerin İ/R hasarına etkilerini araştırdık. Darendelioğlu, ekstremitelerde İ/R hasarı ile ilgili çalışmasında ketamin ve propofolun hem anestezi dozda hem de subanestezi dozda verildiklerinde İ/R hasarına karşı koruyucu etkiler gösterdiğini ifade etmiştir ancak en belirgin etkileri subanestezi dozlarında izlenmiştir (20). Biz çalışmamızda ketamini 20 mg/kg, tiyopentali 20 mg/kg ve propofolu 25 mg/kg subanestezi dozlarında IP yolla uyguladık. Reperfüzyonun erken fazı olan ve en çok hasar verdiği ilk saatte maksimum etkilerinden faydalanılması amaçlandı. Bu amaçla reperfüzyondan 15 dakika önce bu etken maddeler uygulandı.

Post-iskemik hasar iki basamakta olmaktadır; kan akımının ve ATP'nin azaldığı iskemik dönem ve iskemiye takip eden reperfüzyon dönemi. Yapılan çalışmalar iskemik hasarın önemli bir kısmının oksijen metabolitlerince reperfüzyon safhasında oluştuğunu göstermiştir. Günümüzde SOR aracılığı ile olan hasara ilgi artmıştır (87).

Serebral iskemide oksidatif stresi belirlemede birçok metod kullanılmıştır. Literatürde serebral iskemi modellerinde oksidan ve oksidatif stres düzeylerinin arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur (17). Bugüne kadar, serebral İ/R uygulanan sıçanlarda oksidan/antioksidan durum ve NSE üzerine anestezi maddelerin etkilerini bildiren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda, antioksidan özellikleri iyi bilinen bazı intravenöz anesteziğin (ketamin, propofol, tiyopental) kullanıldı. Bununla birlikte, bazı intravenöz anesteziğin ajanlar SOR üretimini arttırdığı ve doku hasarına neden olduğu gösterilmiştir. Intravenöz anesteziğin ajanlar mitokondride hücre içi sitokrom p450, peroksidazlar ve enzimatik sistemleri değiştirerek tarafından serbest radikalleri oluşturur.

Ayrıca, serbest radikalleri yoluyla hücreleri koruyan enzimatik ve enzimatik olmayan sistemler inhibe eder düzeylerini azaltırlar. Onlar lipid peroksidasyonuna, DNA hasarına ve oksidatif hasarı uyararak proteinlerde değişikliğe neden olur ki, bu, indirgenmiş gap junction- aracılı iletim, transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu (AP-1, NF-kB), hücre içi kalsiyum ve pH değişikliği, ve / veya hücre ölümü gibi hücrel işlevlerde değişikliklere yol açabilir, (6-9, 18). Intravenöz anestezi maddeler sağlıklı bireylerde bir cerrahi olmaksızın % 30 azalma hepatic kan akışının azalmasına neden olduğu gösterilmiştir. Bahsedilen tüm anestezi maddeler oksidatif hasarı artırmaktadır. Hücre hasarına eşlik eden temel mekanizma SOR'a bağlı lipid peroksidasyonudur ve MDA, lipid peroksidasyonunun son ürünüdür. Üstelik, MDA oksidatif hasarın majör göstergesi'dir. Çalışmamızda hasarı göstermek ve kullandığımız maddelerin hasarı azaltmadaki etkilerini karşılaştırmak için beyin dokusu MDA düzeylerini çalıştık. Saptadığımız MDA düzeylerine baktığımızda ortalama en yüksek MDA değerinin kontrol grubunda olduğunu tespit ettik. Sham, ketamin, tiyopental ve propofol gruplarının MDA düzeylerinin ise kontrol grubuna göre belirgin derecede düşük olduğunu saptadık ($p<0,05$). Bu bulgular neticesinde ketamin, tiyopental ve propofolun serbest radikal kaynaklı lipid peroksidasyonunu belirgin olarak azalttığını söyleyebiliriz

Serbest radikaller oksidatif metabolizma sırasında oluşur, ancak genelde iyi kontrol edilir. Bu kontrolde CAT ve SOD gibi önemli intraselüler antioksidan savunma enzimleri rol oynar. SOD superoksiti hızlıca hidrojen peroksite katalizler. H_2O_2 ise katalaz tarafından su ve oksijene indirgenir. Bu enzimlerin seviyelerinin ölçümü serbest radikal aracılı hasar konusunda indirek bilgi verir.

Çeşitli hastalıkların etkisiyle üretilen SOR üretiminde ve bu üretime bağlı olarak antioksidan enzim aktivitelerinde sürekli bir artıştan söz etmek veya enzim inhibisyonu olabileceği konusunda fikir yürütmek zordur. Canlı hastalık durumunda antioksidan mekanizmalarını uygun derecelerde çalıştırarak kendine savunma yolu seçmekte ya da hastalığın çeşidine veya tipine bağlı olarak antioksidan mekanizmalarının çalışması, enzim sentezinin engellenmesi ya da enzim yapısının değiştirilmesi şeklinde baskılanmaktadır (19).

Biz de çalışmamızda beyin dokusunda SOD ve CAT düzeylerini inceledik. Tüm grupların SOD ve CAT düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla yükseldiği tespit edilmiştir. Anestezi madde uygulanan gruplarda elde edilen bu değerler birbirleriyle karşılaştırıldığında ise anlamlı bir fark oluşmamıştır. İ/R aşamasında ortaya çıkan SOR bertaraf edilemediği için oluşan doku hasarı sonucu enzim miktarları azalmaya başlar ve sonuçta aktivite azalabilir.

Singh, Ozan ve Aktoz böbrek İ/R hasarını araştırdıkları çalışmalarında İ/R hasarı oluşturdukları gruplarda MDA düzeyindeki yükselmeye beraber SOD ve CAT düzeylerinde azalma tespit etmişlerdir (72, 57, 2). Bizim çalışmamızda da benzer sonuçlar elde edilmiş olup, İ/R uyguladığımız kontrol grubunda sham grubuyla karşılaştırıldığında MDA düzeylerinin arttığını, SOD ve CAT düzeylerinin ise azaldığını görmekteyiz. Bu bize kontrol grubunda ROS düzeyinin arttığı ve endojen antioksidan enzimlerin tüketildiğini göstermektedir.

