

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

SİYATİK SİNİR HASARINA KARŞI
EPİGALLOKATEŞİN 3-GALLAT (EGCG) VE GİNKGO BİLOBA
(EGb 761)'NİN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. FATMA İNANÇ TOLUN

YASEMİN APAK
YÜKSEKLİSANS TEZİ
KAHRAMANMARAŞ/2011

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

SİYATİK SİNİR HASARINA KARŞI
EPİGALLOKATEŞİN 3-GALLAT (EGCG) VE GİNKGO BİLOBA
(EGb 761)'NİN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. FATMA İNANÇ TOLUN

YASEMİN APAK
YÜKSEKLİSANS TEZİ

Bu araştırma, 2009/2-17 YLS kodlu proje olarak Kahramanmaraş
Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
tarafından desteklenmiştir

KAHRAMANMARAŞ/2011

K.S.Ü. SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Yasemin APAK tarafından hazırlanan ‘‘Siyatik Sinir Hasarına Karşı Epigallokateşin-3-gallat (EGCG) ve Ginkgo bilobanın (EGb 761) Etkilerinin İncelenmesi’’ adlı bu tezin Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim Tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Fatma İNANÇ TOLUN

Danışman

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında (Bilim Dalında) Lisansüstü Eğitim (Yükseklisans) Tezi olarak 04.02.2011 tarihinde kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Fatma İNANÇ TOLUN

Üye: Doç. Dr. Davut ÖZBAĞ

Üye: Doç. Dr. Mustafa GÜL

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Tarih: 04.02.2011

Doç. Dr. M. Akif KILIÇ

MÜDÜR

Bu tez, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım ve basım yönergesine uygundur.

TEŞEKKÜR

Eğitimim süresince her türlü bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, tezimin her aşamasında desteğini ve fikirlerini aldığım saygıdeğer hocam Doç. Dr. Fatma İNANÇ TOLUN'a,

Eğitimim sırasında ilgi ve desteklerini esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı hocam Doç. Dr. Metin KILINÇ ve Öğretim Üyesi hocam Doç. Dr. Ergül BELGE KURUTAŞ, Arş. Gör. Dr. Elif ŞAHİN'e, çalışma arkadaşlarım ve tüm biyokimya laboratuvar çalışanlarına,

Tez çalışmamda değerli katkıları olan, Doç. Dr. Davut ÖZBAĞ, Doç. Dr. Harun ÇIRALIK, Doç. Dr. Ali ÇETİNKAYA, Doç. Dr. Hasan EKERBİÇER Yrd. Doç. Dr. Muhsin EZER hocalarıma, Anatomi yüksekisans öğrencisi arkadaşım Esin GEÇGİL'e ve Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Laboratuvarı personelimiz Abdullah YILMAZ'a;

Her zaman yanımda olan Saygıdeğer Babama, Anneme, Eşime, Fikir ve tecrübelerinden her zaman faydalandığım Saygıdeğer Amcam Doç. Dr. Hüseyin TEMİZ'e ve neşe kaynağımız yeğenim Ayşe Ceylin TEMİZ'e en içten teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
TABLolar LİSTESİ	V
ŞEKİLLER LİSTESİ	VI
KISALTMALAR	VII
ÖZET	IX
ABSTRACT.....	XI
1. GİRİŞ AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. PERİFERİK SİNİR	3
2.1.1. Periferik Sinir Anatomisi	3
2.1.2. Sinir lifi ve konnektif doku	4
2.1.3. Lenfatikler	5
2.1.4. İnervasyon	5
2.1.5. Sinirin Vasküler Yapısı	5
2.1.6. Periferik Sinir Yaralanmaları	8
2.1.7. Periferik Sinir Zedelenmelerinin Sınıflandırılması.....	9
2.1.8. Yaralanma Sonucu oluşan dejenerasyon	12
2.1.9. Sinir Proksimalinde Meydana Gelen Değişiklikler	13
2.1.10. Büyüme konisi	13
2.1.11. Hasar alanı	15
2.1.12. Sinir Distalinde Meydana Gelen Değişiklikler	15
2.1.13. Sinir Rejenerasyonu	16
2.2. LİPİD PEROKSİDASYONU	17
2.3.SERBEST RADİKALLER.....	18
2.3.1. Süperoksit Radikali	19
2.3.2. Hidrojen Peroksit	19
2.3.3. Singlet Oksijen (Tek Değerli Oksijen)	20
2.3.4. Hidroksil Radikali	21

2.3.5. Serbest Radikal Kaynakları	21
2.3.5.1. Endojen Kaynaklar	21
2.3.5.2. Eksojen Kaynakları.....	22
2.3.6. Serbest Radikallerin Membran Lipidlerine Etkisi	22
2.3.7. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri	23
2.3.8. Serbest Radikallerin Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri.....	23
2.3.9. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri.....	23
2.4. ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ.....	24
2.4.1. Antioksidan etki tipleri	24
2.4.1.1. Doğal Antioksidanlar (Endojen)	24
2.4.1.2. Eksojen Antioksidanlar	25
2.4.1.3. Gıda Antioksidanlar	25
2.4.2. Superoksit Dismutaz (SOD)	25
2.4.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx).....	27
2.4.4. Nitrik oksit (NO).....	28
2.4.5. Mitokondriyal sitokrom oksidaz	28
2.4.6. Katalaz (CAT).....	29
2.4.7. Non-enzimatik Antioksidan Moleküller	29
2.4.7.1. Vitamin E.....	29
2.4.7.2. B karoten.....	29
2.4.7.3. Askorbik Asit	29
2.4.7.5. Ürik Asit	30
2.4.7.6. Serüloplazmin	30
2.4.7.7. Glutasyon	30
2.4.7.8. Melatonin	30
2.4.7.9. Flavonoidler	31
2.5. GİNKGO BİLOBA (EGb 761).....	32
2.6. EPİGALLOKATEŞİN-3-GALLAT (EGCG).....	34
3. MATERYAL METOD	37
3.1. DENEY HAYVANLARI	37
3.2. SİYATİK SİNİR HASAR MODELİ.....	37
3.3. DENEY GRUPLARI.....	40
3.4. KULLANILAN İLAÇLAR	40

3.5. BİYOPSİ ÖRNEKLERİNİN ALINMASI.....	40
3.6. SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD) AKTİVİTE TAYİNİ	41
3.6.1. Ayıraçlar	42
3.6.2. Standart Eğrinin Çizimi	42
3.6.3. Hesaplama.....	43
3.7. MALONDİALDEHİT (MDA) DÜZEYİNİN TAYİNİ	45
3.7.1. Ayıraçlar	45
3.7.2. Standart Eğri Çizimi	45
3.7.3. Hesaplama.....	47
3.8. PROTEİN DÜZEYİNİN TAYİNİ.....	47
3.8.1. Ayıraçlar	47
3.8.2. Standart Eğri Çizimi	48
3.9. NO TAYİNİ.....	50
3.10. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME	52
3.11. İSTATİSTİK.....	52
4. BULGULAR.....	53
4.1. MDA DEĞERLERİ ÜZERİNE ETKİLER	53
4.2. SOD AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLER	54
4.3. NO DEĞERLERİ ÜZERİNE ETKİLER.....	55
4.4. HİSTOPATOLOJİK ANALİZ SONUÇLARI	56
5. TARTIŞMA.....	59
6. SONUÇLAR.....	63
7. KAYNAKLAR	64
8. EKLER	71

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1: Sinir liflerinin iletim hızı ve kalınlıklarına göre sınıflandırılması.....	6
Tablo 2: Hasarın sınıflandırılması	13
Tablo 3: Flavonoidlerin alt sınıfları	32
Tablo 4: SOD standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı	42
Tablo 5: SOD standart eğri çizimi için kuvars küvetlerin hazırlanışı.....	43
Tablo 6: Dokuda SOD aktivite tayini için kuvars küvetlerin hazırlanışı.....	44
Tablo 7: MDA standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı.....	45
Tablo 8: Dokuda MDA düzeyinin tayini için tüplerin hazırlanışı	46
Tablo 9: Protein standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı.....	48
Tablo 10: Doku örneğinde protein tayini için tüplerin hazırlanışı.....	49
Tablo 11: Doku örneğinde NO tayini için tüplerin hazırlanışı	50
Tablo 12: Gruplarda Ortalama Değerler	56

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Sıçan siyatik sinir anatomisi	4
Şekil 2: Flavonoidlerin kimyası	31
Şekil 3: Ginkgolid	33
Şekil 4: Kateşin	35
Şekil 5: Siyatik sinirin klemlenmesi.....	38
Şekil 6: Sinir hasarının oluşması	38
Şekil 7: SOD standart eğrisi	43
Şekil 8: MDA standart eğrisi.....	45
Şekil 9: Protein standart eğrisi.....	48
Şekil 10: NO standart eğrisi	50
Şekil 11: Gruplarda MDA Düzeyleri	52
Şekil 12: Gruplarda SOD aktivitesi.....	53
Şekil 13: Gruplarda NO değerleri	54
Şekil 14: Kontrol grup siyatik sinir dokusu.....	56
Şekil 15: Sinir doku hasarlı bölge kesiti.....	56
Şekil 16: Egb 761 grubu sinir dokusu kesiti.....	57
Şekil 17: EGCG grubu sinir doku kesiti.....	57

KISALTMALAR

ATP	: Adenozin Trifosfat
ADP	: Adenozin Difosfat
NADPH	: Redükte Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
İ/R	: İskemi Reperfüzyon
SOR	: Serbest Oksijen Radikalleri
HOCl	: Hipoklorik Asit
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
XO	: Ksantin Oksidaz
NO	: Nitrik Oksit
PAF	: Trombosit Aktive Edici Faktör
EGCG	: Epigallokateşin-3-gallat
EGb 761	: Ginkgo biloba
O ₂	: Oksijen
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
FAD	: Flavin Adenin Dinükleotit
HO ₂ [•]	: Perhidroksi Radikali
OHT	: Hidroksil Radikali
1O ₂	: Singlet Oksijen
NO [•]	: Nitrik Oksit Radikali
H [•]	: Hidrojen Radikali
RNA	: Ribonükleik Asit
SOD	: Süperoksit Dismutaz
CAT	: Katalaz
GSH-Px	: Glutatyon Peroksidaz
ROO [•]	: Peroksil Radikalleri
NOS	: Nitrik oksid Sentaz
FMN	: Flavin Mononükleotid
ETS	: Elektron Transport Sistemi
PGG	: Prostoglandin G
PGH	: Prostoglandin H

XDH	: Ksantin Dehidrogenaz
PUFA	: Çoklu Doymamış Yağ Asidi
L [•]	: Yağ Asidi Zincir Radikali
L-O2 [•]	: Lipit Peroksil Radikali
MDA	: Malondialdehit
TBARS	: Tiyobarbitürik Asit ile Reaksiyona Giren Maddeler
GSSG	: Okside Glutasyon
GSH	: Redükte Glutasyon
GR	: Glutasyon Redüktaz
GST	: Glutasyon-S-Transferaz
OD	: Optik Dansite

ÖZET

Periferel sinir hasarı günümüzde önemli sağlık sorunlarından bir tanesidir. Sinir dokunun özellikle rejenerasyon yeteneğinin zayıf olması fonksiyon kaybının geri kazanımını daha da zorlaştıran bir durumdur. Bu deneysel çalışmada siyatik sinir hasarı modelinde Ginkgo biloba (EGb 761), Epigallochatechine-3 gallat (EGCG) ve kombine (EGb 761 + EGCG) verilmesinin oksidatif hasarlanma üzerine etkinliği araştırıldı.

Bu çalışmada 220-250 gr ağırlığında 48 adet yetişkin erkek Wistar albino cinsi sıçan kullanılmıştır. Denekler; Kontrol grubu (grup 1), Sham grubu (grup 2), deney grubu I (grup 3), EGb 761 verilen grup (grup 4), EGCG verilen grup (grup 5) ve EGb 761+EGCG kombine grup (grup 6) olmak üzere 6 gruba ayrıldı. Grup 4 deney hayvanları her hayvan için 40 mg/kg/gün olacak şekilde EGb 761 içme sularına ilave edilerek beslenmiştir. Grup 5 ise bir hafta boyunca her gün 10 mg/kg/gün EGCG enjeksiyonu yapılmıştır. Grup 6 ise, bir hafta boyunca EGb 761 40 mg/kg/gün içme sularına katılmıştır ve bir hafta boyunca her gün 10 mg/kg/gün EGCG enjeksiyonu yapılmıştır.

Deney sonunda Histopatolojik ve biyokimyasal çalışmalar için doku örnekleri alındı. Lipid peroksit ürünü olan Malondialdehit (MDA) düzeyi, Süperoksit Dismutaz (SOD) enzim aktivitesi, Nitrit-nitrat tayini için (NO) düzeyi ölçülmüştür.

Biyokimyasal analiz sonunda Deney grubu I, MDA düzeyi anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). SOD enzim aktivitesi açısından en yüksek değerlerin EGb 761 grubunda olduğu ve diğer gruplara oranla anlamlı biçimde yüksek olduğu görülmüştür ($p<0.05$). NO düzeyinde en yüksek değerlerin Deney grubu I'de olduğu ve istatistiksel olarak da anlamlı olduğu görülmüştür. En düşük NO düzeyinin ise EGCG grubunda olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlenmiştir ($p<0.005$). EGb761 ve EGCG grupları arasında ise NO düzeyinde anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Kombine grupta ise SOD enzim aktivitesinin yüksek olduğu görülmüştür ($p<0.05$), aynı zamanda elde edilen bu değerin EGb 761 grubuna göre daha düşük ve EGCG grubuna göre ise daha yüksek olduğu görülmüştür.

Sonuçta intraperitonel EGCG uygulaması, diyetle alınan EGb 761 ve kombine uygulamaların oksidatif stresi önlemede yararlı olabileceği kombine uygulamanın,

uygulamada herhangi bir üstün yanının olmadığı tesbit edilmiştir. Çalışmanın geniş kapsamlı, daha farklı doz ve sürelerde çalışılmasının daha verimli olabileceği kanaatine varılmıştır.

Anahtar kelimeler: siyatik sinir, sıçan, EGCG, serbest radikal, EGb 761.

ABSTRACT

Peripheral nerve injury is one of the important health problems nowadays. Especially, poor regeneration ability of the nerve tissue is a situation making the reestablishment of nerve function difficult. In this experimental sciatic nerve injury model study, The efficacy of the Ginkgo biloba (EGb 761), Epigallocatechin-3 gallate (EGCG) and (EGb 761 + EGCG) application was evaluated on the oxidative injury.

In this study, weighing 220-250 g 48 wistar albino genus grown up male rats were used. The subjects were divided into 6 groups as Control group (Group 1), Sham group (Group 2), experiment group I (Group 3), EGb 761 applied group (Group 4), EGCG applied group (Group 5) and EGb 761+EGCG combined group (Group 6). The group 4 subjects were fed adding EGb 716 to the drinking water in 40 mg/kg/day per subject. To the group 5 members, EGCG 10 mg/kg/day were injected during a week. To the group 6, EGb 761 40 mg/kg/day were added to their drinking water during a week and EGCG 10 mg/kg/day injections were performed for a week.

At the end of the experimental period, tissue samples were taken for histopathological and biochemical studies. Lipid peroxide product malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) enzyme activity were measured and determine the nitrite-nitrate (NO) levels.

At the end of the biochemical analysis MDA levels of Experiment group I were significantly found high ($p < 0.05$). According to the SOD enzyme activity the highest levels were seen in the EGb 761 group and was seen higher than other groups significantly ($p < 0.05$). The highest values of NO levels were found in the experiment group I and it was found that these findings were significant statistically. The lowest values of NO levels were observed in the EGCG group and was found significant statistically ($p < 0.005$). According to the levels of NO, no difference were found in EGb761 and EGCG groups ($p > 0.05$). It was seen that the SOD activity were high in combined group ($p < 0.05$), at the same, it was seen that obtained these values were lower than the EGb 761 and higher than the EGCG group.

As a result, it was found that application of EGCG intraperitoneally, dietary EGb 761 and combined applications may be useful on preventing oxidative stress but weren't

superior to each other. It was concluded that different dose and duration of working in other comprehensive studies might be more beneficial.

Key words: sciatic nerve, rats, EGCG, free radical, EGb 761.

1. GİRİŞ AMAÇ

Periferik sinir hasarı günümüzde sık karşılaşılan olaylardan bir tanesidir. Özellikle ülkemizin coğrafik yapısının dağlık ve engebeli olması göz önüne alındığında toprak kayması, çığ düşmesi, trafik kazaları, bireye bağlı düşme, inşaat kazaları ve bunun gibi daha birçok olay klinik olarak sinir doku üzerinde ezilme tipi hasarlar oluşmasına sebep olmaktadır.

Genelde lezyonun klinik tablosu sinirin lokalize olduğu bölgeye, ezilme oluşturan basınca ve bu basıncın oluşturduğu şiddet etkisine ve ezilme oluşturan basıncın etki süresine bağlıdır. Ezilmeye bağlı olarak sinir üzerinde mekanik iletim bloğu ve basıya bağlı mikrovaskülerizasyon üzerinde blok oluşmaktadır. Daha sonra sinir doku üzerinde basının azalmasıyla oluşan reperfüzyon sonucu ortama yüksek oksijen özellikle oksijen ve ikincil olarak besin maddelerinin yüksek basınçla geri göllenmesi sonucu oluşan serbest radikaller doku üzerinde yıkıcı etkiler oluşturmaktadır.

Hücre olumsuz şartlara adaptasyon eğilimindedir ki bu süreç içinde ani bir oksijen artışı hücre içi bir çok sistemde oksidasyonu artıracığından oluşan ürünler ve substratlar arasındaki düzensiz korelasyon radikal üretimini tetikleyecek, oluşan radikaller ise ilk hedef olarak lipidlere saldıracaktır. Böylece lipid peroksidasyonu artacaktır (44, 45, 46, 56). Sinir sistemi ise lipitçe oldukça zengindir. Sfingomyelin lipidler içeren sinirler işte bu ezilme tipi sinir hasarında iskemi-reperfüzyon hasarına maruz kaldığı için esas olarak hasara uğramaktadırlar (48, 49, 51, 52).

Organizma iskemi reperfüzyon sonucu oluşan serbest radikallere antioksidan sistem dediğimiz enzimatik (SOD, CAT, GSH-Px gibi) ve nonenzimatik sistemleriyle radikal toksifikasyonuna karşı savunma oluşturmaya çalışmaktadır (62, 65, 71, 75).

Çalışmamızda kullandığımız EGb 761 (Tebokan forte) un SOD enzim aktivitesi üzerinde olumlu etkilerinin olduğu daha önceki çalışmalarda belirtilmiştir (82, 83, 84). EGb 761; SOD aktivitesi arttırıcı etkisi, kendisinin SOD enzim aktivitesine sahip olmasından kaynaklanmaktadır (79, 80). SOD aktivitesinin artışı, Nitrit-nitrat düzeyindeki düşme, serbest radikallerin ortamdan temizlenmesi nöronların membran bütünlüğünün sağlanması ve nöron rejenerasyonu açısından önemli bir nokta olduğu için üzerinde çalışılması gereken bir konu olabileceğini düşündürmektedir. EGCG

oksidatif DNA hasarında epigallokateşinin koruyucu etkilerinin olduğu birçok çalışmada yine belirtilmektedir (102). Doz bağımlı epigallokateşin verilerek yapılan iskemi reperfüzyon sonucu serbest radikal salınımı ve hücre hasarı, apoptozis çalışmasında kateşinin koruyucu etkisi olduğu belirtilmiştir (77, 90, 92)

Bu deneysel çalışmada antioksidan etkinliği daha önceki yapılmış olan çalışmalar da gösterilmiş olan EGB 761 ve EGCG'ın ayrı ayrı ve kombine olarak sinir yaralanmaları öncesinde, koruyucu etkilerinin olup olmadığının bulunması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. PERİFERİK SİNİR

2.1.1. Periferik Sinir Anatomisi

Periferik sinir dokusu, sinir lifleri ve bağ dokudan oluşur (1, 2, 5).

Nöron denilen sinir hücreleri, bağımsız anatomik ve fonksiyonel, kompleks morfolojik karakteri olan yapılardır. Çoğu nöron üç yapıdan oluşur, Bunlar: perikaryon, dentrit ve aksondur. Perikaryon denen hücre cismi, hücrenin trofik merkezini temsil eder. Nükleus ve çevre sitoplazmasından oluşur (3).

Sitoplazmada Nissl cisimcikleri denen golgi-ribozom organel kompleksleri vardır. Motor nöronlarda Nissl cisimcikleri bolca bulunur. Sinirlerde olan bir zedelenmede bu cisimcikler azalır (3,8). Ayrıca perikaryonun uzantıları boyunca devam eden nörofilamanlar ve mikrotübüller de perikaryondan başlar (1, 2, 4).

Dendrit (afferent nöron) çevreden, duyu epitelinden veya diğer nöronlardan stimulusları alan birçok dalı olan uzantılardır. Akson (efferent nöron) ise kas, sinir veya glandlara impuls yollanmasını sağlayan hücrenin uzantısıdır. Aksonlarda nörofilamanlardan oluşan mikrotübüller dendritlere nazaran daha az bulunur, aksoplazma (sitoplazma), aksolemma (plazma membranı) tarafından çevrilir. Aksonların çapı ve boyu sinirden sinire değişir. Aksonun distal uçları dallanır ve her biri başka hücrelerle sinapslar aracılığıyla ilişki kurarlar (4, 5) .

Nöronlar fonksiyonel rollerine göre motor nöronlar, duyu nöronları ve inter nöronlar olmak üzere ayrılabilir. Motor nöronlar kas lifleri, ekzokrin ve endokrin glandları kontrol eden efektör nöronlardır. Motor nöronların perikaryonları medulla spinalisin ön boynuzunda bulunur (7).

Farklı fonksiyonlarla ilgili değişiklikler, sinir hücresinin uzantılarında da gözlenir. Ön boynuz nöronları tek aksone ancak hücre gövdesinin her kutusundan çıkan çok sayıda dendrite sahiptirler. Bu şekildeki nöronlara multipolar nöron adı

verilmektedir. Gangliondaki nöron ise tek aksonla birlikte aynı kutuptan çıkan tek dendrite sahip olup bu tip nöronlara unipolar nöron denir (4).

Duyu nöronları çevreden ve vücudun içinden stimulusları alan reseptör nöronlardır. Bunların perikaryonları ise posteriyor spinal köklerin gangliyonlarında bulunur. İnternöronlar merkezi sinir sisteminde nöronlar arasında ilişkiler kuran kompleks fonksiyonel zincirlerdir (4, 5, 8).

2.1.2. Sinir lifi ve konnektif doku

Ratlarda n. ishiadicus, plexus sacralisten köken alan bir sinirdir. Plexus sacralis L4'ün ön dalının bir kısmı ile L5-S1-S2-S3 ve S4'ün bir kısım ön dallarının katılımlarından oluşur. N. ishiadicus ise bütün bu spinal sinirlerin ön dallarının birleşmesiyle meydana gelir ve gluteal bölgede foramen infrapiriformeden pelvis dışına çıkar. Tuberculum major ve tuber ishiadicum arasından geçerek uyluğun ortasında aşağıya iner. Uyluğun 1/3 alt kısmında n. Tibialis ve n. Peroneus communis isimli iki dala ayrılır. Sinir gluteal bölgede m. Obturator internus, mm. Gemelli ve m. quadratus femorisin arkasındadır. Uylukta ise m. Adductor magnusun gerisinde yer alır (6).



Şekil 1: Sıçan siyatik sinir anatomisi

Sinir lifleri, özel kılıflarla sarılmış aksonlardan oluşur. Bu kılıf periferik sinirlerde Schwann hücreleri, merkezi sinir sisteminde ise oligodendrositler tarafından yapılır. Lif grupları beyin ve omuriliğin traktuslarını ve periferik sinirleri oluşturur.

Miyelinli ve miyelinsiz olmak üzere, iki tip sinir lifi vardır. Küçük çaplı aksonlar, genelde miyelinsiz lifleri oluştururlar (10, 11, 12).

Periferik sinir sisteminde sinir lifleri, afferent veya efferent aksonlar içeren miyelinli ya da miyelinsiz sinir lifi demetlerinden oluşan ve çevresi bağ dokusu kılıflarla sarılı oluşumlardır Hızlı sinir iletimi için aksonlar ya boyutlarını büyütürler ya da çevreleri özel Schwann hücreleri tarafından çevrilerek lipid ve proteinden oluşan miyelin tabakasıyla çevrelenirler. Miyelinli bir akson, aynı boyuttaki miyelinsiz bir aksone nazaran daha hızlı sinir akımı iletir. Periferik sinir lifleri yapı ve fonksiyonuna göre başka bir sınıflamada ise A, B, C olmak üzere 3 gruba ayrılır (Tablo 1)(12).

Periferik sinir sisteminde sinir lifleri gruplar oluşturarak sinirleri meydana getirirler. Sinir lifleri grupları arasında epinörium, perinörium ve endonörium denen tabakalar vardır (4, 5, 14, 15).

Endonörium: Aksonlar ve çevrelerindeki miyelin kılıf endonörium denen yapının içinde bulunurlar. Fibroblast ve kollajen matriks, mast hücreleri, kapiller ağ ve geniş ekstrasellüler aralıktan oluşur. Perinörium tarafından çevrilir (5).

Perinörium: Endonöriumun ayırdığı sinir lifleri gruplarının oluşturduğu fasiküller perinörium denen bağ doku kılıfı tarafından çevrilir. Bu kılıf 6-15 kadar farklı yönlere dağılan lamellerden oluşur. Bu konfigürasyon yapıya sağlamlık kazandırır. Ayrıca dış ortamla endonörium arasında difüzyon ve basınç bariyeri oluşturur. Sunderland, perinöriumun iç tabakasını yassı hücrelerin oluşturduğunu, dış tabakasını da fibröz bağ dokunun oluşturduğunu tarif etmiştir (17, 18).

Epinörium: Fasikülleri ve fasikül gruplarını saran zardır ve eksternal ve internal olarak iki tabakaya ayrılır. Eksternal epinörium tüm siniri saran bağ dokudur ve siniri çevre dokulardan ayırır. İnternal epinörium fasikül ve fasikül gruplarını ayırır. Epinörium kalınlığı sinirin lokalizasyonuna göre değişir. Kompresyona ve traksiyona maruz kaldığı yerlerde (eklemleri geçerken) daha kalındır (4, 5, 16)

Bazı sinirler sadece duyu liflerini (afferent) içerirken (duyu sinirleri), bazıları motor lifleri barındırır (1). Ama çoğu sinirler mikst sinirlerdir ve her iki komponenti de bünyesinde bulundurur; bu sinirler hem miyelinli hem de miyelinsiz lifleri içerirler(14, 17).

2.1.3. Lenfatikler

Epinörümde arterlerle birlikte seyreden lenfatik kapillerler bulunur. Endonörümde ve fasiküller içinde lenfatik kapillerler yoktur. Fakat sinir lifleri arasında sıvı dolu endonöral boşluklar vardır. Bu endonöral boşluklarla lenfatikler arasında, perinörüm etkin bir bariyer oluşturur. Bu sebeple travma sonrası kan-sinir bariyerinin bozulmasıyla oluşan endonöral ödem dışarıya çıkamaz; fibroblast invazyonu ve endonöral skar gelişir (7, 8, 14,).

2.1.4. İnervasyon

Periferik sinirlerin nervi nervorum denilen özel sinirleri, perivasküler pleksus yoluyla vazomotor innervasyon sağlayan sempatik sinir lifleri ile sinirin ağrı duyusunu sağlayan serbest sinir uçları vardır. Bunlar epinörüm, perinörüm ve endonörümün her birinde bulunup duyu ve sempatik lifler içerirler (3, 5, 8).

2.1.5. Sinirin Vasküler Yapısı

Periferik sinirlerde birbiriyle yaygın anastomozları olan iki ayrı vasküler sistem vardır. Bunlar, bölgesel besleyici arter, arteriol ve venüllerin oluşturduğu longitudinal epinöral damarlar (ekstrinsik sistem) ve fasiküler endonörüm ve perinörümde bulunan oblik konfigürasyonlu mikrodamarlardır (intrinsik sistem). Ekstrinsik sistem damarları majör vasküler trunkuslardan, kollaterallerden veya musküler damarlarından gelir. İntrinsik sistemden gelen dönüş akımı ise epinörümde bulunan venüllere drene olur. Vasküler yapıdaki bir bozulmada sinir fonksiyonel ve yapısal değişikliğe uğrar. Bu iki damar sistemi arasında bir baskınlık yoktur. Epinöral ve perinöral damarların birbirleri arasında çok sıkı anastomotik bağlantılar vardır (3, 5, 6).

Bir sinir hücresine ait akson ve dendrit gibi hücre uzantılarına sinir lifi adı verilmektedir ki bu periferik sinirin yapısında yer alan sinir demetlerinin temel yapı taşıdır (4, 5, 6, 7). Her bir sinir lifi ise akson, aksonun plazma zarı (aksolemma) ve bunu çevreleyen bir kılıfı bölümlerinden oluşmaktadır. Genel olarak, periferik sinir lifleri iletim hızlarına ve lif kalınlıklarına göre sınıflandırılmaktadır (6, 14).

Tablo 1: Sinir liflerinin iletim hızı ve kalınlıklarına göre sınıflandırılması*

Lif tipi	İletim hızı (m/sn)	Sinir lifi çapı (µm)	Miyelin
A lifleri			
Alfa	70-120	12-20	Var
Beta	30-70	5-12	Var
Gamma	15-30	3-6	Var
Delta	10-30	2-5	Var
B lifleri	3-15	1.5-3.0	Var
C lifleri	0.5-2.0	0.4-1.2	Yok

*Tablodaki veriler Sunderland S'dan (14) değiştirilerek alınmıştır.

Sinir lifleri, en dışta yer alan bağ dokusu kılıf tabakasının mevcudiyetine göre ise; miyelinli ve miyelinsiz olarak iki tipe ayrılmaktadır (10, 11, 12).

Miyelinli Lifler: Somatik sinir sisteminde yer alırlar. Bir Schwann hücresi sadece bir tek aksonu dolandır ve onun miyelininden sorumludur (10).

Bu Schwann hücreleri periferik sinir sisteminin özel uydu hücreleridir. Bu hücreler aksonları endonöral kompartmandan, miyelin tabakası veya plazma membran invajinasyonu ile ayırır. Schwann hücreleri aksonlara destek olur, onlara metabolit ve trofik faktör sağlar (8, 19). Ayrıca iyon dengesinin sağlanmasında da önemli rolleri vardır. Şekil itibariyle düzensiz ve nöronların arasına giren bir yapısı vardır. Schwann hücresinin sitoplazması kendi etrafında spiraller çizerek aksonun çevresinde miyelin kılıfını oluşturur, çekirdeği dışarıda kalır. Miyelin tabakası lipid, protein ve su içerir (20). Yenidoğan büyüdükçe akson üzerindeki miyelin kılıfı da kalınlaşır. Gelişmiş bir nöronda, akson çapı arttıkça miyelin kılıf kalınlığı azalır (21). Aksonun arada miyelin tabakası olmadan doğrudan Schwann hücre kılıfı ile uzunluğu boyunca kuşatıldığı bu yapıda, karşılıklı gelen Schwann hücre membranları mezakson adını alır (21, 22).

Komşu Schwann hücrelerinin arasında aksolemma bir aralık oluşturur ki buralara Ranvier boğumu denir (14, 16). Bunlar düzenli aralarla her iki tarafta yer alır. Bu aralıklar asidik mukoz bir madde ile kaplıdır. Ranvier boğumları arasındaki mesafe

küçük liflerde 300 µ, büyük liflerde 1500 µ kadardır. Histolojik olarak miyelinli liflerde ortada aksoplazma, çevresinde aksolemma, sonra ince preaksonal aralık, daha sonra sırasıyla Schwann hücresi plazma membranı, Schwann hücresi sitoplazmasının ince iç tabakası, birçok membranöz lamel şeklinde miyelin kılıfı, Schwann hücresi sitoplazmasının dış tabakası ve Schwann hücresinin bazal membranı ve bazal laminası bulunur (3, 5, 21, 22).

Kolleteral dallanma yapan aksonlarda yan dallar Ranvier boğumlarından ayrılmaktadır. Miyelin tabakası konsantrik dizilimli tabakalar şeklinde düzenlenmiş ve lameller arasındaki genişleme yerleri miyelin kılıfındaki Schmidt - Lanterman yarıkları olarak adlandırılır. Bu yarıklar ve Ranvier boğumları merkezi sinir sistemi miyelinli sinirlerinde bulunmazlar (7, 14, 16, 25).

Duyu sinirlerinin %75'ini ve motor sinirlerin de %50'sini oluştururlar. Bir tane Schwann hücresi pekçok aksonu ayırır ve besler. Bu lifler çapları 0.15-2 µ gibi küçük liflerdir (5, 8).

2.1.6. Periferik Sinir Yaralanmaları

Periferik sinirler mekanik travmadan (bası, gerilme, şiddet) etkilenebilecekleri gibi termal iskemik ve kimyasal etkenler gibi birçok değişik etkenden dolayı da yaralanabilirler (8). Bu yaralanmaların en sık olanı travmatik yaralanmalardır (20). Gerilme tipi yaralanmalar genellikle, periferik sinir izolasyonunda veya ekstremitte kırıklarında, sinirle kemiğin yakın olduğu noktalarda görülür. Ciddi yaralanmaların % 30'unu oluşturan ve sinirde kesilme ile karakterize yırtılma tipi yaralanmalar, diğer yaygın tip yaralanmalardır. Yırtılma tipi yaralanmalar, kolay bir şekilde oluşturulabildiğinden, araştırmalarda yaygın olarak kullanılan bir modeldir. Yaygın olarak görülen diğer yaralanma türü, ezilme (kompresyon) tipi yaralanmalardır (7, 12, 13, 20, 23). Bu yaralanmada sinirsel elemanların ayrılması veya kopması söz konusu değildir. Ezilme tipi yaralanmalarda, motor ve duyu fonksiyonlarının total kaybı meydana gelebilmektedir. Ezilme (kompresyon) tipi yaralanmalarda, mekanik ezilme ve iskemi olmak üzere iki mekanizmanın, primer etken olabileceği kabul edilmektedir. Bununla birlikte sinir hasarının oluşumunda, hangi mekanizmanın daha önemli olduğu tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Yapılan çalışmalar, kısa süreli ezilme tipi yaralanmalarda, iskeminin fizyolojik iletim bloğuna neden olduğunu göstermiştir. Şiddetli iskemik hasara uğramış sinirde, genellikle fonksiyonun kaybolabileceği ve tam

bir iyileşmenin oluşmayabileceği kabul edilmektedir (7, 12, 20). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, ezilme tipi yaralanmalarda mekanik deformasyonun etkilerinin daha ön planda olduğu görüşü ön plana çıkmıştır. Periferik sinir yaralanmaları hayati tehlike arz etmemelerine rağmen sonuçta kişinin fonksiyonlarını ileri derecede sınırlaması, sosyoekonomik ve psikolojik durumunu etkilemesi açısından dikkate değerdir. Periferik sinir yaralanmalarından sonra istenilen amaç sinir iyileşmesinin (fonksiyonun geri dönüşü) en kısa sürede sağlanmasıdır (18, 20). Periferik sinir harabiyeti, uygulanan kompresyonun süresine ve kuvvetine, sinir liflerinin topografik seviyesine ve büyüklüğüne göre de değişir. Büyük lifler küçüklere göre kompresyon ve iskemiye daha duyarlıdır. Ayrıca sinirde yüzeysel lifler, santralde yer alanlara göre daha hassastır. Sinir içerisindeki fasiküllerin yerleşimine göre de değişkenlik gösterir. Sinirdeki bağ dokusunun miktarı da önemlidir (4, 5, 12). Örneğin eklem çevreleri gibi yüzeysel seyreden ve travmaya uğrayan lokalizasyonlardaki sinirlerde bağ dokusu miktarı fazladır. Büyük lifler küçük liflere oranla kompresyona ve iskemiye daha fazla duyarlıdır. Kalın epineurium içerisine gömülü küçük lifler, ince epineurium içerisine gömülü kalın liflere oranla daha az oranda kompresyona duyarlıdır (13).

Mekanik İletim Bloğu: Kompresyon gibi lokal intranöral mikrosirkülasyonun bloğu varsa metabolik (fizyolojik) iletim bloğundan bahsedilir. Çünkü sinir iletimi lokal enerji desteğine (kanlanmasına) bağlıdır. Bu durumda yapısal olarak sinir sağlam olsa bile impuls iletim problemi olur (5, 6). Üst ekstremiteye uygulanan turnikenin sistolik basınçtan çok yüksek şişirilmesi, peroneal sinirin ayak ayak üzerine atılıp uzun süre kalındığında ayakta hissedilen iğnelenme bu duruma gösterilebilecek örneklerdir. Beslenmemeye bağlı bir iletim bozukluğu olan metabolik iletim bozukluğu, kompresyonun kaldırılması halinde hemen geri döner. Uzun süren iskemilerde geri dönüş, iskemik kalma zamanına bağlıdır. Altı-sekiz saat iskemi sinir liflerinin geri dönüşümsüz hasarı için kritik bir zamandır (13).

2.1.7. Periferik Sinir Zedelenmelerinin Sınıflandırılması

Sinir lezyonları mekanik (kompresyon, germe, ezilme) veya termal; iskemik ve kimyasal nedenlerle olabilir. Lezyonların sınıflandırılmaları, sinir liflerinde ve trunkuslarda olan yapısal veya fonksiyonel değişikliklere göre ayrılabilir (14, 16, 24).

Tablo 2: Hasarın sınıflandırılması (14)

Seddon Sınıflaması	Sunderland	Patoloji	Prognoz
Nöropraksi	Birinci derece	Myelin zararı	Haftalar aylar içinde mükemmel düzelme
Aksonotmezis		Akson kaybı Değişik derecelerde bağ doku kaybı	Destek dokuların bütünlüğünün korunmasına ve kasa olan mesafeye bağlı olarak iyiden kötüye değişebilen prognoz
	İkinci derece	Akson kaybı Endonöral tüpler sağlam Perinöryum sağlam Epinöryum sağlam	Kasa olan mesafeye bağlı olarak iyi prognoz
	Üçüncü derece	Akson kaybı Endonöral tüpler hasarlı Perinöryum sağlam Epinöryum sağlam	Kötü prognoz Aksonlar hatalı yöne gidebilir Cerrahi gerekebilir
	Dördüncü derece	Akson kaybı Endonöral tüpler hasarlı Perinöryum hasarlı Epinöryum sağlam	Kötü prognoz Aksonlar hatalı yöne gidebilir Cerrahi sıklıkla gerekir

Nörotmezis	Beşinci derece	Akson kaybı Endonöral tüpler ağır hasarlı Perinöryum ağır hasarlı Epinöryum ağır hasarlı	Spontan iyilik olmaz Cerrahi gereklidir Cerrahiden sonra prognoz belirlenir
------------	----------------	---	---

Mackinnon ve arkadaşları Sunderland sınıflamasına "Altıncı Derece" zararlanma eklemeyi önerirler. Bu, kimi liflerde akson kaybının kimi liflerde ise ileti bloğunun olduğu mikst zararlanmadır. Bu tür lezyonlar olasılıkla çok yaygındır ve akson kayıplı lezyonlardan ayırım için dikkatli elektrodyagnostik inceleme gerektirir (24). Sinir yaralanmasından sonra meydana gelen mikroskobik değişikliklerin korrelasyonuna izin veren ve klinikte kullanışlı olan yaralanma türleri geliştirilmiştir. Seddon ile Sunderland tarafından geliştirilen sınıflandırma günümüzde yaygın olarak kabul edilmektedir (14, 15, 16). Seddon yaralanmaları şiddetine göre; nöropraksi, aksonotmezis ve nörotmezis olmak üzere 3 sınıfa ayrılmaktadır (3, 5, 8). Sinir devamlılığının kaybolmadığı ancak geçici bir fonksiyonel kaybın olduğu nöropraksi, bu yaralanmaların en hafif tipidir. Nöropraksiste, miyelin yapısında bazı değişiklikler meydana gelmesine rağmen, oluşan geçici fonksiyon kayıplarının yaralanma bölgesindeki lokal bir iyon-aracılı iletim bloğundan dolayı oluştuğu düşünülmektedir (5). Akson ve miyelin kılıfın tamamen kesilmesiyle aksonotmezis oluşmaktadır. Aksonotmeziste, epinöryum ve perinöryum genellikle korunmuştur. Yaralanmanın distal bölgesinde, akson ve miyelin dejenerasyonu sonucu tam bir denervasyon meydana gelmektedir. Nörotmeziste, sinirin bağlantılarının kesildiği ve tam bir fonksiyonel kaybın olduğu yaralanma tipidir. Bu tip yaralanmada aksonda yeniden büyümeyi yönlendirecek yapılar kaybolur ve skar oluşur. Cerrahi girişim yapılmadan genellikle iyileşme meydana gelmemektedir (26, 27, 30).