Çalışmamızda anestezi madde uygulanan gruplarda elde ettiğimiz CAT düzeylerinin incelemesinde ise en yüksek düzeyi ketamin ve propofol grubunda, en düşük düzeyi ise tiyopental grubunda tespit ettik. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında diğer grupların hepsinde CAT düzeyinin belirgin oranda yüksek olduğunu saptadık ($p<0,05$). Bu bulgularla ketamin, tiyopental ve propofolun endojen antioksidan madde olan CAT'ın sentezini artırdığını söyleyebiliriz. Öte yandan, sham grubunun MDA düzeyinin düşük kontrol grubunun ise yüksek olduğu tespit edilmiştir. Her iki grup arasındaki fark istatistiki olarak anlamlıdır ($p<0,05$). CAT düzeyleri ise sham grubunda yüksek, kontrol grubunda düşük bulunmuştur ve iki grup arasındaki fark istatistiki olarak anlamlıdır ($p<0,05$). SOD düzeyleri de kontrol grubunda sham grubuna göre düşük çıkmış ve aradaki fark istatistiki olarak anlamlıdır. Ayrıca histopatolojik olarak değerlendirilen beyin dokularında kontrol grubunda oluşmuş olan hasarla sham grubundaki değişiklikler belirgin farklılık göstermektedir ($p<0,05$). Bu sonuçlar yaptığımız çalışmada kontrol grubunda SOR aracılıklı beyin İ/R hasarı oluşturduğumuzu göstermektedir.

Ketamin çeşitli klinik durumlarda, güvenli ve güvenilir bir çözümlenme sedatif / anestezi madde olarak kapsamlı incelenmiştir ve bir N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonistidir. Bu yeni analjezik ve anti-inflamatuar özelliklere sahip olan ve beyin, böbrek, iskelet kası, kalp, bağırsak iskemisi/reperfüzyon yaralanması üzerinde koruyucu özelliğe sahiptir. Çalışmamızda diğer gruplarla karşılaştırıldığında ketaminli grupta MDA düzeyi daha düşük ve CAT aktivitesi daha yüksek bulundu. Bu bize ketaminin oksidatif strese karşı koruyucu madde özelliği olduğunu göstermektedir. Ketaminli grupta SOD aktivitesi propofol grubuna kıyasla daha düşük bulundu. Ketaminli grupta düşük SOD aktivitesi ve yüksek CAT aktivitesi hücre içerisinde yüksek oranda süperoksit anyon radikallerinin biriktiğini göstermektedir. Hatta MDA düzeyleri Sham grubuna yaklaşımdır. Ketaminli grupta düşük MDA düzeyi ketaminin antioksidan özelliğinden dolayı lipid peroksidasyonunu düşürdüğü düşünülmektedir. Histopatolojik olarak olumlu sonuçlar alınmasına rağmen kontrol grubuyla

arasında anlamlı bir fark oluşmamıştır. Bu sonuç bize ketaminin beyin İ/R hasarında olumlu etkileri olabileceğini fakat anlamlı bir düzelme sağlamadığını göstermiştir.

Ketamin, çeşitli mekanizmalarla süperoksit radikallerinin konsantrasyonunu etkileyebilir: 1) nötralizasyon: doğrudan süperoksit radikallerinin konsantrasyonunu azaltılması 2) glutatyon peroksidaz enziminin uyarılmasıyla süperoksit sentezinin azaltılması ve 3) nötrofillerin baskılanması yoluyla. Weiss ve ark. ketamin fenol bileşeni içeren kimyasal yapısı nedeniyle birinci mekanizma üzerinde önemli bir etkiye sahip olamayacaklarını ifade etmişler. Üçüncü mekanizma ile ilgili olarak, ketamin nötrofilleri inhibe ettiği ve in vivo altında ve in vitro koşullarda koroner bypass'da nötrofil kaynaklı süperoksit radikalleri azalttığı gösterilmiştir. Benzer şekilde, ketamin kobay kalbinin iskemi-reperfüzyonu boyunca ekzojen olarak verilen insan nötrofillerinin yapışmasının azalttığı saptanmıştır. Ayrıca, ketamin sıçan mezenterinde muhtemelen E-selektinin (E-selektin; sitokinler ile aktive olan yapışma molekülü) baskılanmasına bağlı olarak nötrofil yapışmasını inhibe ettiği gözlenmiştir. Ketamin, diğer ilaçlarla uyumlu olmasından ve geniş bir güvenlik aralığı olmasından dolayı deneysel uygulamalarda en geniş kullanım alanı olan anesteziik maddelerden biridir(33). Biz de çalışmamızda bu özelliğinden dolayı anesteziik madde olarak ketamini tercih ettik. Çalışmada kullandığımız etken maddeler ise iv kullanılan anesteziik maddelerdir. Bu anesteziik maddelerin subanesteziik dozlarının beyin İ/R hasarına etkilerini araştırdığımız bu çalışmada kullandığımız anesteziik madde olan ketaminin de olumlu etkisi olmuş olabilir. Fakat çalışmamızda bu etkiyi standardize edebilmek için tüm grupların anesteziisi ketamin ile sağlanmıştır. Herhangi bir etken maddenin uygulanmadığı sham ve kontrol gruplarının sonuçlarını incelediğimizde uyguladığımız anesteziik madde olan ketaminden bağımsız olarak beyinde İ/R hasarı oluştuğunu görmekteyiz. Bundan dolayı elde ettiğimiz sonuçların anesteziik madde olan ketaminin etkisinden bağımsız olduğu kanaatindeyiz. Fakat anesteziik olarak kullanmış olduğumuz ketaminin uyguladığımız bu deney modelinde etkilerinin tam olarak ortaya konulabilmesi için diğer etken maddelerle etkileşiminin ve karşılaştırılmasının yapıldığı farklı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Propofol grubunun MDA düzeyleri de kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşüktür ($p < 0,05$). SOD değerlerinde bir farklılık olmayan propofol grubu katalaz düzeyi ise sham ve kontrol grubuna göre daha düşük çıkmıştır. Propofol grubunun serebral dokusunun histopatolojik incelemesinde de belirgin düzelmelerin olduğu izlenmiştir. Ortalama histolojik skorlardaki artış göz önüne alındığında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak da anlamlı

derecede düşük bulunmuştur. Yüksek lipid çözünürlüğüne sahip anestezi madde olan propofol, genel anestezinin indüksiyonunda, sürdürülmesinde ve yoğun bakımlarda mekanik ventilatöre bağlı entube hastaların sedasyonunda sıklıkla kullanılmaktadır. Kalp, akciğer, beyin, karaciğer ve testis gibi birçok organın İ/R hasarına olumlu etkileri gösterilmiştir. Propofol böbreği de içeren çeşitli dokulardaki oksidatif hasarı sınırlandırabilir. Bununla birlikte propofolun serebral İ/R hasarına etkisi çok az çalışmada bildirilmiştir. Hui-hua Wang ve ark. yaptığı çalışmada propofolun ratlardaki böbrek iskemi reperfüzyon hasarını ve renal disfonksiyonu belirgin olarak azalttığı tespit edilmiştir. Ayrıca bu koruyucu etkileri hemoksijenaz-1 indüksiyonu aracılığı ile olduğunu göstermişlerdir.

Propofol grubunun MDA düzeyleri de kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşüktür ($p < 0,05$). Propofol grubunda SOD ve CAT değerleri sham grubuna yaklaşmış ve kontrol grubuna göre daha yüksek çıkmıştır. Propofol grubunun serebral dokusunun histopatolojik incelemesinde de belirgin düzelmenin olduğu izlenmiştir. Ortalama histolojik skorlardaki artış göz önüne alındığında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak da anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Yüksek lipid çözünürlüğüne sahip anestezi madde olan propofol, genel anestezinin indüksiyonunda, sürdürülmesinde ve yoğun bakımlarda mekanik ventilatöre bağlı entube hastaların sedasyonunda sıklıkla kullanılmaktadır. Kalp, akciğer, beyin, karaciğer ve testis gibi birçok organın İ/R hasarına olumlu etkileri gösterilmiştir. Propofolün antioksidan özelliği, propofolün fenolik yapısına dayandırılabilir. Propofolün lipid peroksidasyon inhibisyonunun iki yoldan biriyle olduğunu belirtmişlerdir. Lipid peroksil radikaliyle reaksiyona girerek daha stabil olan fenoksil radikalini oluşturarak ya da İ/R'da hücrel toksisiteden sorumlu önemli molekül olan peroksinitriti uzaklaştırarak etki gösterdiğini söylemişlerdir. Ayrıca propofolün, nötrofillerin aktivitelerini ve kalsiyumun plazma membranından geçişini inhibe edebileceğini öne sürmüşlerdir (82). Yağmurdur ve ark. da çalışmalarında propofolün hipoperfüzyon reperfüzyon olayıyla bağlantılı lipid peroksidasyon inhibisyonu ve SOR ve metabolitlerinin uzaklaştırılmasında propofolün indüksiyon dozlarının birçok avantajı olabileceğini göstermişlerdir (83). D. Runzer ve ark. propofol anestezisi sırasında dokuların antioksidan kapasitelerini araştırdığı çalışmada yüksek doz propofolün halotanla karşılaştırıldığında eritrosit MDA düzeylerini belirgin olarak azalttığı tespit edilmiş. Yine aynı çalışmada propofolün koruyucu etkisinin tüm dokularda belirgin olduğu, en fazla karaciğer olmak üzere sırasıyla böbrek, kalp ve akciğerde de belirgin koruyucu etkisi olduğu saptanmış. Düşük doz ve yüksek doz propofol karşılaştırıldığında ise yüksek doz propofolde daha olumlu sonuçlar almışlar (Düşük doz 500cg/kg/dak, yüksek doz 2000 cg/kg/dak.).

Dokuların farklı yanıt vermesini ise her dokunun lipid peroksidasyon duyarlılığının farklı olmasıyla açıklamışlardır (67).

Tiyopental grubunda saptadığımız MDA değerleri yine kontrol grubuna göre belirgin düşük bulunmuştur ($p<0,05$). Tiyopental SOD düzeyleri kontrol grubuna göre yükselmiş ve istatistik olarak anlamlıdır. CAT düzeyleri ise Sham grubuna yaklaşmıştır. Histopatolojik bulgulara bakıldığında yine tiyopental grubunda kontrol grubuna göre belirgin derecede düzelme saptanmıştır. Tiyopental grubundaki bu düzelme diğer tüm gruplara göre daha iyi olmasına rağmen ketamin grubuyla arasında anlamlı derecede fark vardır ($p<0,05$). Yağmurdur ve ark. tiyopental ve propofol indüksiyonunun hipoperfüzyon reperfüzyon olayına etkilerini araştırdıkları çalışmalarında yüksek lipid çözünürlüklü madde olan tiyopentalin lipid peroksidasyon inhibisyonu ve serbest radikal aracılı hemolizi inhibe eden antihemolitik aktivitesi ile antioksidan özellikleri gösterebileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca klinik olarak uygun konsantrasyonlarda tiyopentalin, nötrofil kaynaklı SOR'u belirgin olarak baskıladığını belirtmişlerdir (83).

Basu ve ark. ise renal transplantasyon sonrası Oksidatif stres ve inflamatuvar yanıtın araştırıldığı başka bir çalışmada propofolun tiyopental'e göre inflamatuvar yanıtı azaltıcı etkisi olduğunu tespit etmişlerdir (14). Biz ise çalışmamızda bu iki grubun arasında belirgin fark saptamadık. Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda elde ettiğimiz verilere dayanarak tiyopentalin ratlarda SOR aracılığı ile oluşan beyin İ/R hasarını azalttığı tespit edilmiştir. Histopatolojik olarak hafif iskemik bulgular elde edilmiştir, biyokimyasal olarak baktığımızda en iyi grubun tiyopental olduğu gözlenmiştir.

Yüzer ve ark. (61) çalışmalarında ketamin, tiyopental, propofol, etomidat, intralipidin böbrek İ/R hasarına etkilerini araştırmışlar ve bizim sonuçlara benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Yazarlar, tiyopental ve propofol maddelerinin böbrek İ/R hasarının histopatolojik ve biyokimyasal olumsuz etkilerini azaltabilir olduğu gözlenmişlerdir.