Sunderland sinir yaralanmalarını 5 grupta değerlendirmiştir (1, 14); 1. derece yaralanma, Seddon'un nöropraksi tipi yaralanmasına, 2. derece yaralanma ise aksonotmezise eşdeğer olarak kabul edilmiştir. 3. derece yaralanmalar aksonda kesilme ile meydana gelen, Seddonun nöropraksi ve axonotimes tipleri arasında bir yaralanma tipine eşdeğerdir. Bu tip yaralanmalarda endonöryum da kısmen hasar görmektedir (1).

Endonöryumdaki hasarın derecesine bağlı olarak iyileşme oluşabilir. Sunderland, Seddon'un nörotimes tipi yaralanmasını, 4. ve 5. derece yaralanmalar

olarak sınıflandırmıştır. 4. derece yaralanmada, epinöryum haricinde sinirin bütün kısımları bozulmakta, 5. derece yaralanmada ise sinir tamamen kesintiye uğramaktadır. Her iki yaralanmada da iyileşme ancak cerrahi girişim ile sağlanabilmektedir (16, 17, 18).

2.1.8. Yaralanma Sonucu Oluşan Dejenerasyon

Dejenerasyon sonucu gözlenen başlıca yapısal değişiklikler, nöronda nörotübül ve nörofilamanların düzensiz hale gelmesi, akson ve miyelin kılıfın birbirlerinden ayrılmaları, aksonda varikoz şişkinliklerin oluşmasıdır. Miyelin kılıf dejenerasyonu özellikle 36-48 saat içinde belirgin hale gelir (27). Yaralanmadan sonra 48-96 saatte genellikle akson devamlılığı kaybolur ve impuls iletimi bozulur. Birinci derece yaralanmalarda, patolojik değişiklikler ya hiç yoktur ya da çok hafiftir. İkinci derece yaralanmalarda, yaralanma bölgesinde veya bu bölgenin proksimalinde hafif histolojik değişiklikler oluşmaktadır. Yaralanma bölgesinin distalinde ise Wallerian dejenerasyonu meydana gelmektedir (17, 18, 19, 20, 21, 27, 40). Wallerian dejenerasyonunda primer histolojik değişiklik, akson ve miyelin kılıfta oluşan yapısal bozukluklardır. Wallerian dejenerasyonunda Schwann hücrelerinin anahtar rol oynadıkları kabul edilmektedir (19, 20).

Schwann hücreleri yaralanmadan sonra 24 saat içinde aktif hale geçer, çekirdek ve sitoplazmik büyüme gösteren hücreler, hızla bölünerek tamir yoluna yardım edecek birçok molekülü eksprese ederler. Schwann hücreleri dejenerasyon sonrası, akson ve miyelin artıklarını ortadan kaldırır. Periferik kandan göç eden makrofajlar ile Schwann hücreleri, fagositoz yaparak, yaralanma bölgesini 1 haftadan bir kaç aya ulaşan bir sürede temizler (20, 21, 24, 25). Endonöryumda bulunan mast hücrelerinin de önemli rollere sahip oldukları bilinmektedir. Bu hücreler yaralanmadan sonra ilk 2 hafta içinde çoğalırlar, makrofaj göçünü kolaylaştıran ve kapiller permeabiliteyi arttıran histamin ve serotonin salgırlar (24). Başlangıç evresinde, travmaya cevap olarak endonöral tüp şişer, ilk iki haftadan sonra çapı oldukça azalır. 5-8 haftada dejenere olan sinir artıkları genellikle ortadan kaldırılmıştır (25). 3. derece yaralanmalarda travma-aracılı lokal bir reaksiyon meydana gelir. İntrafasiküler yaralanmalarda sinir lifi distal kısımları elastik endonöryumlarından dolayı retraksiyona uğrar. Lokal vasküler travma, etkin enflamatuvar cevapla sonuçlanan hemoraji ve ödeme yol açar. Fibroblastlar proliferer

olur ve oluşan fibröz bağ dokusu, yaralı segmentte şişkinliğe neden olur. İntrafasiküler skar dokusu sinir gövdesinde de gelişir ve genellikle perinöral skar dokusu ile kaynaşır (24, 27).

2.1.9. Sinir Proksimalinde Meydana Gelen Değişiklikler

Yaralanmayı takiben proksimal segmentte, akson çaplarının azalmasıyla beraber sinir iletim hızı da düşmektedir. Rejenerasyon sürecinde, akson çapları artmakla beraber, yaralanmadan önceki normal boyutlarını kazanamamaktadır. Fonksiyonel periferik bağlantılar yeniden kurulmadan, hücre perikaryonunda tam bir iyileşme meydana gelmez. Akson çapındaki artış, hücre perikaryonundaki iyileşme ile doğru orantılıdır. Yaralanmayla beraber nöronun çekirdeği 6 saat içinde perifere göç eder, Nissl cisimcikleri bozulur ve nöroplazmaya dağılır. Bunun dışında, nöronun sinaptik bağlantıları da genellikle bozulur (26, 27). Dorsal kök gangliyonunda apoptozla hücre ölüm insidansının %20-50'ye kadar arttığı rapor edilmiştir (20). Yaralanmadan sonra, periferik sinir mikroçevresinde, Schwann hücrelerinin destekleyici rolleri yanında, salınan pek çok tropik molekülün, hücre yaşamını etkilediğini bildiren çalışmalar yayınlanmıştır (27, 28).

2.1.10. Büyüme konisi

Rejenere olan aksonun en distali büyüme ucudur ve koniktir. Büyüme konisinin çevreyi algılama ve bilgiyi işleyerek aksonu en uygun ortama yönlendirme yeteneği vardır (23, 24, 30). Filopodiumlar parmaksı çıkıntılardır ve aktif olarak genişlerler. Lamellipodlar membranın daha büyük genişlemeleridir. Bu çıkıntılar büyüme konisinin tabanında mikrotübüllerce desteklenen aktin filamanlar üzerinde uzanırlar (30).

Büyüme konisi 4 grup faktöre cevap verir. Bunlar;

- Nörotrofik faktörler
- Nöron geliştirici faktörler
- Matriks oluşturan prekürsörler
- Metabolik ve diğer faktörler

Nörotrofik faktörler denerve motor lif ve duyu reseptörlerinde bulunan makromoleküler proteinlerdir. Ayrıca Schwann hücrelerinde de bulunur. Bu faktörler nöron gelişimi ve maturasyonunda yardımcı görevler üstlenir. En iyi bilinen nörotrofik faktör Nöron Geliştirici Faktör (NGF)'dir. Bunun yanında silier nörotrofik faktör ve motor sinir gelişim faktörü de diğer önemli nörotrofik faktörlerdir (30, 31, 32).

Nöron geliştirici faktörler glikoprotein yapıdadır. Laminin bunlardan en iyi bilinenidir. Schwann hücresi bazal membranı laminin gibi nöron ilerletici faktörler içerir. Laminin'in aksonal rejenerasyonu artırdığı gösterilmiştir (30).

Prekürsör olarak matrix oluşturan fibrinojen, fibronektin ile polimerize olarak fibrin matriksini meydana getirir, bu da hücre migrasyonu ve sinir rejenerasyonu için önemli bir substrattır (28).

Dördüncü grup çok çeşitli faktörler içerir. Asidik ve bazik fibroblastik faktörler insülin ve insülin benzeri gelişim faktörleri, glia kökenli proteaz inhibitörü, elektrik stimülasyonu ve tiroid hormonu, kortikotropin, östrojen, testosteron gibi hormonlar bu gruplarda değerlendirilir (19, 25, 30).

2.1.11. Hasar alanı

Wallerian dejenerasyonundan önce şiddetli ve hızlı bir şekilde travmatik dejenerasyon görülür. Bu sırada masif bir protein ve de potasyum kaybı, sodyum ve kalsiyum artışı görülür. De Medinaceli ve Seaber bu durumu kimyasal yanma olarak isimlendirmiştir (33).

2.1.12. Sinir Distalinde Meydana Gelen Değişiklikler

Bir akson kesildiğinde ve bütünlüğünü kaybettiğinde distal parça Wallerian dejenerasyonu ile karakterizedir. Wallerian dejenerasyonunun geç dönemlerinde Schwann hücre yığınları ile karakterize kollabe endonöral tüpler mikroskopta da ayırt edilmektedir. Schwann hücre sütunlarından oluşan aksonun rehber yolları, Büngner bantları (34, 35, 36) olarak adlandırılır. Dolayısıyla bu bantlar, sinir yaranmasından

sonra, akson büyümesi için Schwann hücrelerinin nöronları destekleyici etkilerinin önemli bir göstergesidir. 4. ve 5. derece yaralanmalarda endonöral tüpler tamamen bozulur, Schwann hücreleri ve aksonlar tanımlanamaz hale gelirler. Bu tip yaralanmalarda epinöryumda önemli yapısal değişiklikler oluşur. 24 saat içerisinde dejenere olmuş sinir uçlarında reaktif epinöral fibroblastlar ortaya çıkar. Bütün bunlar, Schwann hücreleri, perinöral ve endonöral fibroblastların proliferasyonu ile birlikte (37, 38). Etkin hücresel çoğalma bir hafta içinde en yüksek düzeye ulaşır ve uzun süre devam eder. Hafif yaralanmalarda olduğu gibi, kapiller permeabilite artmaktadır, bu artış, mast hücre proliferasyonu, ödem ve takip eden makrofaj infiltrasyonu sonucu oluşmaktadır. Hücresel cevapların büyüklüğü, sinir ve onu saran dokulardaki travmanın şiddetiyle paralel bir korelasyon göstermektedir. 4. ve 5. derece yaralanmalarda sinirin son kısımları, şişkinleşmiş ve dejenerasyona uğramış Schwann hücreleri, fibroblastlar, makrofajlar ve kollajen lif demetleri ile karakterizedir. Sinir rejenerasyonu, yaralanmanın şiddeti, skar oluşumunun büyüklüğü ve aksonun yaralı bölgeye ulaşmasından önce geçen süre gibi, pek çok faktöre bağlı olarak değişiklik göstermektedir (22, 23, 39).

2.1.13. Sinir Rejenerasyonu

Aksonal tomurcuklanmayı başlatarak rejenerasyonu sağlayan mekanizmalar hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Rejenerasyonun başlaması, yeni gen ekspresyonu ve proteinlerle ilgilidir. Büyüme konileri (growth cone), aksotomi sonrası proksimal aksonun en uç kısmındaki aksonal genişlemedir. Büyüme konileri, granülsüz endoplazmik retikulum, nörofilaman, mikrotübül, mitokondri, lizozom ve diğer veziküller bakımından oldukça zengindir. Buradan aksonal tomurcuklanma ile rejenerasyon başlar. Rejenerasyon işleminde aksonlar, nöronal olmayan hücreler ve ekstraselüler elemanlar rol oynar. Diğer taraftan yaralanma bölgesindeki nörotrofik faktörlerin rejenerasyondaki etkileri çalışmalarla gösterilmiştir. Rejenerasyon sırasında genellikle tübülün yapımı ve taşınması artmıştır (32, 33). Fonksiyonel bir sinir rejenerasyonu için aşağıdaki üç işlemin başarıyla tamamlanması gereklidir (33):

Aksonal kesi sonrası nöron gövdesi canlı kalmalıdır. Nöronlar, proksimal uçtan aksonu rejenere etmeli ve rejenere akson ucu distal sinir ucuna gitmelidir.

- 1) Rejenere olan aksonlar proksimal uçtan çıkıp kendilerine ait hedef organlarla birleşmelidir (34). Dejenere sinir kılıflarından ve denerve dokulardan salınan trofik faktörlerin, akson rejenerasyonunu tetiklediği görüşü benimsenmiştir.
- 2) Rejenere aksonlar, distal uçtaki endonöral tüpler içine doğru ilerler. İlerlemenin hızı, canlı türlerine göre değişmekte olup insanlarda ortalama günde 1-3 mm'dir.

Rejenere aksonun çevresini kuşatan Schwann hücreleri, hem akson büyümesi için uyarıcıdır hem de proksimalden distale miyelinizasyonu başlatır. Promiyelinli lifler, doğru hedef organa ulaştıktan sonra proksimalden distale doğru akson çapı artar. Ancak kesi öncesi miyelin kalınlığı ve akson çapına erişemezler (32).

Rejenerasyon hızı erişkin ve fetusta aynı olmakla birlikte, remiyelinizasyon hızı fetusta daha fazladır. Bu sırada promiyelinli rejenere aksonlara uygulanan bası ve mikrotravmalar, kılıf kalınlığı ve akson çapının daha da kısılmasına sebep olur (34).

2.2. LİPİD PEROKSİDASYONU

Lipid peroksidasyonu kimyasal bir olaydır ve serbest radikaller tarafından başlatılarak membran yapısındaki poliansature yağ asitlerinin oksidasyonuna (PUFA) neden olur. Bu lipid peroksit radikalleri ($L-O_2^{\bullet}$), membran yapısındaki diğer poliansature yağ asitlerini etkileyerek (41), yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksidlerine ($L-O_2H + L^{\bullet}$) dönüşürler (41, 42, 43). Lipid peroksidasyonunun, zarların lipid yapısındaki değişiklikler nedeniyle fonksiyonların bozulması, oluşan serbest radikallerin enzimler ve diğer hücre bileşenlerine etkisi, son ürünler olan aldehitlerin sitotoksik etkileri gibi farklı yollarla hücre hasarına neden oldukları düşünülmektedir. Lipid peroksidasyonu çok toksik bir zincir reaksiyonudur. Kendiliğinden ilerleyen zincir reaksiyonu olması nedeniyle önemlidir. Direkt olarak membran yapısına ve indirekt olarak reaktif aldehitlere diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Dolayısıyla doku hasarına ve pekçok hastalığa sebep olur (45). Lipid radikallerinin hidrofobik yapıda olması yüzünden reaksiyonların çoğu membrana bağlı moleküllerle meydana gelir, membran permeabilitesi ve mikroviskozitesi ciddi şekilde etkilenir. Lipid hidroperoksitleri yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşurlar. Bu

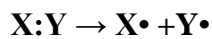
bileşikler, hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki eski alanlarından difüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayabilirler. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu, malondialdehid (MDA) oluşturur (42, 43), bu da tiyobarbitürik asitle ölçülebilir. MDA, yağ asidi oksidasyonunun spesifik veya kantitatif bir indikatörü değildir, ancak lipid peroksidasyonunun derecesine bağlı bir ilişki gösterir (44, 47). Peroksidasyonla oluşan MDA, membran bileşenlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olur. Bu da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir. Bu etkiler, MDA'nın niçin mutajenik, genotoksik ve karsinojenik olduğunu açıklar (44, 45, 46, 47).

2.3.SERBEST RADİKALLER

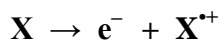
Serbest radikaller birçok fizyolojik veya patolojik reaksiyonlar sırasında oluşabilen bir veya daha fazla eşleşmemiş elektronu bulunan atom veya moleküllerdir. Serbest radikaller kimyasal sembollerinin üst tarafına konulan nokta ile gösterilirler. Örneğin; süperoksit radikali: (O_2^{\bullet}), hidroksil radikali: (OH^{\bullet}) (46, 47). Genellikle radikal olmayan maddelere göre daha reaktif olduklarından eşleşmemiş elektronlarını paylaşmak için diğer moleküllerle hızla reaksiyona girerler. İki serbest radikalın birleşmesi sırasında eşleşmemiş elektronları da birleşerek bir çift oluşturur. Böylece her iki radikal ortadan kalkar. Ancak organizmada bulunan moleküllerin çoğu eşleşmemiş elektron içermediğinden serbest radikaller çoğu zaman radikal olmayan maddelerle tepkimeye girerek yeni serbest radikaller oluşturur. Bu olaylar zincir tepkimeler olarak sürme eğilimindedir (48, 50).

Serbest radikaller üç yolla oluşurlar (54):

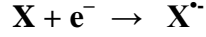
- 1) Kovalent bağlı bir molekülün simetrik olarak her iki parçada ortak elektronlardan biri kalacak şekilde homolitik olarak parçalanması ile



- 2) Bir molekülden tek bir elektronun kaybıyla ki bu olay çoğunlukla heterolitik bölünmede görülür



3) Moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile

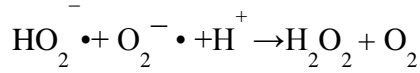


Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu oluşurlar. Serbest radikaller pozitif, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötral olabilirler (47, 48, 52, 53, 54).

2.3.1. Süperoksit Radikali

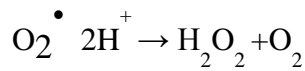
Doğal oksijen molekülünün çevresindeki herhangi bir molekülden bir elektron almış hali olan süperoksit (O_2^{\bullet}) molekülü başka moleküllerle kolayca elektron alışverişine girebilen bir özelliktedir, yani radikaldir (43, 47, 48). Mitokondride elektron transport zinciri sırasında O_2 'nin oksidasyonu ile oluşur. Süperoksit radikali, hem iyi bir redüktan hem de iyi bir oksidandır ve zincir reaksiyonları başlatabilir. Süperoksit bir serbest radikal olmakla birlikte, çok zararlı değildir. Asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır (49).

Serbest oksijen radikal oluşumu, genellikle oksijenin univalan indirgenmesiyle süperoksit radikalının açığa çıkmasıyla başlar. Sitokrom c'yi indirgemesi süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından inhibe edilir. Bundan yararlanılarak SOD aktivitesi ve fagositler tarafından üretilen (O_2^{\bullet}) tayini yapılır (41, 48, 50). Süperoksit ile perhidroksil radikali (HO_2^{\bullet}) birbirleriyle reaksiyona girince, biri okside olur ve diğeri indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonunda oksijen ve hidrojen peroksit oluşur. SOD enzimi bu reaksiyonu katalize eder (50, 56).

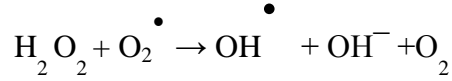


2.3.2. Hidrojen Peroksit

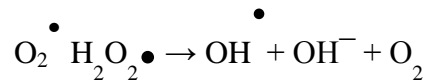
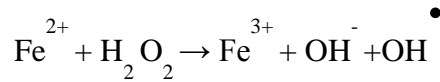
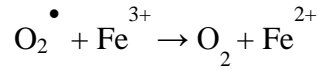
Doğal oksijen, çevresindeki moleküllerden 2 elektron alırsa, oluşan molekül peroksittir (41, 44, 45, 46).



Bu dismutasyon ya kendiliğinden artar veya SOD tarafından katalizlenir. Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü süperoksit ile reaksiyona girerek en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikalini (OH[•]) oluşturmak için kolayca yıkılabilir (41, 44, 50, 51).



Bu reaksiyona Haber-Weiss reaksiyonu adı verilir. Katalizör varlığında veya katalizörsüz oluşabilir. Ancak katalizörsüz reaksiyon çok yavaş ilerler, demirle katalizlenen ikinci şekli ise çok hızlıdır. Bu reaksiyonuna da “Fenton Reaksiyonu” adı verilir (42, 44, 49).



2.3.3. Singlet Oksijen (Tek Değerli Oksijen)

Ortaklanmamış elektronu olmadığı için, radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonları ile oluşabildiği gibi serbest radikal reaksiyonlarını da başlatabilir (41, 42, 43, 46, 48, 51).

Merkezi sinir sisteminin, serbest oksijen radikalleri ve özellikle (OH[•]) hidroksil radikalinin tahrip edici etkisine maruz kalmasının nedenleri şunlardır;

- Beynin hacmine göre yüksek oranda oksijen tutması
- Merkezi sinir sisteminin serbest demir içeriğinin yüksek oranda olması ve bu durumda H_2O_2 in en toksik serbest oksijen radikali olan OH^{\bullet} radikaline dönüşmesi.
- Nöronların onarım yeteneğinin olmaması
- Beynin kolayca okside olabilen yüksek miktarda yağ asidi içermesi

2.3.4. Hidroksil Radikali

Hidroksil radikali (OH^{\bullet}), transisyon metallerinin varlığında hidrojen peroksitin indirgenmesiyle oluşur. Bundan başka, suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucu da hidroksil radikalleri oluşur. Bu serbest radikal yüksek reaktivitesinden dolayı derhal tüm hücrel komponentlerle reaksiyona girer, bu yüzden hücre için çok toksiktir. Son derece reaktif bir oksiradikaldir. Yarılanma ömrü çok kısadır ve oluştuğu yerde büyük hasara neden olur (44, 46, 48, 49).

2.3.5. Serbest Radikal Kaynakları

Antioksidanları, doğal (endojen) ve eksojen kaynaklı olmak üzere iki grupta toplayabiliriz (44, 46).