Serebral iskemide serbest radikaller ve sitokinlerin salınımı, platelet aktivasyonu ve apoptozisle nöronal hasar oluşur. Yüksek oksijen tüketimi, yüksek lipid oranı ve antioksidanların diğer organlara göre azlığı nedeniyle beyin SOR'a oldukça hassastır. İ/R ile anoksiyi takiben yeniden oksijenizasyonun sağlanmasıyla mitokondriyal membranda respiratuvar zincirle süperoksit anyonu ortaya çıkar ve iskemik bölgenin reperfüzyonu SOR'un artışı ile iskemik hasarın şiddetini artırabilir. Bu nedenle İ/R ile etkilenen dokunun

antioksidan seviyesi çok önemlidir (2,19). İnsanlarda beyinde serbest radikallerin ve okside moleküllerin direkt ölçümü zor olduğundan, strokta potansiyel periferik marker olabilecek bazı biyolojik maddeler araştırılmaktadır. Lipid peroksidasyon ürünlerinin anlamlı artışı ya da plazmadaki bazı antioksidanların anlamlı azalışı strok hastalarında rapor edilmiştir ve strokta oksidatif stresin varlığı bu belirtilerle değerlendirilmiştir.

Nöron-spesifik enolaz (NSE), beyin için özgül proteinlerden biri olup, glikolitik yolda 2-fosfoglisaratın fosfoenolpirivata dönüşümünü katalize eden enolaz enziminin bir izoenzimidir. NSE nöronlar ve nöroendokrin hücrelerde yüksek oranlarda mevcut olup beyin total çözülebilir proteininin %0.4-4'ünü oluşturur. (84,85) İskemik stroklu hastalarda serebral nöronal hasarın ilk haftalarında serum NSE düzeylerinde artış olduğu gösterilmiş ve iskemik serebrovasküler hastalıklarda iskemik hasarın kantitatif bir belirleyicisi olarak kullanılabileceği iddia edilmiştir. Çalışmamızda kontrol grubunda diğer gruplara kıyasla (sham, ketamin, tiyopental ve propofol) NSE düzeylerindeki artış, kan beyin bariyerinin NSE sızıntısına sebep olacak derecede hasarlandığının bir göstergesidir. Yapılan deneysel ve klinik çalışmalarda, iskemik strok sonrasında BOS NSE düzeylerinin belirgin olarak yükseldiği ve bu yükselmenin infarkt volümü ile pozitif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (87,88,89). İmmunohistokimyasal çalışmalarla NSE'nin infarkta uğramış nöronlardan ekstrasellüler sıvıya ve kana, ilk 1-2 gün içinde geçmeye başladığı ve iskemiden 7-8 gün sonra bile serumda yüksek değerlerde kaldığı bildirilmiştir. Stroku takiben BOS örneklemeleri pratik ve uygulanabilir olmayacağından erken dönemde prognozu belirlemek için serum NSE seviyelerinin belirlenmesi daha pratik bir yaklaşım olarak kabul edilmiştir(86). İskemik beyin hasarının akut dönemdeki nörobiokimyasal bir belirleyicisi olarak kabul edilen NSE düzeyi, İ/R sonrası mortalite ve morbiditenin erken dönemde belirlenmesinde noninvazif bir yöntem olarak kullanılabilir.

Tüm bulgularımızı karşılaştırdığımız zaman ketamin, tiyopental ve propofol Beyin İ/R hasarını azaltıcı etkisinin olabileceği saptanmıştır. Bu azaltıcı etkinin en fazla tiyopental ve propofol gruplarında olduğu tespit edilmiştir. Ketamin ile MDA düzeyinde anlamlı düzelme olmasına rağmen patolojik bulgulardaki düzelme anlamlı değildir.

Serebral iskemide kullandığımız anestezi maddeleri, nöroprotektif etkisini beyin dokularındaki oksidan düzeylerinin artmasını engelleyerek sağlayabileceği gösterilmiştir. Bulgularımız benzer çalışmalar ile desteklenirse propofol ve tiyopental'ın, akut inme ve/veya serebral iskeminin eşlik edebileceği diğer nörolojik ve nöroşirürjikal hastalıkların tedavisinde

yer alabileceđi dűşűnűlebilir. Beyin İ/R tedavisi hakkında ek bilgiler elde edileceđi dűşűnűlmektedir. Elde edilen veriler deđerlendirildiđinde muhtemelen tedavi űemalarında ve yűntemlerinde farklılıklar olabilecektir. Ancak geniű kapsamlı klinik araűtırmalara ve anesteziik maddelerin antioksidan etkilerin mekanizmalarını gűsterecek deneysel alıűmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bizim alıűmamız deneysel açıdan bu etkinin araűtırmaya deđer olduđunu gűstermiűtir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1- Kontrol grubunda, sham grubuna kıyasla MDA değeri anlamlı şekilde yüksek, histopatolojik tablo belirgin şekilde kötü bulunmuştur ($p<0.05$). Bu durum, uyguladığımız modelle serebral İ/R hasarı oluştuğunu göstermektedir.

2- Tiyopental, kontrol grubuna kıyasla histopatolojik ve biyokimyasal olarak ratlarda oluşan serebral İ/R hasarını azaltmaktadır ($p<0.05$).

3- Propofol de kontrol grubuna kıyasla histopatolojik ve biyokimyasal olarak ratlarda oluşan serebral İ/R hasarını azaltmaktadır ($p<0.05$).

4- Tiyopental ve propofol'un ratlarda serebral i/R hasarını azaltıcı etkisi ketamin ile kıyaslandığında hem histopatolojik hem de biyokimyasal olarak belirgindir ($p<0.05$).

5- Tiyopental ve propofol karşılaştırıldığında ise aralarında histopatolojik ve biyokimyasal olarak belirgin bir fark oluşmamıştır ($p>0.05$). Fakat propofolden farklı olarak tiyopentalin histopatolojik bulguları ketamine oranla daha iyidir ($p<0.05$).

6- Ketamin ratlarda serebral İ/R hasarına karşı histopatolojik olarak düzelmeye ($p<0.05$) sağlamıştır.

7- Kontrol grubunda, diğer gruplara kıyasla NSE aktivitesi değeri anlamlı şekilde yüksek, bulunmuştur ($p<0.05$). Bu durum, serebral hasarın oluştuğunu ifade etmektedir.

7.KAYNAKLAR

- 1.Hans P, Bonhomme V. The rational for perioperative brain protection. EJA 2004; 21: 1-5.
- 2.Schaller B, Graf R. Cerebral ischemic preconditioning. An experimental phenomenon or a clinical important entity of stroke prevention. J Neurol 2002;249:1503-11.
- 3.John XW, Adrian WG. Free radicals, antioxidants, and neurologic injury: possible relationship to cerebral protection by anesthetics. JN Anesthesiology 2002;14(1):66-79.
- 4.Chesnut RM, Marshall LF, Klauber MR. The role of secondary brain injury in determining outcome from severe head injury. J Trauma 1993; 34: 216-222.
- 5.Chang HS, Hongo K, Nakagawa H. Adverse effects of limited hypotensive anesthesia on the outcome of patients with subarachnoid hemorrhage. J Neurosurg 2000; 92:971-975.
- 6.Sanders R, Daqing MA, Maze M. Anaesthesia induced neuroprotection. Best Practice and Research C Anaesthesiology 2005;1:461-47.
- 7.Ward JD, Becker DP, Miller JD. Failure of prophylactic barbiturate coma in the treatment of severe head injury. J Neurosurgery 1985; 62: 383-388.
- 8.DeLa Cruz JP, Seden G, Carmona JA, Sanchez DeLa Cuesta F. In vitro effects of propofol on tissular oxidative stress in the rat. A Analg. 1998;87:1141-6.
- 9.DeLa Cruz JP, Villalobos MA, Seden G, Sanchez DeLa CuestaF. Effect of propofol on oxidative stress in an in vitro model of anoxia-reoxygenation in the rat brain. Brain Res. 1998;800:136-44.
- 10.Lee Y, Chung C, Oh Y. The effectiveness of propofol pretreatment on the extent of deranged cerebral mitochondrial oxidative enzyme after incomplete forebrain ischemia/reperfusion in rats. JK Med Sci. 2000;15:627-30.
- 11.Cruz J.P, Zanca A, Carmona J.A, Cuesta F. The effect of propofol on oxidative stress in platelets from surgical patients. Anesth. Analg. 1999;89:1050-5.
- 12.Kato R, Foex P. Fentanyl reduces infarction but not stunning via deltaopioid receptors and protein kinase C in rats. Br J Anaesth 2000; 84:608-14.

- 13.**Kato R, Ross S, Foex P. Fentanyl protects the heart against ischaemic injury via opioid receptors, adenosine A1 receptors and KATP channel linked mechanisms in rats. *Br J Anaesth* 2000; 84:204-14.
- 14.** Basu S, Meisert I, Eggensperger E. Time course and attenuation of ischaemiareperfusion induced oxidative injury by propofol in human renal transplantation. *Redox Rep.* 2007;12(4):195 -202
- 15.**Egan TD. Remifentanil versus alfentanil: Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics in healthy adult male volunteers. *J Anesthesiology* 1996;84:821-33.
- 16.**Zhang Y, Micheal G, Irwin M, Tak MW. Remifentanil preconditioning protects against ischemic injury in the intact rat heart. *Anesthesiology* 2000;101:918-23.
- 17.**Zhang Y, CHEN Z, Girwin M, Wong T. Remifentanil mimics cardioprotective effects of ischemic preconditioning via protein kinase c activation in open chest of rats. *Acta Pharmacology* 2005;200:446-500.
- 18.**Zhang Y, Micheal G, Irwin M, Tak MW, Chen M, Cao C. Remifentanil preconditioning confers cardioprotection cardiac and 5- opioid receptors. *Anesthesiology* 2005;102:371-8.
- 19.**Kuzume Ko, Kuzume Ka, Wolff R, Chien G, Winkle DM. Remifentanil limits infarct size but attenuates preconditioning-induced infarct limitation. *Coronary Artery Disease* 2004;15: 449-458.
- 20.**Zhang GH, Shan XF, Wen LC, Tao SH, Peng LK. Experimental study of preservation effect of remifentanil on hepatic ischemia reperfusion in rats. *Anesthesiology* 2006;105:A1623.
- 21.**Neblina FL, Toledo AH, Pereyna LHT. Molecular biology of apoptosis in ischemia reperfusion. *Journal of Investigative Surgery* 2005;18:335-350.
- 22.**Crack PJ, Taylor JM. Reactive oxygen species and the modulation of stroke. *Free Radical Biology & Medicine* 2005;38:1433-1444.
- 23.**Su-Lan L, Wen-Yin C, Shue-Ling R, Jon-Son K, Chun-Jung C. Association of immune responses and ischemic brain infarction in rat. *Molecular Neuroscience* 2001;12:1943-1947.

- 24.**Sugawara T, Fujimura M, Noshita N, Whan G, Saito A, Hayashi T, et al. Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *The American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2004; 1: 17-25.
- 25.**DeGracia DJ, Kumar R, Owen C, Krause G, White BC. Molecular pathways of protein synthesis inhibition during brain reperfusion. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2002;22:127-141.
- 26.**Tan S, Sagara Y, Liu Y, Maher P, Schubert D. The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. *J Cell Biol* 1998;141:1423-32.
- 27.**Xiong Li-ze. Neuroanesthesia and neuroprotection: where are we now? *Chinese Medical Journal* 2006; 119(11):883-886.
- 28.**Engelhard K, Werner C, Reeker W, Lu H, Mielke L, Kochs E. Desflurane and isoflurane improve neurological outcome after incomplete global ischemia in rats. *British Journal of Anaesthesia* 1999,83: 415-421.
- 29.**Hoffmann WE, Thomas C, Albrecht RF. The effect of halotane and isoflurane on neurological outcome following incomplete cerebral ischemia in the rat. *Anesth, Analg.* 1993;76(2):279-83.
- 30.**Krimbo JR, Kelly PJ, Drummond JC, Cole DJ, Patel PM. Isoflurane and pentobarbital reduces AMPA toxicity in vivo in the rat cerebral cortex. *Anesthesiology* 2000;92:806 -812.
- 31.**Daqing Ma, Hossain M, Rajakumaraswamy N, Franks NP, Maze M. Combination of xenon and isoflurane produces a synergistic protective effect against oxygen-glucose deprivation injury in a neuronal-glia co-culture model. *Anesthesiology* 2003;99:748-51.
- 32.**Westermaier T, Zausinger S, Baethmann A, Steiger HJ, Schmid-Elsaesser R. No additional neuroprotection provided by barbiturat-induced burst suppression under mild hypothermic conditions in rats subjected to reversible focal ischemia. *Journal of Neurosurgery* 2000;93:835-844.
- 33.**Ward JD, Becker DP, Miller JD, Choi SC, Marmarou A, Wood C, et al. Failure of prophylactic barbiturate coma in the treatment of severe head injury. *Journal of Neurosurgery* 1985;62:383-388.