2.3.5.1. Endojen Kaynaklar

- Hücrelerde birçok endojen radikal üretim kaynağı vardır.
- Mitokondrial ve mikrozomal elektron transport zinciri
- Aktive fagositler (polimorfonüveli lökositler ve makrofajlar)
- İskemi-reperfüzyon
- Ksantin oksidaz

Paradoks olarak iskemi sonrası reperfüzyon ve hipoksiden sonra reoksijenasyon doku hasarına yol açabilir. Eğer aerobik metabolizma için oksijen desteği yetersizse, yüksek enerjili fosfor bileşiklerinden Adenozin Trifosfat (ATP) oluşan doku enerji depoları boşaltılır ve hipoksantin oluşur. Reoksijenasyonda hipoksantin ATP onarımı için kullanılır. Ancak doku hipoksisi uzun sürerse, reoksijenasyonda ksantin oksidaz etkisi ile hipoksantin ksantine çevrilir. Bu reaksiyon süperoksit üreten bir süreçtir ve şu hastalıklarda görülebilir:

- Bütün hipoksi halleri
- Cerrahi müdahale bölgesindeki damarların klemplenmesi
- Mikrosirkülasyon kaybı (Diyabet, Refleks sempatik distrofi)
- Bazı damar tıkanması tabloları (Serebral enfarkt)
- Organ transplantasyonu

Travmatik kazalar ve bunun gibi

2.3.5.2. Eksojen Kaynakları

- Aşırı oksijen konsantrasyonu (hiperoksi)
- İyonize radyasyon
- Sigara içilmesi
- Redoks sikling ksenobiyotikler: Bir insektisit olan paraquat ve sitotoksik bir ilaç olan doksorubisin.
- Kimyasal madde zehirlenmeleri
- Hava kirliliği
- Pestisit kullanımı
- Silikat tozları ve bunun sonucu oluşan solunum yetersizlikleri

2.3.6. Serbest Radikallerin Membran Lipidlerine Etkisi

Serbest radikaller, biyomoleküllerin çoğunu etkiler, fakat lipidler en hassas olanlarıdır (44, 46, 49). Biyolojik zarlar büyük miktarlarda yan bağlı çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) içerirler. Membran kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon oluştururlar. Lipid peroksidasyonu ile oluşan membran hasarı geri dönüşümsüzdür (50, 56). Lipid peroksidasyonu zarın yapısında ve barındırdığı enzimlerde birtakım hasarlar oluşturur. Zar geçirgenliği nedeniyle kalsiyum homeostazisi değişebilir ve ATP'azların kalsiyumu tutması azalabilir, Fosfolipaz A₂'yi uyarabilir, bu da reseptör fonksiyonlarını etkiler. İyon pompalarını ve reseptörlerin bağlanmasını etkileyebilir. PUFA'ların hasarından dolayı zarın akışkanlığını da azaltır ve dinamik membran yapısında bozulmalar oluşur. Membranının bütünlüğünün kaybıyla hücre ölümü ve doku nekrozu gerçekleşebilmektedir (41, 42, 43). Lipit peroksidasyonu, lipit peroksitlerinin malondialdehit (MDA) ve diğer karbonil bileşiklerine dönüşmesiyle sona erer (43, 44, 46).

2.3.7. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri

Proteinlerin serbest radikal hasarından ne derece etkileneceği aminoasit bileşenlerine bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin, sistein gibi aminoasitleri içeren proteinler serbest radikallerden kolayca etkilenirler. Proteinler üzerinde olan serbest radikal hasarı birikmişse ya da belirgin proteinlerin spesifik bölgesi üzerinde yoğunlaşmışsa hücrenin canlılığı bakımından zararlı etki yapar (46, 48, 56).

2.3.8. Serbest Radikallerin Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Sitotoksisite büyük oranda nükleik asit baz modifikasyonlarından doğan kromozom değişikliklerine ya da DNA'daki diğer bozukluklara bağlıdır. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit, membranlardan kolayca geçip hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilirler (56, 58).

2.3.9. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri

Monosakkaridlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksidler ve okzoaldehitler oluşur. Bunlar özellikle diabetin patogenezinde önemli rol oynarlar. Bağ dokusunun önemli bir mukopolisakkaridi olan hiyalüronik asit ile serbest radikallerin etkileşerek bağ dokusunun yapısının bozulmasına ve doku vizikozitesinin kaybolmasına neden olur (43, 44, 46).

2.4. ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

Reaktif oksijen türlerine karşı koruma, oluşan radikallerin detoksifiye edilmesi, radikal zincir reaksiyonlarının ve radikal oluşumunun engellenmesi ile sağlanmaktadır (51). Antioksidanlar peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid preoksidasyonunu inhibe ederler (87).

2.4.1. Antioksidan etki tipleri

Antioksidan maddeler buldukları hücrel kompartmana ve fonksiyonel özelliğine göre antioksidan etkisi açısından şu şekillerde sınıflandırılabilir (41, 43, 44)

1. Toplayıcı (scavenging) etki: Serbest oksijen radikallerini tutma veya daha zayıf yeni bir moleküle çevirme etkisidir.

2. Bastırıcı (quancher) etki: Serbest radikallerle etkileşme sonrasında, onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan ya da inaktif şekle dönüştüren etki şeklindedir.

3. Zincir kırıcı (chain breaking) etki

4. Onarıcı (repair) etki

2.4.1.1. Doğal Antioksidanlar (Endojen)

Organizmada ya da hücrel kompartmanlarda bulunan enzimatik yada enzimatik özelliği olmayan moleküllerdir (43).

1-Enzimler:

- Mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi,
- Süperoksit dismutaz (SOD),
- Katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz(GPx) ve
- Glutatyon transferaz (GST)

2- Enzim olmayanlar:

- Lipid fazda bulunanlar: Alfa-tokoferol ve beta-karoten
- Sıvı fazda bulunanlar: Askorbik asit, melatonin, ürat, sistein, ferritin, albümin, bilirubin, serüloplazmin, transferrin, laktoferrin, miyoglobin, hemoglobin, glutasyon (44).

2.4.1.2. Eksojen Antioksidanlar

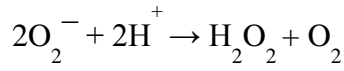
- Ksantin oksidaz inhibitörleri: Allopürinol, oksipürinol, folik asit
- Soya fasülyesi inhibitörleri
- NADPH oksidaz inhibitörleri: Adenozin, lokal anestezikler, kalsiyumkanal blokerleri, non-steroidal antiinflamatuvar ilaçlar
- Rekombinant superoksid dismutaz
- Diğer nonenzimatik serbest radikal toplayıcıları: Mannitol
- Demir redoks döngüsü inhibitörleri: Desferrioksamin
- Nötrofil adhezyon inhibitörleri (44, 46).

2.4.1.3. Gıda Antioksidanlar

- Butylated hydroxytoluene (BHT)
- Butylated hydroxyanisole (BHA)
- Sodyum benzoat
- Ethoxyquin
- Propyl gallate
- Demir-superoksid dismutaz

2.4.2. Superoksit Dismutaz (SOD)

McCord ve Fridovich 1968'de sığır eritrositlerinden bir enzim izole ettiler ve süperoksit anyonunu hidrojen peroksit ve oksijene parçalayan bu enzime önceleri hemokuprein adını verdiler. Daha sonra mitokondri ve prokaryotik hücrelerde bulunan Mn taşıyan formu ile ökaryotik hücrelerin sitozolünde bulunan Cu-Zn taşıyan formları olduğu görülen bu enzime süperoksit dismutaz adı verildi (52, 53). Superoksit dismutaz, süperoksidin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir (49, 54, 75)



Bu reaksiyon kendiliğinden olarak da oluşabilir. Ancak SOD ile katalizlendiğinde reaksiyon hızı 4000 kat artar. SOD'lar bir grup metalloenzimlerdir (43).

SOD-1: Cu-Zn SOD, sitoplazmada bulunur.

SOD-2: Mn SOD, mitokondride bulunur

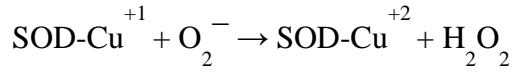
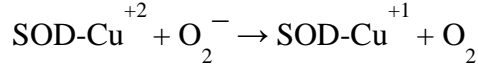
SOD-3: Fe-SOD, Bazı bakterilerde saptanmıştır.

SOD-4: Ni-SOD, Bazı bakterilerde bulunur. Aminoasit kompozisyonu diğer izoenzimlerden farklıdır.

Tüm izoenzimler aynı reaksiyonu katalizler. Enzimin fizyolojik fonksiyonu, oksijen metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikallerinin (O_2^-) zararlı etkilerine karşı korumaktır. Aynı zamanda lipid peroksidasyonunu da inhibe ederler. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanan dokularda fazladır. Normal metabolizma sırasında süperoksit üretimi yüksek orandadır. SOD'ın ekstraselüler aktivitesi ise çok düşüktür (51, 52, 57, 75).

Süperoksit Dismutaz enziminin, süperoksit anyonuna olan etkisi şu şekildedir:

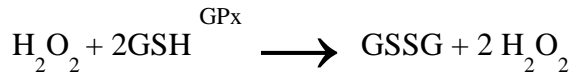
Superoksit anyonu, Cu^{+2} ve bir arginin rezidüsünün guanido grubuna bağlanınca, bir elektron Cu^{+2} 'ye bağlanır ve Cu^{+1} ve moleküler oksijen oluşur. İkinci bir reaksiyonda süperoksit Cu^{+1} 'den bir elektron alarak H_2O_2 ve Cu^{+2} oluşur.



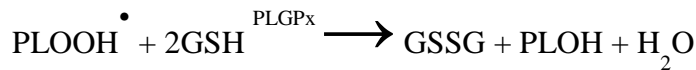
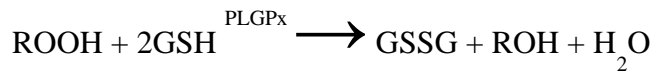
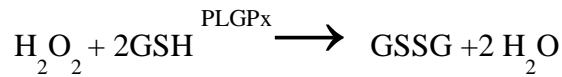
Süperoksit Dismutaz enzimi granülosit fonksiyonu için önemlidir. Çünkü fagosite edilmiş bakterilerin intraselüler olarak öldürülmesinde rol alır. Lenfositlerde daha fazla SOD enzimi bulunur (57, 60, 62).

2.4.3. Glutasyon Peroksidaz

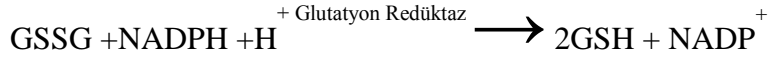
Glutasyon peroksidaz hidroperoksitlerin indirgenmesinde sorumlu enzimdir. Lipid peroksitlerini daha az toksik yağ asitlerine indirger. Oluşan H_2O_2 , Glutasyon peroksidaz ya da katalaz aracılığı ile suya indirgenir. Selenyum bağımlı Glutasyon peroksidaz, H_2O_2 ve organik hidroperoksitlerin glutasyon tarafından indirgenmesini katalize eden peroksidazlardan biridir (51, 56, 57, 58, 75).



Fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz (PLGPx) monomerik, selenyum atomu içeren sitozolik bir enzimdir. Membran fosfolipid hidroperoksitlerini (PLOOH^\bullet) alkole indirger (55).



Hidroperoksitlerin redükte olması ile oluşan GSSG, glutatyon redüktazın katalizlediği reaksiyon ile yeniden GSH'ya dönüşür (43, 56, 57).



Eritrositlerde de Glutatyon peroksidaz oksidan strese karşı en etkili antioksidandır. Glutatyon peroksidaz aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksidin artmasına ve şiddetli hücre hasarına neden olur (43, 44, 45, 67, 75).

2.4.4. Nitrik oksit (NO)

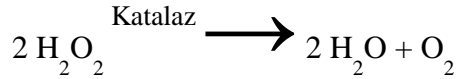
Nitrik oksit; L-arginin aminoasidinden sentezlenir. NO'nun vazodilasyon, platelet adhezyonu ve agregasyonu, sınırlı nötrofil aktivasyonu etkileri vardır. Yüksek konsantrasyonunda Siklik Guanozin Monofosfat (cGMP)'dan bağımsız mekanizma ile indüklenebilir, düşük konsantrasyonunda ise NO'dan cGMP bağımlı mekanizma ile sitoprotektif endotelial NO sentaz (eNOS), indüklenebilir NO sentaz (iNOS), nöronal NO sentaz (nNOS) meydana gelir. Güçlü bir oksidan ajan olan Peroksinitrit (OONO^\ominus), NO'nun O_2^\ominus ile reaksiyona girmesi ile oluşur. OONO^\ominus , nötrofil gibi insan inflamatuvar hücrelerinde apoptozise yol açar (42, 43, 44, 56, 57, 60). NO molekülü inflamatuvar bozukluklarda ve nörodejeneratif durumlarda artar, GİS motor bozukluklarda azalır. NO, fizyolojik ve patolojik süreçlerin önemli bir biyolojik habercisidir. L-argininden NO sentaz yardımıyla NADPH ve O_2 ' e bağlı süreçlerde meydana gelir (57, 57, 60, 75).

2.4.5. Mitokondriyal sitokrom oksidaz

Süper oksit radikalini detoksifiye eden mitokondriyal sitokrom oksidaz, solunum zincirinin son enzimidir. Fizyolojik şartlarda bu reaksiyon sürekli olan normal bir reaksiyondur, bu şekilde yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanır ve bol miktarda enerji üretimi sağlanır. Fakat çoğu zaman O_2^\ominus radikal üretimi mitokondriyal sitokrom oksidaz enziminin kapasitesini aşar ve bu yüzden diğer antioksidan enzimler devreye girerek O_2^\ominus radikalinin zararlı etkilerine engel olurlar (57, 60, 75).

2.4.6. Katalaz

Katalaz, aerobik hücrelerin çoğunda bulunur. Anaerobik organizmalarda bulunmamaktadır. 60 kDa ağırlığında 4 aynı yapıda tetrahedral subunitler içeren hem enzimdir. 240 kDa molekül ağırlığında her molekülde 4 adet ferriprotoporfirin içerir. Görevi hidrojen peroksidi oksijene ve suya parçalamaktır. Peroksizomlarda lokalizedir (43, 56, 75).



Katalazın indirgeyici aktivitesi, hidrojen peroksit ve metil etil hidroperoksitler gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük molekülü lipid hidroperoksitlerini ise etkilemez (56, 67, 68, 75).

2.4.7. Non-enzimatik Antioksidan Moleküller

2.4.7.1. Vitamin E

Lipid peroksi radikalleri ve radikal türevlerini indirger. Vitamin E, peroksit radikallerinin düzeyini azaltarak radikal zincir reaksiyonunu sonlandırabilir. Hücre membran bütünlüğünü korur (44, 53, 56).

2.4.7.2. B karoten

Etkili bir tek değerli oksijen (O-) temizleyicisidir. Lipid peroksidasyonunu inhibe eder (69).

2.4.7.3. Askorbik Asit (Vitamin C)

Askorbik asit ve vitamin E sinerjistik etkilere sahiptir. Bu molekül, suda çözünen redüktan ve radikal temizleyici olarak etki gösterir. Askorbik asit veya vitamin C glikoz metabolizmasından gelen, suda çözünen vitaminler grubundandır. Prolin, lizin ve dopamin alfa hidroksilaz enzimlerinin kofaktörü olup, bu amino asitlerin hidroksilasyonunda ve kollojen fibrillerin sentezinde gereklidir. Askorbik asitin bir elektron oksidasyonu sonucu monodehidro askorbil radikali oluşurken, reaksiyona

girdiği radikali de etkisiz hale getirerek serbest radikallerin organizmaya verdiği zararı engeller. Askorbik asidin radikalik formu ise glutatyon sistemi tarafından askorbik aside yeniden dönüştürülür (44, 53, 56, 57, 59).

2.4.7.5. Ürik Asit

Plazmada 300 mcM gibi bir konsantrasyonda bulunur, hemoglobini ve eritrositleri peroksit reaksiyonundan korur (46, 70).

2.4.7.6. Serüloplazmin

Bazı araştırmacılar serumdaki antioksidan aktivitenin başlıca, Cu taşıyan protein olan seruloplazmine bağlı olduğunu ileri sürmektedir (46). Sisteine benzer mekanizmayla (Süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısı) etki göstermektedir (57).

2.4.7.7. Glutatyon

Selüler birçok olayda önemli rol oynayan bir tripeptiddir. Tüm memeli, hücrelerde en çok bulunan düşük moleköl ağırlıklı tiyoldür. Lipid peroksidasyonunun başlama fazını H_2O_2 i suya indirgeyerek engeller. E vitamini aracılığıyla membranlarda lipid peroksidasyonunu önler (53, 59, 60, 67).

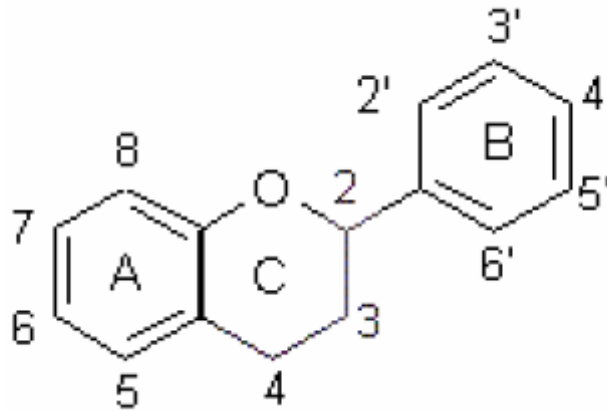
2.4.7.8. Melatonin

Melatoninin bir diğer önemli özelliği lipofilik olmasıdır. Böylece hücrenin bütün organellerine ve hücre çekirdeğine ulaşabildiği gibi kan-beyin engelini de kolayca geçer. Melatonin oksijen radikallerinden singlet oksijen, hidroksil radikali, peroksil radikali ve süperoksit anyonu üzerine etkilidir. Oksidatif hasardan nükleus DNA' sını, membran lipidlerini ve sitozolik proteinleri korur. Bununla beraber, NOS üzerine inhibitör etki yapar. Yaşlanmada melatoninin üretimi azalır. Bu durumun yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı hastalıkların patogeneğinde önemli olabileceği düşünölmektedir (56, 72, 73, 74).

2.4.7.9. Flavonoidler:

Yapıları ve Genel Özellikleri:

Flavonoidler yüksek organizasyonlu bitkilerdeki en karakteristik sınıfı oluştururlar. Flavonoidlerin çoğu angiosperm ailesinde çiçek pigmentleri gibi kolaylıkla tanınabilir. Halen bu olay sadece çiçeklerle sınırlı kalmayıp bitkilerin bütün parçalarını içerir. Flavonoidlerin kimyasal yapısı 2,3 ve 4 pozisyonundaki 2 aromatik halka taşıyan C 15 iskeletine dayanır (Şekil 3) (76).



Şekil 2: Flavonoidlerin kimyasal yapısı (76)

Flavonoidlerin birçok alt grubu yerine konan C halkasının çeşitlerine bağlı olarak sınıflandırılırlar (96). Heterosiklik halkanın hem oksidasyon durumu hem de B halkasının pozisyonu sınıflamada önemlidir. Flavonoidlerle ilk kez 1930'lu yıllarda ilgilenilmeye başlanmış, 1960'lı yıllarda ise gıda koruyucu olarak kullanılmışlardır. Flavonoidlerin en önemli etkilerinden birisi serbest radikalleri temizleme özellikleridir. Hemen her flavonoid grubunun en iyi tanımlanmış özelliği antioksidan kapasiteleridir (76, 77, 78).

Farklı sınıflardaki sekiz flavonoidin temel yapıları gösterilmiştir. Bu sınıfların her birinin yapı dışında da bazı farklılıkları vardır (96).

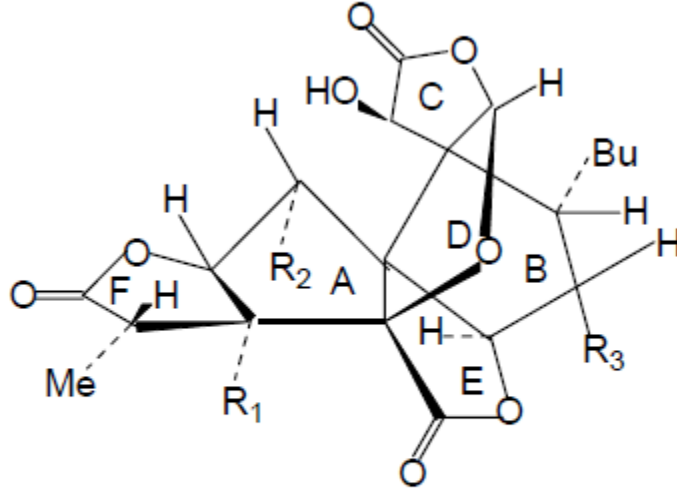
Flavonoidler moleküler yapılarına göre başlıca flavanlar, flavanonlar, flavonlar, flavonoller, antosiyoninler ve isoflavonoidler şeklinde sınıflandırılır (76, 78).

Tablo 3: Flavonoidlerin alt sınıfları ve besinsel kaynakları (76)

Flavonoid alt grupları	Flavonoidler	Temel besin kaynakları
Flavonoller	Kaempferol, myricetin, quercetin, rutin	Soğan, kiraz, elma, brokoli, lahana, domates, böğürtlen, çay, kırmızı şarap, karabuğday
Flavonlar	Apigenin, chrysin, luteolin	Kekik, maydonoz
İsoflavonlar	Daidzein, genistein, glycitein, formononetin	Soya fasulyesi, baklagiller
Flavonoller	Kateşin, gallokateşin	Çay, elma
Flavononlar	Eriodictyol, hesperitin, naringenin	Portakal, greyfurt
Flavanonoller	Taxifolin	Limon, narenciye

2.5. GİNKGO BİLOBA (EGb 761)

Basitçe ginkgo da denilen ginkgo biloba, ginkgo bitki ailesinin tek yaşayan üyesidir. Ginkgo ağacı; kuvvetliliği, hastalıklara karşı dirençliliği ve uzun yaşama özelliği ile karakterizedir. Antik bir çin ağacıdır. Avrupada 1960'lı yıllardan sonra, ilk olarakta 1965 yılında Almanyada tedavide kullanılmaya başlanmıştır. Sağlığa yararlı etkileri nedeniyle yetiştirilmiş ve korunmuştur (79). Çin tıbbında astım öksürük ve enüresis tedavisinde kullanılmaktadır (80). Oral alım sonucu gastrointestinal sistemden hızla emilmektedir. Ginkgolid A, ginkgolid B ve bilobalid komponentlerinin biyoyararlılığı oldukça iyidir. Ginkgolid A için % 100, Ginkgolid B için %93 ve bilobalid için % 72 biyoyararlanım mevcuttur. Maksimum plazma konsantrasyonu ginkgolid A için 15 ng/ml, ginkgolid B için 4 ng/ml ve bilobalid için ise 12 ng/ml'dir. Yarılanma ömrü ise 3,2-7saat arasında değişmektedir (79, 81).



Şekil 3: Ginkgolid

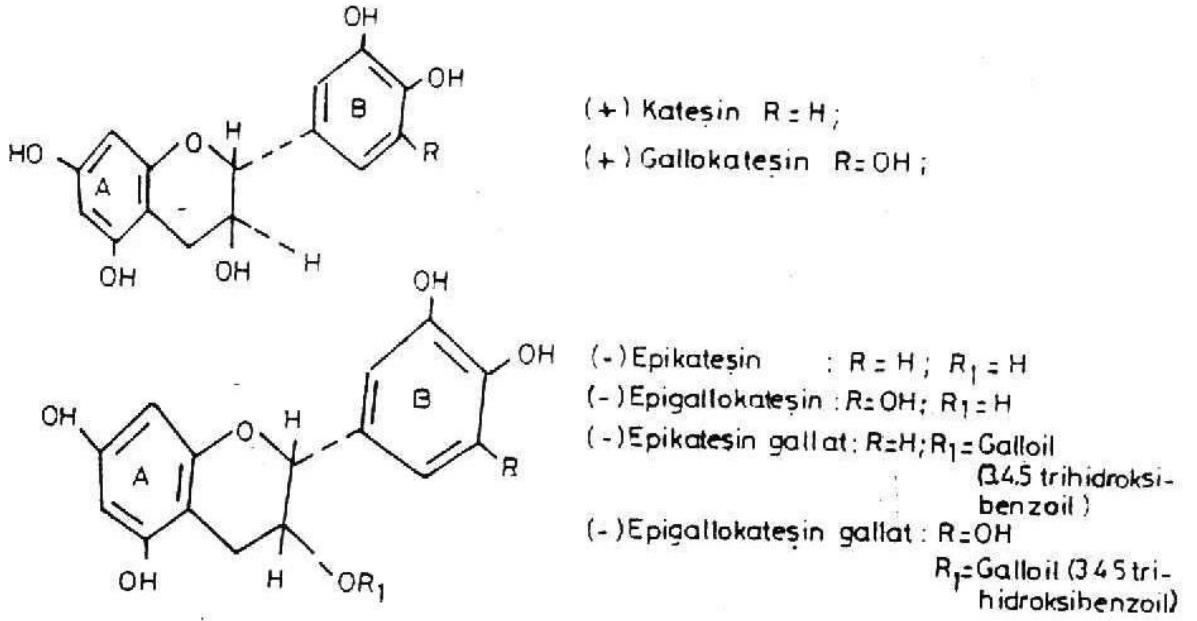
Ginkgo biloba ekstresinde standart olarak %24 flavanoid glikozidler, %6 terpenoid laktonlar bulunur. Flavonoidler esas olarak Quersetin, kamferol, isorhamnenitin glikozdur. Terpenoid fraksiyonu ise diterpenler (Ginkgolid A,B,C,J ve M) ve bilobalidden oluşur. Antioksidan etkiden terpenoid türevlerinin, doku fonksiyon kaybı, hasar oluşumu gibi patolojik durumlarda rejenerasyon yeteneği kazanmasından ise flavonoid fraksiyonların sorumlu olduğu düşünülmektedir (81, 82, 83). Bilobalid türevlerinin ise Ginkgo biloba bitkisini daha çok böcek ya da zararlı mikroorganizmalara karşı korunmak amacıyla bitki gövdesinde üretildiği kabul edilmektedir. Bilobalidlerin Ginkgolid'lerin degradasyon ürünü olabileceği düşünülmektedir (2, 3, 14, 15, 16 karbonların uzaklaşması) (82). EGb 761 in pek çok biyokimyasal ve farmakolojik aktiviteleri bulunmaktadır. *Ginkgo*' nun biyolojik aktivitesi için polivalent etki deyimi kullanılmaktadır. Çok sayıda aktif maddenin meydana getirdiği ortak etki anlamındadır. Oksidan maddeler hücrede sürekli oluşmakta olup DNA, protein ve lipidler üzerinde hasara neden olmaktadır. Terpenoidlerin antioksidan özelliklerinin serebral ve lipid metabolizması, farklı nörotransmitter maddeler üzerine etkileri daha önceden belirtilmiştir. Peroksit radikal çöpçüsüdür. İskemi reperpüzyon sonucu oluşan süperoksit anyonlarını temizlemektedir. SOD Enzim aktivitesine sahip olduğu daha önce yapılan çalışmalarda belirtilmiştir. Nitrik oksit oluşmasını inhibe edici özelliği vardır (83, 84). Özellikle beyin dokusunda hipoksiye tolerans oluşmasında yardımcıdır. Bu etkiyi ise Fosfodiesteraz ve Na-K-ATPazlar

üzerinden yaptığı düşünülmektedir. Kan akışkanlığını artırır. Eritrosit hiperagregasyonu ve deformatsiyonu üzerindeki etkileri kan viskozitesini azaltır. Periferde ve merkezde kan damarlarının, kapiller duvarların elastisite ve dayanıklılığını artırır. Kan- beyin bariyerinde Glikoz alımını artırır (84, 85). Platelet aktive edici faktörü (PAF) antagonize eder. PAF'a bağlı platelet agregasyonunu önler ve lizozomal zarları stabilize eder. Bu ekstre serebrovasküler ve periferel vasküler yetmezlikleri de içeren pek çok iskemik olayda terapötik amaçlı kullanılmaktadır. Antiapoptotik etkilidir. Apoptotik kaspaz şelalesinin oluşumundaki mitokondri üzerinden sitokrom c'nin salınımını azaltmaktadır. Antiapoptotik bcl-2 benzeri protein transkripsiyonunu arttırmakta ve ER'da bulunan öncül apoptotik stres proteini olan kaspaz-12 nin transkripsiyonunu ise azaltmaktadır (88). Nöronal plastisiteyi artırır. Hafıza, dil, oryantasyon ve öğrenme kapasitesinde gelişmeye neden olur. Yaşlılığa bağlı hafıza kaybı, Alzheimer, algılama kayıplarında, bunama, performans bozuklukları, kulak çınlaması ve baş dönmesi gibi hastalıkta tedavi edici olabileceği belirtilmiştir (84, 85, 86, 87,)

2.6. EPIGALLOKATEŞİN-3-GALLAT (EGCG)

Epigallokateşin-3-gallat (EGCG), daha çok kateşin olarak bilinir ve yeşil çay içinde major bileşik olarak bulunur (95).

Kimyasal olarak fenol gruplar içerdiği için polifenoller arasında sıralanmıştır (90). Hidroksil gruplar içerdiği için suda çözünebilmektedir. Avrupada yapılan ilk çalışmalarda epigallokateşinden oluşan ekstrenin antioksidan etkisini tesbit etmek için yüksek sıcaklıktaki (60°C) domuz yağı içerisinde çözülmeye bırakılmış fakat lipid içerikte yeterince iyi çözünmediği tesbit edilmiştir. Epigallokateşin yeşil çayın etken maddesi olduğu gibi birçok bitkinin kabuk, gövde ve yapraklarında farklı oranlarda miktar ve türüne rastlanmıştır. *Quercus sp.* *Vitis vinifera* gibi bitkiler bunlara küçük örneklerdir (90, 91, 95, 100).



Şekil 4: Katesin

Kateşinlerin antioksidan aktiviteye sahip oldukları daha önce yapılan çalışmalarda belirtilmektedir (90, 92, 93, 96, 97). Epidemiyolojik çalışmalarda çay tüketiminin kalp krizi, koroner kalp hastalıkları, bazı kanserler ve karaciğer rahatsızlıkları riskini azalttığı gösterilmiştir (96, 97). Çaylarda bulunan polifenollerin kolorektal kanser mutagenesi yapabileceği bilinen heterosiklik aromatik aminlere karşı korucuyu özellikleri bilinmektedir. Gerek yeşil çay, gerekse siyah çaydaki kateşinlerin ve theaflavinlerin normal hücre büyümesini engellemeden kanser hücrelerinin çoğalmasını engellediği gösterilmiştir (97).

Kuzey Avrupa, Doğu Avrupa ve Asya'nın büyük kısmında en sık rastlanan kanser türü, fazla miktarda tuz ve tuzlu ürün kullanıma bağlı olarak görünen mide kanseridir (97, 99). *Helicobakter pylori* adlı etken bakteri mide mukozasında hücre döngüsünü artırır ve mukozada mide kanseri riskini artırıcı hasara neden olur. Çay ve çay polifenollerinin bakteri öldürücü ve bakterinin büyümesini engelleyici özellikleri vardır. İn vitro çalışmalar özellikle yeşil çayın insanda mide kanseri hücrelerine karşı koruyucu etkisini tanımlamıştır (89, 95). Çayda bulunan kafein ve kateşinlerin vücut ağırlığı ve enerji harcaması üzerine etkileri bilinmektedir. Kafeinin insanlarda termogenezi uyardığı ve yağ oksidasyonu yaptığı gösterilmiştir (96). Yeşil çayın içeriğindeki kafein miktarından daha fazla termogenezi uyarması, içeriğindeki diğer biyolojik aktif maddelerin varlığını akla getirmektedir. 2000 yılında Dulloo ve

arkadaşları in vitro olarak, kateşinlerin kahverengi yağ dokusunun solunum hızını arttırdığını, bunun da termogenezi uyardığını göstermiştir (99). Yeşil çaydaki kateşinlerin termogenezi ve yağ oksidasyonunu arttırmasının, noradrenalinini azaltan kateşol o- metil transferaz enziminin inhibe olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (98, 101). Yeşil çayın anti-obezite etkisini araştıran bir fare çalışmasında kolesterol ve trigliserit düzeyleri de düşük bulunmuştur. Obezite üzerindeki doğrudan etkisini görebileceğimiz kadar iyi bir gösterge olan leptin düzeyinin ise azaldığı tesbit edilmiştir. Kilo kaybı üzerinde de etkilerinin olduğu sıçanlar üzerinde yapılan araştırmalarda elde edilen bulgular arasında belirtilmektedir (92).

Oksidatif DNA hasarında epigallokateşinin koruyucu etkilerinin olduğu birçok çalışmada yine belirtilmektedir (103). Doz bağımlı epigallokateşin verilerek yapılan iskemi reperfüzyon sonucu serbest radikal salınımı ve hücre hasarı, apoptozis oluşumu çalışmasında kateşinin koruyucu etkisi olduğu belirtilmiştir (92).

3. MATERYAL METOD

3.1. DENEY HAYVANLARI

Bu çalışma Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı tarafından Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışma için Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulundan 2009/4-2 Sayılı ve 07.04.2009 tarihinde izin alındı (Ekler 1). Deneylede kullanılan sıçanlar Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Laboratuvarı hayvan barınağından temin edildi. Çalışmada kullanılan tüm sıçanlar $20-22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ oda sıcaklığında ve %50-60 nem ortamında saklandı. Hayvanlar standart pelet sıçan yemi ve su ile beslendiler. Deneysel hayvanlarının ağırlıkları 220-250 gram arasındadır; deneylede toplam olarak 48 adet erkek Wistar albino cinsi sıçan kullanıldı.

3.2. SİYATİK SİNİR HASAR MODELİ

Sıçan siyatik sinirinde ezilme tipi yaralama öncesinde, Ginkgo bilobanın (EGb 761 Tebokan forte), Epigallokateşin-3-gallatin (EGCG, sigma, katalog no:E4268) ayrı ayrı ve kombine tedavilerinin, Periferik Sinir rejenerasyonuna etkilerinin incelenmesi amacıyla Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Laboratuvarından, 220-250 gr ağırlığında 48 adet yetişkin erkek Wistar albino cinsi sıçan temin edildi. Denekler; Kontrol grubu (grup 1), Sham grubu (grup 2), deneysel grubu I (grup 3), EGb 761 verilen grup (grup 4), EGCG verilen grup (grup 5) ve EGb 761+EGCG kombine grup (grup 6) olmak üzere 6 gruba ayrıldı. Grup 4 deneysel hayvanları her bir hayvan için 40 mg/kg/gün olacak şekilde EGb 761 içme sularına ilave edilerek 7 gün beslenmiştir. Grup 5 ise 7 gün boyunca hergün İntraperitoneal (İP) olarak 10 mg/kg/gün olacak şekilde EGCG enjeksiyonu yapılmıştır. Grup 6 ise yine bir hafta boyunca hem EGb 761 40 mg/kg/gün içme sularına katılmış hemde İP olarak EGCG enjeksiyonu yapılmış olan gruptur.



Şekil 5: Siyatik sinirin klemlenmesi



Şekil 6: Sinir hasarının oluşması

3.3. DENEY GRUPLARI

Deney grupları her grupta 8 adet olacak şekilde 6 gruba ayrılan toplam 48 adet rastgele seçilmiş Wistar albino cinsi sıçanlardan oluşturuldu.

Grup 1 (Kontrol grubu): Hiçbir cerrahi işlem yapılmayan ve bir hafta sonunda hayvan anestezi altına alınarak sadece siyatik sinir ve kas doku örnekleri alınan gruptur.

Grup 2 (Sham grubu): Bir hafta boyunca intraperitoneal Serum fizyolojik enjekte edilen, siyatik sinirin olduğu bölge aç kapa yapılarak ve deney sonunda yine sadece siyatik sinir ve kas doku örnekleri alınan gruptur.

Grup 3 (Deney grubu I): Bir hafta boyunca intraperitoneal Serum fizyolojik enjekte edilen ve deney sonunda ezilme tipi sinir hasarı oluşturularak siyatik sinir ve kas doku örnekleri alınan gruptur.

Grup 4 (EGb 761): Bir hafta boyunca yalnızca EGb 761 içme sularına ilave edilerek beslenen ve deney sonunda ezilme tipi sinir hasarı oluşturularak siyatik sinir ve kas doku örnekleri alınan gruptur.

Grup 5 (EGCG): Bir hafta boyunca intraperitoneal EGCG enjekte edilen ve deney sonunda ezilme tipi sinir hasarı oluşturularak siyatik sinir ve kas doku örnekleri alınan gruptur.

Grup 6 (EGb 761+EGCG): Bir hafta boyunca intraperitoneal EGCG enjekte edilen ayrıca içme sularına EGb 761 ilave edilerekte beslenen, deney sonunda ise ezilme tipi sinir hasarı oluşturularak siyatik sinir ve kas doku örnekleri alınan kombine gruptur.

3.4. KULLANILAN İLAÇLAR

Çalışmada kullanılan ilaçlar şunlardır: Ginkgo biloba EGb 761(Tebokan forte, Eczacıbaşı İlaç Sanayi ve Ticaret AŞ, Küçükkarıştıran/Lüleburgaz), Epigallocateşin-3gallat EGCG (Sigma, E4268 İnterlab. Adana), Ketamin (KETALAR flakon, Eczacıbaşı İlaç Sanayi ve Ticaret AŞ, Küçükkarıştıran/Lüleburgaz)

3.5. BİYOPSİ ÖRNEKLERİNİN ALINMASI

Tespit edilecek operasyon sahası; Povidone İodine serub (MEDICA brush; %4 chlohexidine scrub, MEDICA BV, Hollanda) ile 10 dakika fırçalandı ve %10 povidone iodine solusyonu (POVİOD; Saba Türkiye) ile dezenfekte edildi. Sıçanlara operasyondan 30 dakika önce, profilaktik antibiyotik olarak tek doz 50 mg/kg seftriakson intraperitoneal olarak verildi. Anestezi için ise intraperitoneyal (İP) olarak 60 mg/kg ketamin (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) verilerek anestezi sağlandı. Sağ siyatik sinir cerrahi olarak eksplore edildikten sonra kanamalar bipolar koter yardımıyla kontrol altına alınarak iyi bir hemostaz sağlandı. Yaşargil anevrizma klempini kullanılarak sağ siyatik sinirde basıya bağlı ezilme tipi hasar oluşturuldu. Siyatik sinir ve kas dokusu izole edildi. Histopatolojik ve Biyokimyasal incelemeler için eşit iki parçaya ayrılarak saklandı.

Histopatolojik değerlendirme Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim dalında, diğer biyokimyasal değerlendirmeler Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim dalında yapıldı.

Doku örnekleri, biyokimyasal değerlendirme yapılarına kadar serum fizyolojik içeren ependorflar içinde -20 °C de çalışma zamanına kadar bekletildi ve işleme başlamadan hemen önce +4 °C de erimeye bırakıldı. Eriyen doku örnekleri teker teker soğuklukları muhafaza edilerek tartıldı ve cam tüplere konuldu. Dokulara 1 gr doku 3 hacim (hacim/ağırlık) soğuk %1.15 M KCl eklendi. Dokular 16.000 devir/dakika hızda 3 dakika süreyle homojenize edildi. Enzim aktivite kaybı olmaması için örnekler buz dolu küvete yerleştirildi. Daha sonra homojenatlar 14.000 x rpm'de +4 °C 45 dakika soğuk santrifüj edilerek süpernatant ependorf tüplere ayrıldı. Bu ayrılan süpernatantlardan MDA ve protein, NO düzeyleri ile SOD enzim aktivite ölçümleri yapıldı.

3.6. SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD) AKTİVİTE TAYİNİ

Süperoksit dismutaz, oksidatif enerji üretimi sırasında oluşan toksik süperoksit radikallerinin H₂O₂ ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandırır. Bu yöntem, ksantin ve XO kullanılarak oluşturulan süperoksit radikallerinin, 2-[4-iyodofenil]-3-[4-nitrofenol]-5- feniltetrazolium klorid (p-iyodonitrotetrazolium viyole: INT) ile meydana getirdiği kırmızı renkli formazan boyasının 505 nm dalga boyunda verdiği 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 SOD aktivitesi ölçülür.

3.6.1. Ayıraçlar

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

50.00 mM CAPS

0.94 mM EDTA

Doymuş NaOH

2. Substrat karışımı

0.05 mM Ksantin

0.025 mM INT

3. 80 Ü/L Ksantin oksidaz

4. 0.01 M Fosfat tamponu (pH 7.0)

K₂P₀₄

NaH₂P₀₄

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

3.6.2. Standart Eğrinin Çizimi

Liyofilize olarak hazırlanmış SOD standardı 10 ml bidistile su ile sulandırılır.

Standart eğri çiziminde kullanılacak olan diğer SOD derişimleri fosfat tamponuyla Tablo 4'teki gibi hazırlanır. 2-8 °C'de saklandığında 2 hafta süreyle dayanıklıdır.

Tablo 4: SOD standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı

Kullanılacak Standartlar	Standart Solüsyonun Hacmi	0.01 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	6 ml	0.23

Süperoksit dismutaz aktivite tayini için, Siyatik sinir ve inerve ettiği kas dokularından hazırlanan süpernatant %30 ile %60 arasında % inhibisyon aralığı olacak şekilde 0.01 M fosfat tamponu ile 1: 65 oranında sulandırılır ve aktivite tayini yapılır.