- 34.**Demiryürek AT, Cinel İ, Kahraman S, Tecder M, Gögüs N, Aypar Ü et al. Propofol and intralipid interact with reactive oxygen species: a chemiluminescence study. *Br J Anaesth.* 1998;80:649-54.
- 35.**Yamaguchi S, Midorikawa Y, Okuda Y, Kitajima T. Propofol prevents delayed neuronal death following transient forebrain ischemia in gerbils. *Canadian Journal of Anaesthesia* 1999;46:593-598.
- 36.**Young Y, Menon DK, Tisavipat N, Matta BF, Jones JG. Propofol neuroprotection in a rat model of ischemia reperfusion injury. *Eur J Anaesthesiology* 1997;14:320-326.
- 37.**Kristin E, Werner C, Eberspacher E, Pape M, Stegemen U, Kellermann K et al. Influence of propofol on neuronal damage and apoptotic factors after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats. *Anesthesiology* 2004;101:912-7.
- 38.** Oh WS. Effect of fentanyl on TNF-alpha and IL-1 levels during global ischemia/reperfusion in rats. *Int. J Tissue React* 2002;24(1):11-21.
- 39.**Sanders R, Daqing Ma, Maze M. Anaesthesia induced neuroprotection. *Best Practice and Research Clinical Anaesthesiology* 2005;1:461-47.
- 40.**Barry U, Zuo Z. Opioids: old drug for potential new applications. *Current Pharmaceutical Design* 2005;1:1343-1350.
- 41.**Perat JN, Gross ER, Gross GJ. Opioid induced preconditioning: recent advances and future perspectives. *Vascular Pharmacology* 2000;42 (5-6):211-8.
- 42.**Mayfield KP, D'Alecy LG. Delta-1 opioid agonist acutely increases hypoxic tolerance. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 1994;268:683-688.
- 43.**Chiamulera C, Terron A., Reggiani A, Cristofori P. Qualitative and quantitative analysis of the progressive cerebral damage after middle cerebral artery occlusion in mice. *Brain Res.* 1993;606:251-258.
- 44.**Goldlust EJ, Paczynski RP, He YY, Hsu CY, Goldberg MP. Automated measurement of infarct size with scanned images of triphenylterazolium chloride-stained rat brains. *Stroke* 1996;27:1657-1662.

- 45.**Benedek A, Moricz K, Juranyi Z, Gigler G, Levay G, Harsing LG et al. Use of TTC staining for the evaluation of tissue injury in the early phases of reperfusion after focal cerebral ischemia in rats. *Brain Research* 2006;1116:159-165.
- 46.**Wong TM, Lee AY, Tai KK. Effects of drugs interacting with opioid receptors during normal perfusion or ischemia and reperfusion in the isolated rat heart: An attempt to identify cardiac opioid receptor subtype(s) involved in arrhythmogenesis. *J Mol Cell Cardiol.* 1990; 22:1167-75.
- 47.**Ventura C, Spurgeon H, Lakatta EG, Guarnieri C, Capogrossi MC. Kappa and delta opioid receptor stimulation affects cardiac myocyte function and Ca release from an intracellular pool in myocytes and neurons. *Circ. Res.* 1992;70:66-81.
- 48.**Mueller RA, *General Anesthetic Drugs, Principles Of Pharmacology* (Munson PL). Chapman and Hall, New York, 1995; 227 -241
- 49.**Murell GA, Francis MJ and Bromley L, Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals, *Biochem J.* 1990, 265(3): 659 -665
- 50.**Nakazwa H, Genka C, Fujyshima M, Pathological aspects of active oxygens/free radicals, *Jpn J Physiol.* 1996, 46(1): 15 -32
- 51.**Nauta RJ, Tsimoyiannis E. The role of calcium channel entry blockers in experimental ischemia-reperfusion-induced liver injury, *Ann. Surg.* 1991; 213(2): 137 -142
- 52.**Neto ER, Vianna PTG, Viero RM. Influence of S(+)-ketamine analgesia in renal intraoperative ischemia. Histological study in rats, *Acta Cir Bras.* 2006; 21:4, 242-246
- 53.**Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med.* 2001; 31: 1287- 1312
- 54.**Okada Y, Copeland BR, Fridridge R. Fibrin contributes to microvascular obstructions and parenchymal changes during early focal cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke* 1994; 25(9): 1847- 1854
- 55.**Okawa H, Ohishi N, Yagi K: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.*, 1979, 95: 351 -358

- 56.**Ozan E, Koyutürk L, Sapmaz T. Böbrek iskemisi reperfüzyon hasarında antioksidan olarak Prostoglandin E1 kullanımının incelenmesi: deneysel çalışma, Fırat Tıp Derg. 2004, 9(3): 67 -71
- 57.**Önal A, Astarçioğlu H, Örmen M, Sıçanlardaki renal iskemisi-reperfüzyon hasarında L-karnitinin koruyucu etkisi, Ulus Travma Derg. 2004, 10(3):160-167
- 58.**Padanilam BJ. Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis, Am J Physiol Renal Physiol. 2003, 284(4): 608 -627
- 59.**Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med. 1967, 70 (1): 158 -69.
- 60.**Paller M, Hoidal J, Ferris T. Oxygen Free Radicals in Ischemic Acute Renal Failure in the Rat. J.Clin. Invest. 1984; 74: 1156 -1164.
- 61.** Hüsamettin Y. Ketamin, Tiopental, Propofol, Etomidat, İntralipidin Böbrek İskemisi Reperfüzyon Hasarına Etkileri, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Uzmanlık Tezi, Kahramanmaraş,2008.
- 62.** Guzel A, Er U, Tatli M, Aluçlu U, Özkan Ü, Düzenli Y et al. Serum neuron-specific enolase as a predictor of short-term outcome and its correlation with Glasgow Coma Scala in traumatic brain injury. Neurosurg Rev. 2008; 31: 439-445.
- 63.** Lee SH, Rao KCVG, Robert A Zimmerman. Cranial MRG And CT, New York: McGraw Hill Book, 1992.
- 64.** Johnson MH, Lee SH. Computed tomography of acute cerebral trauma. RCNA 1992; 30: 325- 352.
- 65.** Janice AR, Gaelwyn BDJ, Norman AL. Enolase isoenzymes in the cerebrospinal fluid of patients with diseases of the nervous system. J. Neurol Neurosurg Psychiatry. 1983,46:1031-1036.
- 66.** Donald S, Marangos P J, Athanasios PZ, Brightman M. Goodwin F K. Brain enolases as specific markers of neuronal and glial cells. Science,1978;199:313-314.