Tablo 5: SOD standart eğri çizimi için kuvars küvetlerin hazırlanışı

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

Tekrar karıştırıldıktan 30 saniye sonra çalışma körünün ve standardın 37°C'de, 505 nm dalga boyunda havaya karşı başlangıç absorbanları (A₁) okunur. Aynı anda kronometre çalıştırılarak 3 dakika sonra son absorbanları (A₂) tekrar okunur.

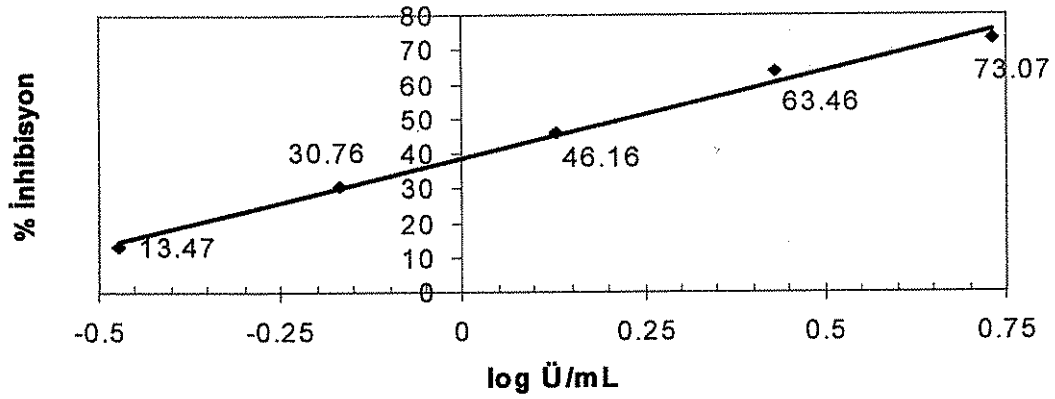
3.6.3. Hesaplama

Çalışma körü SOD içermediği için inhibisyona uğramamış reaksiyon olarak

kabul edilir ve değeri %100 olarak alınır. Tüm standartlar için % inhibisyon değeri bunlara ait çalışma körüyle oranlanarak 100'den çıkarılması sonucu hesaplanır.

AA/dak. standart = $A_2 - A_1$ / 3 dakika % inhibisyon standart = 100 - AA/dak standart x 100 A çalışma körü

Hesaplama yapıldıktan sonra x yatay eksenine SOD derişimlerinin (Ü/ml) logaritmik dönüşüm değerleri, Y (dikey) eksenine standartlara ait % inhisyon değeri yazdırılarak standart eğri elde edilir (Şekil 7).



Şekil 7: SOD standart eğrisi çalışması

Tablo 6: Dokuda SOD aktivite tayini için kuvars küvetlerin hazırlanışı

	Kör (µl)	Numune (µl)
Doku örnek	-	25
0.01 M Fosfat Tamponu	25	-
Substrat Karışımı	850	850
Küvetler iyice karıştırılır		
Ksantin oksidaz	125	125

Tekrar karıştırıldıktan 30 saniye sonra 37°C'de, 505 nm dalga boyunda havaya karşı başlangıç absorbans (A_1) okunur. 3 dakika sonra absorbans (A_2) tekrar okunur. Hesaplama:

AA/dak örnek = $A_2 - A_1$ / 3 dakika % inhibisyon örnek = 100 - AA/dak örnek / 100 A çalışma körü

Örneğe ait hesaplanan yüzde inhibisyon değerine karşılık gelen SOD değeri standart eğri kullanarak bulunur. Ü/ml biriminden ölçülen SOD spesifik aktivitesi Ü/mg protein birimlerinden verilmiştir.

SOD Spesifik Aktivitesi (Ü/mg protein) - SOD Değeri (Ü/ml) Protein (mg/ml)

3.7. MALONDİALDEHİT DÜZEYİNİN TAYİNİ

Aerobik şartlarda pH 3.4'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 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

3. TBA % 0,8'lik

Tiyobarbitürik asit

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

5. Stok Standart

1.1.3.3 tetramethoksiopropan (yoğunluk= 0.99 g/ml)

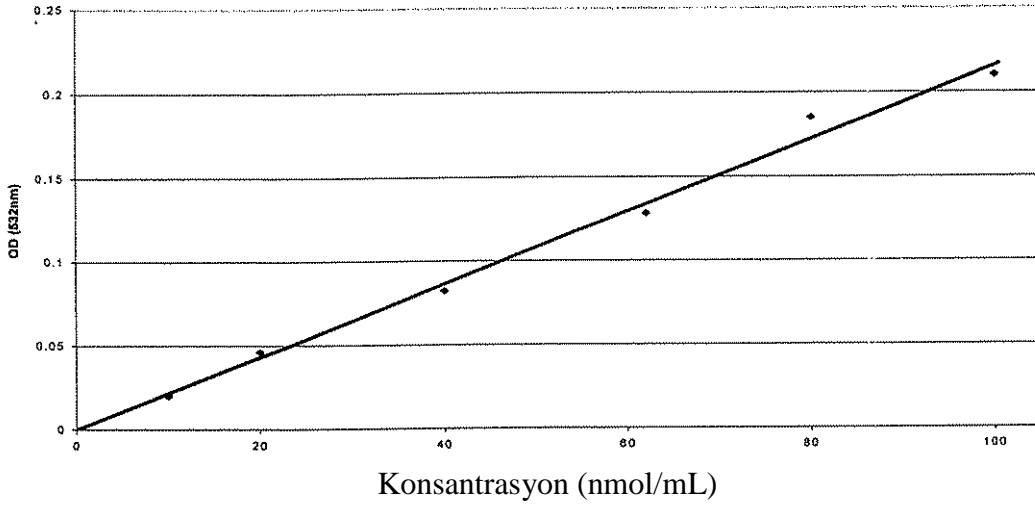
3.7.2. Standart Eğri Çizimi

Stok standarttan 6,6 µl alınıp 100 ml'ye saf su ile tamamlanarak günlük standart hazırlanır. 10, 20, 40, 60, 80 ve 100 nmol/ml konsantrasyonunda çalışma standartları hazırlanır. Ayıraçlar tüplere aşağıda belirtildiği şekilde ilave edilir.

Tablo 7: MDA standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı

Tüp No.	0 0	1	2 80	3 60	4	5 20	6 10
Konsantrasyon(nmol/ml)		100			40		
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
90 °C'de 45 dk. inkübe edilir.			Ve soğutulur.				
Saf su (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
N-Butanol/Piridin (ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0

Tüpler N-Butanol/Piridin ilavesinden sonra iyice karıştırılır. Daha sonra 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir, üsteki organik kısım alınıp 532 nm'de absorbans okunur. Standart eğri grafiği çizilir (Şekil 8).



Şekil 8: Malondialdehit standart eğrisi çalışması

Örnek çalışması için yukarıda bahsedildiği gibi hazırlanan belirli hacimde doku örneği alınır ve MDA tayini yapılır (Tablo 8).

Tablo 8: Dokuda MDA düzeyinin tayini için tüplerin hazırlanışı

	Kör (ml)	Std (ml)	Örnek (ml)
Std (60 nmol/ml)	-	0.1	-
Örnek	-	-	0.1
SDS	0.2	0.2	0.2
Asetik Asit	1.5	1.5	1,5
TBA	1.5	1.5	1.5
Saf su	0.8	0.7	0.7
90 °C'de 45 dk. inkübe edilir		Ve soğutulur.	
Saf su	1.0	1.0	1.0
N-Butanol/Piridin	5.0	5.0	5.0

Daha sonra 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir, üstteki organik kısım alınarak 532 nm'de absorbans okunur. Sonuç standart eğrisinden değerlendirilir.

3.7.3. Hesaplama

nmol/ml olarak ölçülen MDA düzeyi nmol/mgprotein olarak verilmiştir.

$$\text{MDA Düzeyi (nmol/mg protein)} = \text{MDA Değeri (nmol/ml)} / \text{Protein (mg/ml)}$$

3.8. PROTEİN DÜZEYİNİN TAYİNİ

Bu metot proteinlerin içerdiği tirozin ve triptofan rezidülerinin fosfotungustik-fosfomolibdik asit ile verdiği renk reaksiyonunun 750 nm'deki absorbans ölçümüne dayanır.

3.8.1. Ayıraçlar

1.A Çözeltisi:

% 2 Na₂C₀₃

2.B1 Çözeltisi:

% 1 CuS_{04.5H20}

B2 Çözeltisi

% 2 Na-K tartarat

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

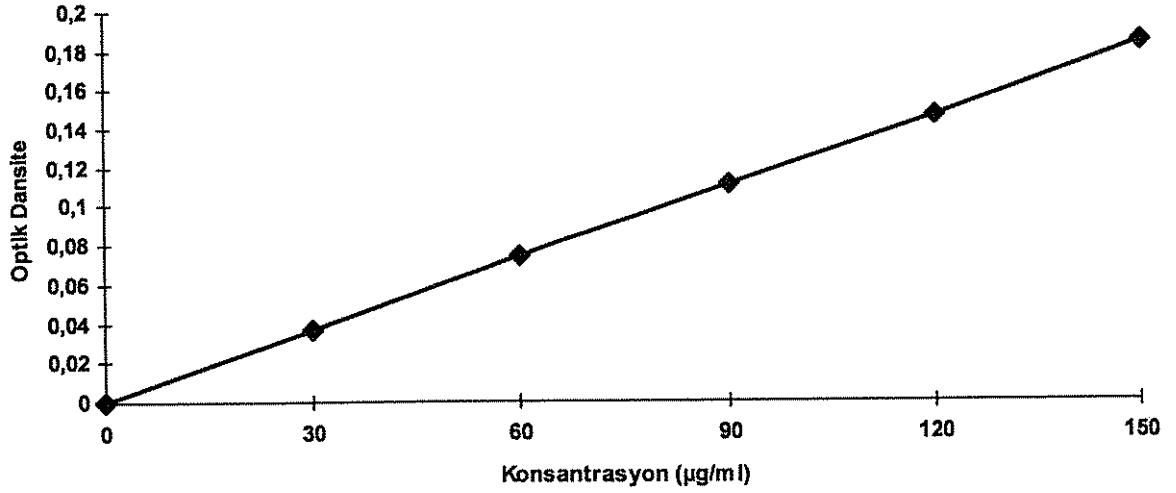
3.8.2. Standart Eğri Çizimi

Stok standart için 0.3 g/dl bovin albumin hazırlanır. Hazırlanan stok standarttan 5 ml alınıp 100 ml'ye serum fizyolojik ile tamalandığında 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 (Şekil 9).

Tablo 9: Protein standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı

Tüp no	Kör 0	1	2	3	4	5
Konsantrasyon (µg/ml)		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 9: Protein standart eğrisi çalışması

Siyatik sinir ve inerve ettiği kas dokularından hazırlanan süpernatantta protein tayini için, süpernatant 1: 50 oranında serum fizyolojik ile sulandırılır ve protein tayini yapılır. Bunun için üç tüp alınır ve çözeltiler aşağıdaki şekilde konulur.

Tablo 10: 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
Oda ısısında 15 dakika bekletilir			
D çözeltisi	0.3	0.3	0.3

Oda ısısında 30 dakika bekletilir, absorbans 750 nm'de okunur. Hesaplama örneğin absorbansı standartm absorbansı ile karşılaştırılarak veya doğrudan standart eğriden değerlendirilir ve dilüsyon katsayısı ile çarpılarak sonuç verilir.

3.9. NO TAYİNİ

Dokuda nitrit ve nitrat miktarı deproteinizasyondan sonra Griess reaksiyonu ile belirlenir. Total nitrit (nitrit + nitrat) konsantrasyonu modifiye kadmiyum redüksiyon metodu ile değerlendirilir. pH 9.7 glisin tamponunda bakır (Cu) kaplı kadmiyum granülleri deproteinize numune süpernatantı ile 90 dakikalık inkübasyon sonunda nitrat redüksiyonu sağlanır. Üretilen nitrit; sülfanilamid ve buna bağlı N-naphthylethylene diamin (NNDA) diazotizasyonu ile reaksiyon sonucu oluşan pembe rengin 545 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunması ile belirlenir. Sonuçta elde edilen nitrit konsantrasyonu ilk konsantrasyondan çıkarılarak nitrat miktarı belirlenir.

Kullanılan reaktifler:

Kadmiyum granülleri (Cd)

pH 9.7 Glisin-NaOH tamponu

Sülfanilamid

N-Naphthylethylene diamine (NNDA)

5 mmol/L CuSO₄

0.1 mol/L H₂SO₄

Standart solüsyonu (0.1 mol/L NaNO₂)

10 mmol/L Na₂B₄O₇

75 mmol/L ZnSO₄

55 mmol/L NaOH

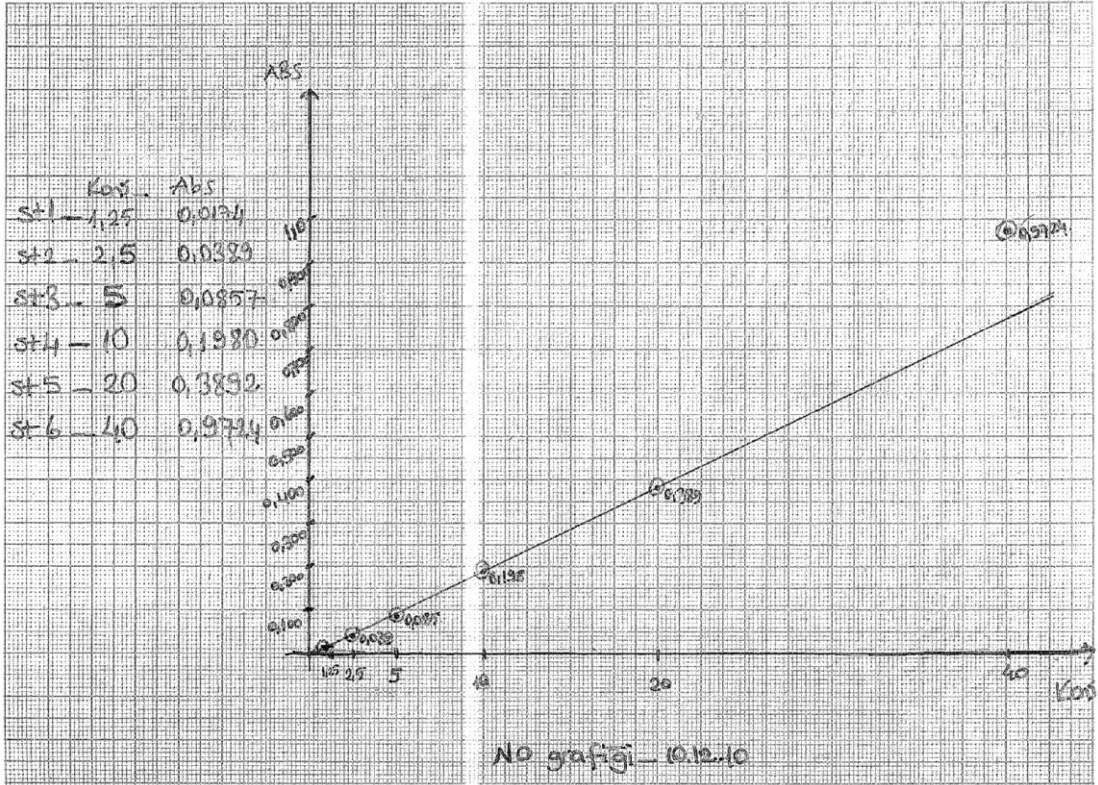
Tablo 11: Doku örneğinde NO tayini için tüplerin hazırlanışı

	Kör (ml)	Örnek (ml)
Örnek	-	500 µl
ZnSO ₄ ,	2ml	2 ml
İyice Karıştırılır		
NaOH	1.250 ml	1.250 ml
Karıştırılır. 3500xg'de 10 dakika santrifüj edilir. Süpernatant numune olarak kullanılır.		
Deiyonize su	2 ml	2 ml

Kadmiyumlar 2.5-3 gr olarak 20 cc kapaklı plastik tüplere dağıtılır. Granüller deiyonize su ile yıkanır. 1-2 dakika CuSO_4 solüsyonu içinde bekletilir ve solüsyon dökülür. Granüller glisin tamponu ile yıkanarak deneyde kullanılır. 90 dakika oda ısısında inkübe edilir.

Deiyonize su	3 ml	2.5 ml
sülfanilamid,	1 ml	1 ml
NNDA	1 ml	1 ml
1 saat oda ısısında inkübe edilir.		

Organik kısım alınıp, 545 nm'de köre karşı okunur.



Şekil 10: NO standart eğrisi çalışması

Hesaplama:

$\mu\text{mol/mg}$ olarak ölçülen NO düzeyi $\mu\text{mol/mg}$ protein olarak verilmiştir.

NO Düzeyi ($\mu\text{mol/mg}$ protein) = NO Değeri ($\mu\text{mol/mg}$) / Protein (mg/ml)

3.10. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME

Siyatik sinir ve İnerve ettiği kas dokularından alınan örneklerinin histopatolojik incelenmesi için, doku kesitleri % 10'luk formaldehit içinde fikse edildi. Rutin işlemlerin sonrasında doku kesitleri Haris hematoksilen-eosin boyası ile boyanarak ışık mikroskopunda (X100) değerlendirildi.

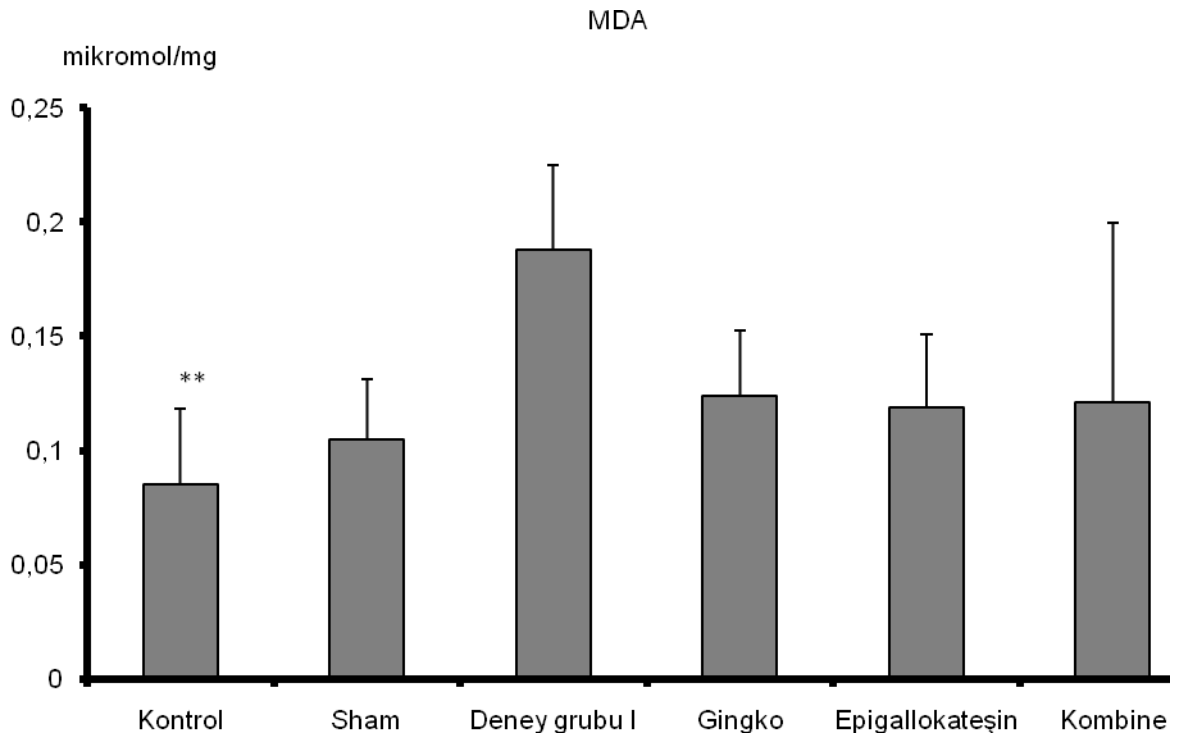
3.11. İSTATİSTİK

İstatistiksel analizin yapılmasında bilgisayar programı olarak (SPSS Inc., Chicago, IL; USA) kullanıldı. Sayısal değişkenler ortalama \pm standart sapma şeklinde sunuldu. Biyokimyasal verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi sırasında gruplar arasındaki farkların incelenmesinde 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. MDA DEĞERLERİ ÜZERİNE ETKİLER

Siyatik sinir ve inerve ettiği kas dokusunda tespit edilen MDA düzeyleri incelendiğinde 0,075 nmol/mg protein ile 0,336 nmol/mgprotein arasında değişen değerler elde edilmiştir. Ortalama MDA değerleri hesaplandığında en düşük MDA değerinin Kontrol grubunda (0,097±0,05nmol/mg protein) olduğu en yüksek değer ise Deney grubu I'de (0.189 nmol/mg protein) olduğu görülmektedir.



Şekil 11: MDA Düzeyleri

** Deney grubu I'e nispeten anlamlı derecede düşük ($p<0.05$)

Gruplar arasında MDA düzeyleri kıyaslandığında;

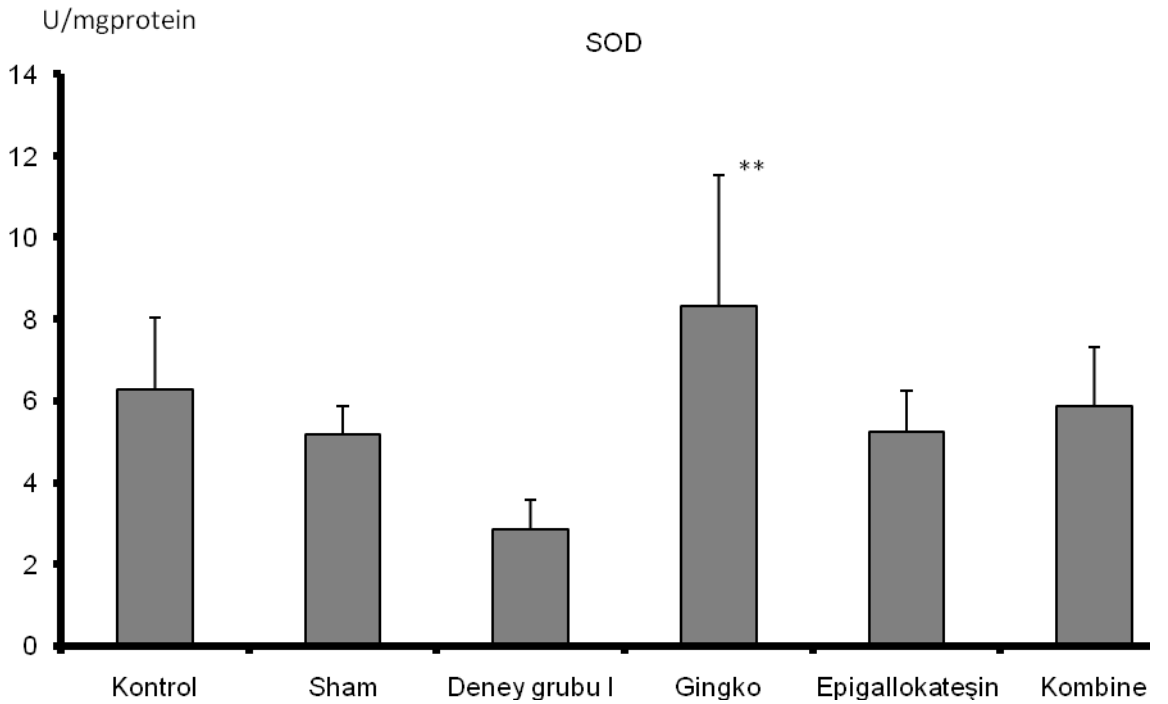
1-Deney grubu I, MDA seviyesi anlamlı olarak en yüksek tesbit edildi ($p<0.05$).

2-İlaç uygulanan tüm gruplarda tesbit edilen MDA değerleri istatistiksel olarak anlamlı ve düşük tespit edilmiştir ($p<0.05$).

3-İlaç uygulanan gruplar arasındaki MDA değerlerindeki farklar ise istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($p>0.05$).

4.2. SOD AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLER

Siyatik sinir ve inerve ettiği kas dokusunda tespit edilen SOD aktivitesi incelendiğinde 2,19 U/mg protein ile 10,67 U/mg protein arasında değişen değerler elde edilmiştir. Ortalama SOD değerleri hesaplandığında en düşük SOD değerinin kontrol grubunda (2,850 U/mg protein) olduğu en yüksek değer ise EGb761 grubunda (8,309 U/mg protein) olduğu saptanmıştır.



Şekil 12: Gruplarda SOD aktivitesi

**Deney grubu I, kontrol grubu ve sham grubuna göre anlamlı derecede yüksek ($p < 0.05$).

1-Deney grubu I, SOD seviyesi Kontrol grubuna göre daha düşüktür, istatistik olarak bu fark anlamlı kabul edilmiştir ($p < 0.05$).

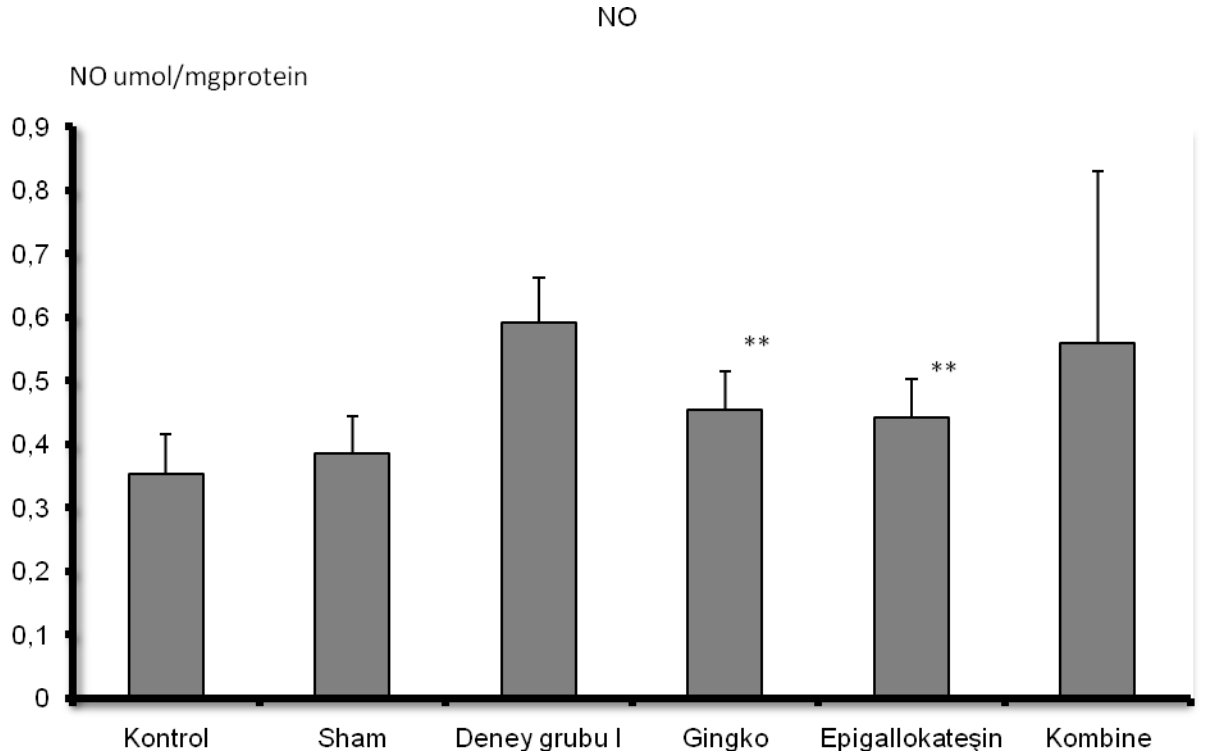
2-EGb 761 uygulanan grupta tespit edilen SOD değerleri anlamlı olarak yüksek kabul edilmiştir ($p < 0.05$).

3-EGb 761 ilaç grubu ile diğer ilaç grupları arasında fark anlamlı olarak kabul edildi ($p>0.05$).

4- EGb 761 ilaç grubu ile kombine grup arasındaki fark anlamlı bulunamıştır ($p>0.05$).

4.3. NO DEĞERLERİ ÜZERİNE ETKİLER

Siyatik sinir ve kas dokusunda tespit edilen NO düzeyleri incelendiğinde 0,36 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein - 1,31 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein arasında değişen değerler elde edilmiştir. Ortalama NO değerleri hesaplandığında en düşük değerinin EGCG grubunda (0,4420 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein) olduğu en yüksek değer ise Deney grubu I'de (0,5913 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein) olduğu saptanmıştır (Tablo 12, Şekil 17).



**Deney grubu I'e göre fark anlamlı derecede düşük ($p<0.05$).

Şekil 13: Gruplarda NO değerleri

1-NO düzeyi EGb 761 grubu ve EGCG grubunda anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0.05$).

2-Deney grubu I ile kombine grup arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

3-Deney grubu I ve Kontrol grubu arasında fark olmasına rağmen istatistik olarak bu fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

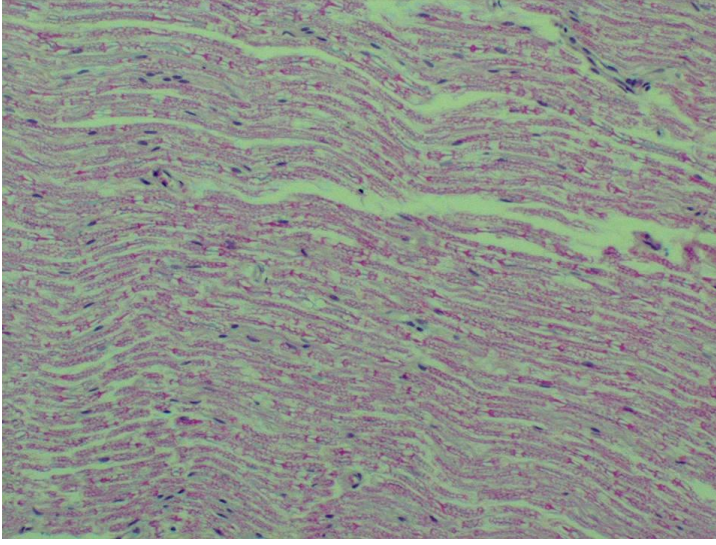
Tablo 12: Gruplardaki ortalama değerler

Gruplar	MDA (umol/mg)	SOD (U/mgprotein)	NO (umol/mg)
Kontrol	0,097+-0,05	6,2625+-0,01	0,3625+-0,01
Sham	0,106+-0,05	5,8625+-0,01	0,4025+-0,01
Deney Grubu I	0,189+-0,03	2,850+-0,02	0,5913+-0,04
EGb761	0,1240+-0,01	8,309+-0,06	0,4550+-0,02
EGCG	0,1190+-0,03	4,2450+-0,02	0,4420+-0,01
Kombine	0,1210+-0,01	5,8690+-0,01	0,5590+-0,03

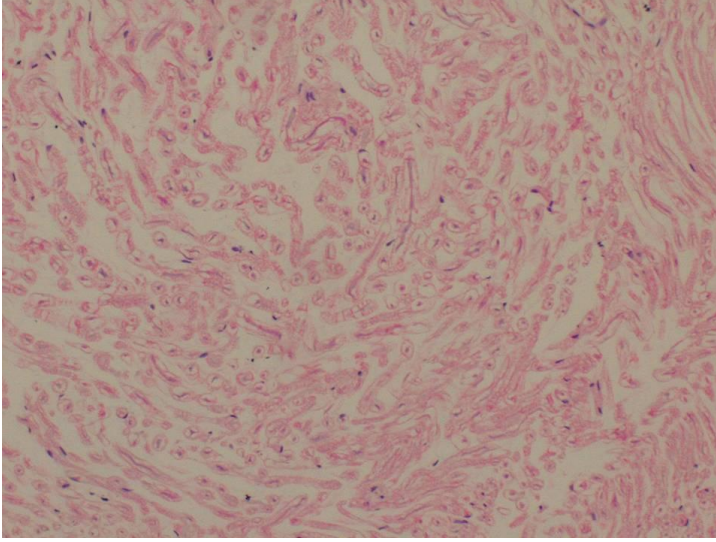
Tabloda ilaç verilen grupların ve Kontrol, Sham, Deney grubu I gruplarının MDA ve NO düzeylerinin ortalama değerleri ile SOD enzim aktivitesinin gruplardaki ortalama değerleri görülmektedir. Biyokimyasal verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi sırasında gruplar arasındaki farkların incelenmesinde Kruskal-Wallis testi, ikili karşılaştırmaların değerlendirilmesinde ise Mann-Whitney U testi kullanıldı, $p<0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.4. HİSTOPATOLOJİK ANALİZ SONUÇLARI

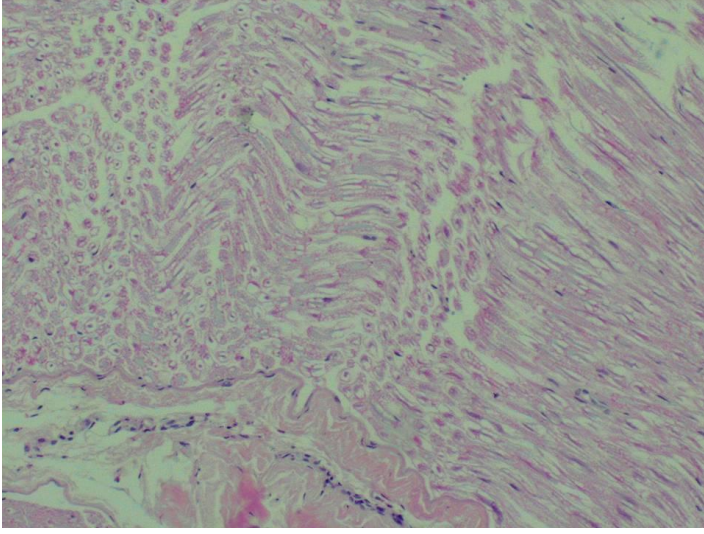
Grupların histopatolojik analizlerinde, Deney Grubu I ile ilaç verilen grupların kendi aralarında karşılaştırmaları yapıldığında birbirleriyle aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilememiştir ($p > 0.05$).



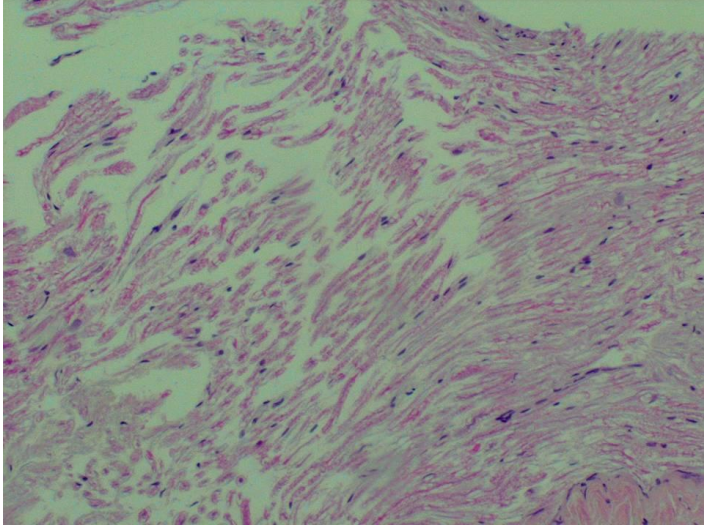
Şekil 14: Kontrol grubu siyatik sinir dokusu



Şekil 15: Sinir doku hasarlı bölge kesiti



Şekil 16: Egb 761 grubu sinir dokusu kesiti



Şekil 17: EGCG grubu sinir doku kesiti

5. TARTIŞMA

Periferal sinir hasarı günümüzde sık karşılaşılan olaylardan bir tanesidir. Özellikle ülkemizin coğrafik yapısının dağlık ve engebeli olması göz önüne alındığında toprak kayması, cığ düşmesi, trafik kazaları, bireye bağlı düşme, inşaat kazaları ve bunun gibi daha birçok olay klinik olarak sinir doku üzerinde ezilme tipi hasarlar oluşmasına sebep olmaktadır. Genelde lezyonun klinik tablosu sinirin lokalize olduğu bölgeye, ezilme oluşturan basınca ve bu basıncın oluşturduğu şiddet etkisine, ve ezilme oluşturan basıncın etki süresine bağlıdır (1, 2, 8).

Sinirde oluşan ezilme tipi ya da kompresyona bağlı hasar da diyebiliriz ilk olarak doku düzeyinde mekanik olarak etkili olmaktadır (4, 5). Kompresyon yapan cisim etrafından doku normal anatomik duruşunu bırakır ve travmatize bölge, sağlam olan kısma doğru kaymaya başlar ve duyu ve motor iletim üzerinde aksaklıklar oluşur. Ezilme tipi hasarın ikincil etkisini dokuda azalan kan ve doku sıvısına bağlı olarak mikrovasküler hasar olarak görmekteyiz (12, 13). Mikrosirkülasyonun azalması için kompresyon süresinin uzun olmasına gerek olmadığı düşük şiddetlerde bile kesildiği belirtilmiştir.

Ezilme tipi hasar; mekanik iletim bloğuna ki bu durumda sinirin inerve ettiği kas üzerinde de atrofiye neden olacaktır, öte yandan oluşan iskemi ve iskemi sonrası kanın tekrar o bölgeye göllenmesiyle reperfüzyon oluşur ki bu durumda serbest oksijen radikalleri meydana gelmektedir. İskemik ve mekanik etkilerin toplam etkisi her birinin tek başına oluşturduğu etkiden daha fazla hasar oluşturmaktadır (18, 19, 20, 21).

Deneyde sıçan kullanılmasının ana sebepleri öncelikle bilimsel olarak taksonomide memeliler sınıfında olması ve insana genetik ve moleküler açıdan birçok protein benzerliğinin bulunması, vücut olarak küçük olması yani fazla yer kaplamaması böylece rahat müdahale edilebilmesi, bütçe olarak masraflı olmayıp kolay üretilebilen ve elde edilebilen olması şeklinde sıralanabilir.

Yapılan araştırmalar neticesinde iskemi sonucu hücre sel permeabilite artmakta olup hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunda artmaya ve bu artışa bağlı olarak bir çok proteaz enzimi aktivasyonuna reseptörlerin, membran proteinlerinin hasarına yada ksantin oksidaz enzimi gibi serbest radikal üretim merkezi olan enzimlerin aktiflenmesine (41, 43, 46, 51), mitokondriyal aktivitenin azalmasına bağlı olarak ATP seviyesinde düşmeye, mitokondri membran yapısının bozulmasına bağlı olarak intermembranel aralıktaki (H⁺) hidrojenlerin serbestleşmesine ve serbestleşen hidrojenlerin (OH[•]) radikal formlara dönüşmesine belkide sebep olmaktadır. Ayrıca mitokondri membran bütünlüğündeki bozulmalar membran yapısındaki sitokrom C nin serbestleşmesine hücre içi apoptotik etkinin oluşmasına neden olacaktır. İskemik hasar yüksek düzeyde radikal oluşumunu aslında katalizlememektedir. Serbest radikallerin bu kadar artmasının asıl nedeni iskemik durum değildir azalmış oksijen seviyesinin reperfüzyon oluşmasıyla birlikte ani artışıdır (52, 54, 56, 57, 60).

Hücre olumsuz şartlara adaptasyon eğilimindedir ki bu süreç içinde ani bir oksijen artışı hücre içi bir çok sistemde oksidasyonu artıracığından oluşan ürünler ve substratlar arasındaki düzensiz korelasyon radikal üretimini tetikleyecek, oluşan radikaller ise ilk hedef olarak lipidlere saldıracaktır. Böylece lipid peroksidasyonu artacaktır. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan ürünlerden biride MDA'dır (44, 45, 46, 56). Sinir sistemi ise lipitçe oldukça zengindir. Sfingomyelin lipidler içeren sinirler işte bu ezilme tipi sinir hasarında iskemi-reperfüzyon hasarına maruz kaldığı için esas olarak hasara uğramaktadırlar (48, 49, 51, 52). Bizde bu çalışmamızda bu hasarı göstermek ve kullandığımız maddelerin hasara karşı koruyucu etkisini araştırmak için siyatik sinir ve inerve ettiği kas dokusunda MDA düzeylerini çalıştık. Ortalama MDA değerleri hesaplandığında en düşük MDA değerinin Kontrol grubunda (0,097+-0,05nmol/mg protein) olduğu en yüksek değer ise Deney Grubu I'de (0.189 nmol/mg protein) olduğu görülmektedir. Bu bulgular neticesinde verilen ilaç maddelerinin serbest radikal kaynaklı lipid peroksidasyonunu azalttığı düşünülmektedir. Fakat ilaç gruplarının her birinin tek başına yaptığı etkinin kombine gruba göre herhangi bir üstün yanının olmadığını da yine bulgularımızda belirtilmiştir.