- 67.** Murty Ven M R, Viallard J L, Dastugue B. Rapid electrophoretic determination of NSE isoenzymes. *Clin Chem*,1986; 32:593-596.
- 68.** Kasier E, Pregant P, Kumits R and et al. Clinical biochemistry of neuron specific enolase. *Clin Chim Acta*,1989;183:13-31.
- 69.** Hassan M H, Touitou Y, Foubert L, Young W F, Brucker E. Serum neuron specific enolase in patient with pituitary adenomas. *Clin Chem*,1997; 43: 540-541.
- 70.** Rodys J A, Taylor CB, Timperley W R. Enolase isoenzymes as diagnostic markers. *Neuropathol Appl Neurobiol*,1984; 11:1-6.
- 71.** Henry J, Barnett M, Bennett M S, Mohr J P, Yatsu F M. Stroke pathophysiology, diagnosis and management, USA pp.1986:281-289.
- 72.** Grace PA: Ischemia-Reperfusion injury. *British Journal of Surgery*. 1994; 81:637-47.
- 73.** Kukreja R, Hess ML: The oxygen free radical system: from equations through membrane-protein interactions to cardiovascular injury and protection. *Cardiovasc Res* 1992; 26:641-55.
- 74.** Jianping S. Ischemia, reperfusion and no-reflow phenomenon. Svenson LG, Crawford ES; *Cardiovascular and Vascular Disease of the Aorta*, Philadelphia. WB Saunders Company 1997.
- 75.** Coselli JS, Büket S, Djukanovic B. Aortic Arch Operation: Current Treatment and Results. *Ann Thorac Surg* 1995; 59:19-27.
- 76.** Pagano D, Carey JA, Patel RL, Allen SM. Retrograde cerebral perfusion: clinical experience in emergency and elective aortic operations. *Ann Thorac Surg* 1995;59:393-7.
- 77.** Tabashi KT, Ohmi M, Togo T. Aortic arch aneurysm repair using selective cerebral perfusion. *Ann Thorac surg* 1994;57:1305-10.
- 78.** Braugher JM, Hall ED. Central nervous system trauma and stroke. Biochemical considerations for oxygen radical formation and lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med*. 1989;6:289-301.

- 79.** Sun Z, Wang X, Deng X, Lasson A, Soltesz V, Borjesson A et al. Beneficial effects of lexipafant, a PAF antagonist on gut barrier dysfunction caused by intestinal ischemia and reperfusion in rats. *Dig Surg* 2000. 17;1: 57-65 (Abstract).
- 80.** Pehlivan M, Dalbeler Y, Hazinedaroğlu S, Arıkan Y, Günal O, Türkcapar N et al. An assesment of the effect of ginkgo biloba EGB 761 on ischemia reperfusion injury of intestine. *Hepatogastroenterology* 2002, 49;43: 201-204 (Abstract).
- 81.** Noel AA, Hobson RW, Duran WN. Platelet- Activating Factor and Nitric Oxide mediate microvasculer permeability in ischemia_reperfusion injury. *Microvascular Research* 1996, 52;
- 82.** Islekel S, Islekel H, Guner G. Alterations in superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase activities in experimental cerebral ischemia-reperfusion. *Res Exp Med* 1999;199: 167-76
- 83.** Ban M, Tonai T, Kohno T. A flavonoid inhibitor of 5-lipoxygenase inhibits leukotriene production following ischemia in gerbil brain. *Stroke* 1989;20:248-52
- 84.** Day INM, Thopson RJ. Levels of immunoreactive aldolase C, creatine kinase-BB, neuronal and nonneuronal enolase and 14-3-2 protein in circulating human blood cells. *Clin Chem Acta* 1984; 136: 219-228.
- 85.** Marangos PJ, Champbell IC, Godvin FK. Structural and functional properties of neuron specific protein (NSP) from rat, cat and human brain. *J Neurochem* 1977; 28:1097-1107.
- 86.** Cunningham RT, Young IS, Winder J. Serum neurone specific enolase (NSE) levels as an indicator of neuronal damage in patients with cerebral infarction. *Eur J Clin Invest* 1991; 21: 497-500.
- 87.** Steinberg R, Gueniau C, Scarna H, Keller A, Worcel M, Pujol JF. Experimental brain ischemia: Neuron-specific enolase level in cerebrospinal fluid as an index of neuronal damage. *J Neurochem* 1984; 43: 19-24.
- 88.** Hardemark HG, Ericsson N, Kotwica Z. S-100 and neuron specific enolase in CSF after experimental traumatic or focal ischemic brain damage. *J Neurosurg* 1989; 71: 727-731.
- 89.** Hatfield RH, Mckernan RM. CSF neuron specific enolase as a quantitative marker of neuronal damage in rat stroke model. *Brain Res* 1992; 577: 249-252.

ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ

Sayfa No

ŞEKİLLER

Şekil 1: Ksantin oksidaz sisteminin radikal oluşturma mekanizması	4
Şekil 2: GSH redoks döngüsü	15
Şekil 3: Nötrofil İnfiltrasyonu	20
Şekil 4: Protein standart eğrisi	32
Şekil 5: MDA (Malondialdehit) standart eğrisi grafiği	34
Şekil 6: SOD standart eğrisi	38
Şekil 7: Gruplar arası beyin dokusu ağırlık düzeyleri	41
Şekil 8: Gruplar arası MDA düzeyleri	42
Şekil 9: Gruplar arası SOD düzeyleri	43
Şekil 10: Gruplar arası CAT düzeyleri	44
Şekil 11: Gruplar arası NSE düzeyleri	45
Şekil 12: Gruplar arası H-E düzeyleri	47

RESİMLER

Resim 1: Serabral iskemi sonrası mitokondrideki oksidatif stres sinyalleri	22
Resim 2: Makroskobik görünümü	29
Resim 3: Bilateral karotis komunis arterler	29
Resim 4: Bilateral karotis komunis arterlerin klempenmesi	30
Resim 5: Beyin Dokusunun Çıkarılışı.....	30
Resim 6: Sham Grubu Sol Beyin Lobu (H&E x100)	48
Resim 7: Sham Grubu Sağ Beyin Lobu (H&E x100)	48
Resim 8: Kontrol Grubu Sol Beyin Lobu (H&E x100)	38
Resim 9: Kontrol Grubu Sağ Beyin Lobu (H&E x100).....	48
Resim 10: Ketamin Grubu Sol Beyin Lobu (H&E x100).....	38
Resim 11: Ketamin Grubu Sağ Beyin Lobu (H&E x100).....	49
Resim 12: Tiopentan Grubu Sol Beyin Lobu (H&E x100).....	49
Resim 13: Tiopentan Grubu Sağ Beyin Lobu (H&E x100).....	49
Resim 14: Propofol Grubu Sol Beyin Lobu (H&E x100).....	50
Resim 15: Propofol Grubu Sağ Beyin Lobu (H&E x100).....	50

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1: Reaktif oksijen partikülleri	5
Tablo 2: Antioksidant	11
Tablo 3: İskemide serebral kan akımı düzeyindeki azalmaların dokuya etkileri	23
Tablo 4: Protein standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı	32
Tablo 5: Doku örneğinde protein tayini için tüplerin hazırlanışı	33
Tablo 6: MDA standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı	34
Tablo 7: Doku örneğinde MDA düzeyinin tayini için tüplerin hazırlanışı	35
Tablo 8: SOD standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı	37
Tablo 9: Doku örneğinde SOD standart eğri çizimi için kuvars küvetlerin hazırlanışı	37
Tablo 10: Doku örneğinde SOD aktivite tayini için kuvars tüplerin hazırlanışı	38
Tablo 11: Doku örneğinde CAT aktivite tayini için kuvars küvetlerinin hazırlanışı.....	40
Tablo 12: Gruplarda beyin dokusu ağırlıkları düzeyi	41
Tablo 13: Gruplarda beyin dokusunda MDA düzeyleri.....	42
Tablo 14: Gruplarda beyin dokusunda SOD düzeyleri	43
Tablo 15: Gruplarda beyin dokusunda CAT düzeyleri	44
Tablo 16: Gruplarda beyin dokusunda NSE düzeyleri.....	45
Tablo 17: Gruplarda beyin dokusunda H-E düzeyleri	47

EK-1

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI

ARAŞTIRMA BAŞVURU ONAYI



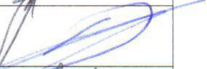

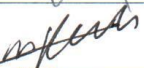

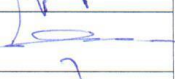
BAŞVURU BİLGİLERİ	Araştırmanın Başlığı	“Beyin İskemi Reperfüzyon Sıçan Modelinde Serbest Radikallerin Oluşturduğu Hasarın Önlenmesinde ya da Azaltılmasında Çeşitli Anestezik Maddelerin Etkinliğinin Karşılaştırılması”
	Başvuru Tarihi	06.03.2012
	Protokol No	13

DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	Belge Adı	Dili
	Başvuru Formu	Türkçe

KARAR BİLGİLERİ	Oturum No: 2012/03	Karar No: 4	Tarih: 20.03.2012
	Doç. Dr. Ergül BELGE KURUTAŞ'ın sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan üyelerin oy birliği ile karar verilmiştir.		

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI	KSÜ TIP FAKÜLTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU YÖNERGESİ
---------------	--

Unvanı /Adı/Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Doç. Dr. Harun ÇIRALIK Başkan	Tıbbi Patoloji	K.S.Ü. Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	ARAŞTIRMACI
Prof. Dr. Durmuş DEVECİ Üye	Fizyoloji	K.S.Ü. Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	KATILMADI
Doç. Dr. Fatma İNANÇ TOLUN Üye	Tıbbi Biyokimya	K.S.Ü. Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Doç. Dr. Yusuf ERGÜN Üye	Tıbbi Farmakoloji	K.S.Ü. Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Doç. Dr. Davut ÖZBAĞ Üye	Anatomi	K.S.Ü. Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Yrd. Doç. Dr. Bülent ALTUNOLUK Üye	Üroloji	K.S.Ü. Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Yrd. Doç. Dr. Ali Murat KALENDER Üye	Ortopedi ve Travmatoloji	K.S.Ü. Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Adem GÖKKAYA Üye	Diş Hekimi	Serbest	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Erdal Haluk YOLAÇAN Üye	Avukat	Serbest	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
ŞERH (VARSA)					

*Araştırma ile ilişki
**Toplantıda bulunma

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı, soyadı : Abdulkadir AKSOY
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 01.04.1988 ELBİSTAN
Medeni hali : Evli
Telefon : 0542 486 39 64
Yabancı dil : İngilizce
e-posta : kad-106@hotmail.com
Hobileri : Basketbol, futbol, yüzme.

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	KSÜ, Sağlık Bilimleri, Tıbbi Biyokimya ABD	2015
Lisans	FÜ, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü	2010
Lise	Elbistan Lisesi (Elbistan/KAHRAMANMARAŞ)	2005

YAYINLAR

Öner E, Kurutaş EB, Sümer P, Aksoy A, Yüzbaşıoğlu F, Doran F. Deneysel Serebral İskemi Reperfüzyon Oluşturulmuş Ratlarda Anestezik Maddelerin Etkileri. 15. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi, Poster Sunum, Fethiye/Muğla, 23-26 Nisan 2015.

Aksan E, Kurutaş EB, Yüzbaşıoğlu MF, Taner SS, Aksoy A, Doran F. P38 -Rat Böbreklerinde İskemi-Reperfüzyon Hasarına Karşı Kınanın (LAWSONIA INERMIS) Koruyucu Etkisi: Biyokimyasal ve Histopatolojik Çalışma. Türk Biyokimya Dergisi 2014 Volume. 39. TBD Laboratuvar Yönetimi Sempozyumu, Malatya, 16-18 Ekim 2014.