Organizma iskemi reperfüzyon sonucu oluşan serbest radikallere antioksidan sistem dediğimiz enzimatik (SOD, CAT, GSH-Px, gibi) ve nonenzimatik sistemleriyle radikal detoksifikasyonuna karşı savunma oluşturmaya çalışmaktadır. SOD, CAT, GPx gibi endojen antioksidan özelliği olan bu enzimler radikal temizleyici özellikleriyle koruyucu etki gösterirler. SOD süperoksiti hızlıca hidrojenperoksite katalizler. Hidrojenperoksit ise katalaz ve GPx tarafından su ve oksijene indirgenir. Bu enzim seviyelerinin ölçümü serbest radikal aracılığıyla oluşan hasar konusunda indirek bilgi verir (62, 65, 71, 75).

Çalışmamızda kullandığımız EGb 761 (Tebokan forte) un SOD enzim aktivitesi üzerinde olumlu etkilerinin olduğu daha önceki çalışmalarda belirtilmişti (82, 83, 84). EGb 761 SOD aktivitesi arttırıcı etkisi kendisinin SOD enzim aktivitesine sahip olmasından kaynaklanmaktadır (79, 80). Çeşitli hastalıkların etkisiyle oluşan SOR üretiminde ve bu üretime bağlı olarak antioksidan enzim aktivitelerinde sürekli bir artıştan bahsetmek veya enzim inhibisyonu olabileceği konusunda fikir yürütmek zor olacaktır.

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 (104).

Bizde çalışmamızda siyatik sinir ve inerve ettiği kas dokusunda SOD enzim aktivitesini çalıştık. SOD enzim aktivitesi açısından en yüksek değerlerin EGb 761 grubunda olduğu ve diğer gruplara oranla anlamlı biçimde yüksek olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Ortalama SOD değerleri hesaplandığında en düşük SOD değerinin deney grubu I'de (2,850 U/mg protein) olduğu en yüksek değer ise EGb761 grubunda (8,309 U/mg protein) olduğu saptanmıştır. Kombine grupta ise SOD enzim aktivitesinin yüksek olduğu görülmüştür ($p<0.05$), aynı zamanda elde edilen bu değer EGb 761 grubuna göre daha düşük ve EGCG grubuna göre ise daha yüksek olduğu görülmüştür.

Siyatik sinir ve kas dokusunda yaptığımız NO düzeyi ölçümünde; NO düzeyinde en yüksek değerlerin Deney Grubu I'de olduğu ve istatistiksel olarak da anlamlı olduğu görülmüştür ($p < 0.05$). En düşük NO düzeyinin ise EGCG grubunda olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlenmiştir ($p < 0.05$). EGb761 ve EGCG grupları arasında ise NO düzeyinde anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0.05$). Ayrıca ortalama NO değerleri açısından karşılaştırıldığında ise; Ortalama NO değerleri hesaplandığında en düşük değerinin EGCG grubunda ($0,4420 \mu\text{mol}/\text{mg}$ protein) olduğu en yüksek değerinin ise Deney grubu I'de ($0,5913 \mu\text{mol}/\text{mg}$ protein) olduğu saptanmıştır.

SOD aktivitesinin artışı, Nitrit-nitrat düzeyindeki düşme, serbest radikallerin ortamdaki temizlenmesi nöronların membran bütünlüğünün sağlanması ve nöron rejenerasyonu açısından önemli bir nokta olduğu için üzerinde çalışılması gereken bir konu olabileceğini düşündürmektedir.

Siyatik sinir hasarı çalışmasında ana model oluşturan çalışmayı Sartini ve ark. ları yapmıştır. Sinir sistemi üzerinde EGb 761'in rejenerasyon ve bazı yaygın koruyucu etkilerinin olabileceğini belirtmişlerdir.

Hsu ve ark ise buna ilaveten schwann hücrelerinde EGb 761'in bazı polimerlerin (DL-laktik asit-co-glikolik asit) total miktarlarının artırılabilineceğini nöronların myelin içeren aksonlarında rejenerasyon ve periferik sinir fonksiyonlarında geri kazanımın da artırılabilineceğini belirtmiştir. EGCG oksidatif DNA hasarında epigallokateşinin koruyucu etkilerinin olduğu birçok çalışmada yine belirtilmektedir (102).

Doz bağımlı epigallokateşin verilerek yapılan iskemi reperfüzyon sonucu serbest radikal salınımı ve hücre hasarı, apoptozis çalışmasında kateşinin koruyucu etkisi olduğu belirtilmiştir (77, 90, 92).

Ağırlık kaybı üzerinde de etkilerinin olduğu sıçanlar üzerinde yapılan araştırmalarda elde edilen bulgular arasında belirtilmektedir (96).

Yapılan bu deneyde üzerinde çalışma yapılacak olan sıçanlar deneyin ilk günü, 4. günü ve deneysel olarak ilaç vermenin kesildiği 8. günde tartıldı ve sıçanlarda ortalama olarak 40gr. Ağırlık kaybı gözlemlendi. İlaç verilen tüm gruplarda ağırlık kaybının lineer bir azalış şeklinde olduğu bulgulara eklendi.

6.SONUÇLAR

- 1- Deney grubu I, MDA seviyesi Kontrol gruba göre anlamlı olarak yüksek tesbit edildi ($p<0.05$). Oksidatif hasarı ortadan kaldırmaya çalışan antioksidan enzimlerden SOD enzim aktivitesi ilaç verilen gruplarda anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.05$).
- 2- Siyatik sinir hasarında EGb 761'in koruyucu etkisinin olabileceği gözlemlenmiştir. EGb 761 grubunda MDA düzeyi anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Yine bu grupta NO düzeyinde de anlamlı olacak düzeyde bir azalma tesbit edilmiştir ($p<0.05$). SOD enzim aktivitesinde ise diğer gruplara oranla EGb 761 grubunda anlamlı bir artma söz konusudur ($p<0.05$).
- 3- Siyatik sinir hasarında EGCG'nin koruyucu etkisi olabileceği görülmüştür. MDA düzeyinde ve NO düzeyinde anlamlı bir azalma görülmüştür ($p<0.05$).
- 4- Kombine grupta ise hasarı önlemede koruyucu bir etkisinin olduğu fakat tek tek uygulanan ilaç gruplarına nispeten aradaki farkın anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p>0.05$).

7. KAYNAKLAR

- 1- Terzis JK, Smith KL, Repair and grafting of the peripheral nerve. In: Mc Carthy, JG 2nd Ed, Plastic Surgery, WB Saunders Co. 630-697-1989
- 2- Lundborg G, Dahlin LB, Danielsen N, Hansson HA, Johannesson A, Longo FM, Varon S Nerve regeneration across an extended gap: a neurobiological view of nerve repair and the possible involvement of neuronotrophic factors. J Hand Surg. 7 (6):2008
- 3- Keith L.Moore, Arthur F. Dalley Clinically oriented Anatomy. Fifth ed.2006 Lippincott
- 4- Bruno Battiston M.D. Stefano Geuna M.D Matteo Ferrero M.D Pierluigi Tos M.D Nerve repair by means of tubulization: Literature review and personal clinical experience comparing biological and synthetic conduits for sensory nerve repair Article first published online 2005
- 5- Jhon H. Martin, Neuroanatomy second ed.1996
- 6- Brach, C.J. Text-Book of Anatomy, IX. Edition Oxford University Press 1950, p:1104-1105 London.
- 7- Fahri Dere, Nöroanatomi, 3.baskı Nobel tıp kitabevi 2000.
- 8- Robinson LR. Traumatic injury to peripheral nerves. Muscle & Nerve, 2000
- 9- Quan D, Bird S. Nerve conduction studies and electromyography in the evaluation of peripheral nevre injuries. Orthopaedic Journal, 1999 12: 4
- 10- Ross MH, Pawlina W. Histology: A text and atlas. Baltimore, Philadelphia, 5th ed, Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
- 11- Junqueira LC, Carneiro J. Basic Histology: Text and atlas. 10th ed, New York, LANGE Mc Graw- Hill, 2003
- 12 Low C.K. Chew S.H Song I.C. Ng T.H. Low Y.P. End-to-side Anastomosis of Transected Nerves to Prevent Neuroma Formation, Clinical Orthopaedics and Related Research, 1999 369: 327-332.
- 13- Menovsky T. Beek J.F. Laser, Fibrin Glue, or Suture Repair of Peripheral Nerves: a Comparative Functional, Histological, and Morphometric Study in the Rat Sciatic Nerve, Journal of Neurosurgery, 2001 694-699.
- 14-Sunderland S. Nerve Injuries and their Repair. A Critical Appraisal. Churchill Livingstone, Edinburgh,1991

- 15-. Tassler P.L. Dellon A.L. Canoun C. Identification of Elastic Fibres in the Peripheral Nerve, *Journal of Hand Surg*, 1994;48-54.
- 16- Snell R.S. *Clinical Neuroanatomy for Medical Students*, Little Brown and Company, Boston, 1980;87-114.
- 17- Uysal A. Yurtseven M. Baka M. Cireli E. Köktürk İ. Sıçanlarda Sinus Cavernosus İçinde Seyreden Nervus Abducens'e Ait Myelinli ve Myelinsiz Aksonların Ultrastrüktürel İncelenmesi, *Ege Tıp Dergisi*, 1996 35: 105-109
- 18- Salonen V. Roytta M. Peltonen J. The Effects of Nerve Transection on the Endoneurial Collagen Fibril Sheaths, *Acta Neuropathology (Berl)*
- 19-. Stevens A. Lowe J.S. *Human Histology*, Mosby, London, 1997
- 20- Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg Focus*, 2004
- 21- Frostick SP, Yin Q and Kemp GJ. Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. *Microsurgery*, 1998
- 22- M, Xinya S. Schwann cells: Leader of nervenkitt. *J Ayub Med* 2002
- 23- Zochodne DW. The microenvironment of injured and regenerating peripheral nerves. *Muscle Nerve Supplement*, 2000
- 24- Hunter DA. Nerve regeneration in rat. *Plast Reconstr Surg*. 1992
- 25- Levent Sarıkçıoğlu, Olcay Özkan Siyatik sinir ezisi uygulanmış ratlarda immobilizasyonun aksonal rejenerasyona etkisi. 2003
- 26- Fernandez E, Pallini R, Lauretti L, Scogna A. Neurosurgery of the peripheral nervous system: injuries, degeneration and regeneration of the peripheral nerves. *Surg Neurol*, 1997
- 27- Mackinnon SE, Hudson AR, Hunter DA. Histologic assessment of nerve regeneration in rat. *Plast Reconstr Surg*. 75:484-388
- 28- Anselin AD, Fink T, Davey DF. An alternative to nerve grafts in peripheral nerve repair: Nerve guides seeded with adult Schwann cells. *Acta Chirurgica Austriaca* 1998
- 29- Mirajullah M, Xinya S. Schwann cells: Leader of nervenkitt. *Coll Abbottabad*, 2002
- 30- Seckel BR Enhancement of peripheral nerve regeneration *muscle&Nerve* 1990
- 31- Varejao AS, Meek MF, Ferreira AJ, Cabrita AM. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat walking track analysis. *J Neuroscience Methods*, 2001
- 32- Stoll G, Jander S and Myers RR. Degeneration and regeneration of the peripheral

nervous system: From Augustus Waller's observations to neuroinflammation. Peripheral Nervous System, 2002

33- Cravioto H. Wallerian Degeneration: Ultrastructural and Histochemical Studies, Bulletin of the Los Angeles Neurological Societies.

34- Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. Neurosurg Focus, 2004

35- Van der Zee CE, Brakkee JH, Gispen WH (1991) Putative neurotrophic factors and functional recovery from peripheral nerve damage in the rat. Br J Pharmacol; 103 (1): 1041

36- Zochodne DW. The microenvironment of injured and regenerating peripheral nerves. Muscle Nerve Supplement, 2000

37- Frostick SP, Yin Q and Kemp GJ. Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. Microsurgery, 1998; 18: 397-405

38- Mirajullah M, Xinya S. Schwann cells: Leader of nerverenue. 2002; 30-33.

39- Fu SY, Gordon T (1997) The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. Mol Neurobiol; 14 (1-2): 67-116

40-Cravioto H. Wallerian Degeneration: Ultrastructural and Histochemical Studies, Bulletin of the Los Angeles Neurological Societies, 196934-233

41- Akkuş Ddi. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Konya, Turkey

42-Ween Y, Killalea S, Mc Gettigan P, Feely J. Lipid peroxidation and antioxidant vitamins C and E in hypertensive patients. Lipid peroxidation and Hypertension 1996

43-Erden, Serbest radikaller T. Klin Tıp Bilim 1992.

44-Uysal M. Serbest radikaller, lipid peroksidleri ve organizmada prooksidanantioksidan dengeyi etkileyen koşullar. Klinik Gelişim 1998

45- Dunder Y, Aslan R. Hekimlikte Oksidatif Stres ve Antioksidanlar. 1.Baskı Ankara: Uyum Ajans, 2000

46-Aslan R, Şekeroğlu M. R, Bayiroğlu F. Serbest Radikal Türlerinin Membran Lipid Peroksidasyonuna Etkileri ve Hücresel Antioksidan Savunma. Sağlık. Bil. Derg 1995

47- Valenzuela A. The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. Life Sci. 1991

48- Halliwell B, Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? Lance 1994721-724

- 49- Riabichenko EV, Bondarenko VM, Riabichenko VV. Zh, Role of active forms of oxygen generated by phagocytes in the pathogenesis of diseases Mikrobiol Epidemiol Immunobiol 2004
- 50- Kohen R, Nyska A, Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. Toxicol Pathol 2002
- 51- Cheeseman KH and Slater, An introduction to free radical biochemistry. Br Med Bull 1993
- 52- Greenwald RA, Oxygen radicals, inflammation, and arthritis: pathophysiological considerations and implications for treatment. Semin Arthritis Rheum 1996
- 53- Ween Y, Killalea S, Mc Gettigan P, Feely J, Lipid peroxidation and antioxidant vitamins C and E in hypertensive patients. Lipid peroxidation and Hypertension 1996
- 54- Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. Toxicol Pathol 2006
- 55- Ceballos, Picot I, Trivier JM, Nicole A. (1992) Age-corelated modifications of cupperzinc superoxide dismutase and glutathione-related enzyme activities in human erythrocytes. Clin Chem; 38 (1): 66-70
- 56- Baykal Y, Kocabalkan F. Serbest radikaller ve hücre hasarı Sendrom 2000
- 57- 32-Haris E.D. Regulation of Antioxidant Enzymes. Faseb Jour. 1992
- 58- Malvy et al. Gutteridge, J.M. C. Richmond, R. & Halliwell, B. Biochem. Slater, T. F. & Sawyer, B. C. Biochem. J. Printed in Great Britain
- 59- IMJ Hamilton, WS Gilmore, British Journal of Nutrition - Cambridge Univ Press May JM, Qu, Z & Mendiratta, Protection and recycling of a-tocopherol in human... RA & Rowen PE. Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C and E. 1996
- 60- Atilla GÜRAY, Nedim SAMANCI, Fahri OVALI, Türkân, Pierrefiche G, Nitrik Oksit: Fizyolojisi ve Klinik Önemi
- 61- Topall G, Courboin G, Henriët I, Laborit H Antioxidant activity of melatonin in mice. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 1993
- 62- Danh HC, Benedetti MS, Dostert P. Differential changes of SOD activity in brain and liver of old rats and mice J. Neurochem
- 63- Fantone JK, Ward PA. Role of oxygen derived free radicals and metabolites in leukocyte dependent inflammatory reactions. Am J Pathology 1992
- 64- Choi D. Free radicals. Stroke 1990

- 65-Barlow-Walden LR, Reiter RJ, Abe M, Pablos M, Menendez-Pelaez A, Chen LD, Poeggeler B (1995) Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem Int*; 26 (5): 497-502
- 66-Catherine SCA, Webb D.J , Rossi A.G., Megson I.L. . Cyclic GMP protects human macrophages against peroxynitrite-induced apoptosis. *Journal of Inflammation*. 2009
- 67-Spallholz JE. Selenium and glutathione peroxidase: essential nutrient and antioxidant component of the immune system. *Adv Exp Med Biol* 1990
- 68-X W Wang, C C Harris, Hepatitis B virus X protein inhibits p53 sequence-specific DNA binding, transcriptional activity, and association with transcription factor ERCC3 Laboratory of Human Carcinogenesis, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD
- 69-Wenying Ren, Zhenhua Qiao, Lei Zhu, Flavonoids: Promising anticancer agents DOI: 10.1002/med.10033
- 70- A. Hasler, B. Meier, *Pharm. Pharmacol. Lett* 1992.
- 71-Seven A, Candan G (1996) Antioksidan savunma sistemleri Cerrahpaşa J.Med
- 72- Pierrefiche G, Topall G, Courboin G, Henriet I, Laborit H. Antioxidant activity of melatonin in mice. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1993
- 73- Kaptanoglu E, Tuncel M, Palaoglu S, Konan A, Demirpence E, Kilinc K. Comparison of the effects of melatonin and methylprednisolone in experimental spinal cord injury. *J Neurosurg* 2000
- 74- Steinhilber D, Brungs M, Werz O, Wiesenberg I, Danielsson C, Kahlen JP, Nayeri S, Schrader M, Carlberg C The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes. *J Biol Chem* 2005
- 75- Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1996
- 76-Tan DX, Poeggeler B, Reiter RJ, Chen LD, Chen S, Manchester LC, Barlow-Walden LR The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole in vivo. *Cancer Lett*; 70: 65-71 1993
- 77- K.H.C.Başer ve N.Kırimer Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, 29-31 Mayıs 2002, Eskişehir, Eds. Haziran 2004
- 78- AG Dulloo, C Duret, D Rohrer *American Journal of Clinical Nutrition*. Dulloo AG, Seydoux J, Girardier L, Chantra P, Vandermander J. Green tea and thermogenesis:

- interactions between catechin-polyphenols, caffeine and sympathetic activity. *Int J Obes Relat Metab Disord* (in press). Lee MJ, Wang ZY, Li H, et al
- 79- F.V. de Feudin, *Ginkgo biloba extract (EGb-761) from chemistry to the clinic*, Ullstein Medical Wiesbaden, 1998.
- 80- K. Nakanishi, *The Ginkgolides*, Pure Appl. Chem.
- 81- F.V. de Feudin, *Ginkgo biloba extract (EGb-761) from chemistry to the clinic*, Ullstein Medical Wiesbaden, 1998.
- 82- H.S.Chung, A. Harris, J.K. Kristinsson, T.A. Ciulla, C.Cageman, R. Ritch. *J.Ocul. Pharmacol. Ther* 1999
- 83- E-Jian Lee, Hung-Yi Chen, Acute administration of Ginkgo biloba extract Affords neuroprotection against permanent.
- 84- Maitra I, Marcocci L, Peroksyle radicl scavenging activity of Ginkgo biloba ext. *biochem farma*.
- 85- Dr. Mukaddes GÜLEÇ, Dr. H. Ramazan YILMAZ, Dr. Mustafa IRAZ, Dr. Sadık Söğüt the effects of ginkgo biloba extract on plasma glutathion peroxidase, superoxide dismutase, adenosine deaminase and nitric oxide levels in cisplatin-induced nephrotoxicity.
- 86- Yuko Taki Time-Dependent Induction of Hepatic Cytochrome P450 Enzyme Activity and mRNA Expression by Bilobalide in Rat
- 87- Hatice Emir, MD, Zeynep Kizilkaya Kaptan, The preventive effect of ginkgo biloba extract in myringosclerosis: Study in rats.
- 88- Turgay Akgu, Ersagun Karagu, Ginkgo biloba (EGB 761) affects apoptosis and nitric-oxide synthases in testicular torsion: an experimental study.
- 89- KAPTANOĞLU Mehmet, Flavonoid içerikler ve antioksidan özellikleri 2004
- 90- KOÇYİĞİT Abdurrahim, Effects of dietary supplementation of catechin on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in rats.
- 91- Joong-Hwa Chunga, Dong-Hyun Choia and Jun-Shik Choib, Effects of Oral Epigallocatechin Gallate on the Oral Pharmacokinetics of Verapamil in Rats.
- 92- Y. Hara, M. Fujino, K. Adachi, and X.-K. Li The Reduction of Hypoxia-Induced and Reoxygenation-Induced Apoptosis in Rat Islets by Epigallocatechin Gallate
- 93- Chu DC, Juneja LR. General chemical composition of green tea and its infusion. In: *Chemistry and Application of Green Tea*, Yamamoto T, Juneja LR, Chu DC, Kim M (eds). CRC Press: New York,

- 94- SARAÇOĞLU Ahmet, Composition of some herbal slimming tea preparations marketed in turkey and their possible adverse effects.
- 95- H.S.Chung, A. Harris, J.K. Kristinsson, T.A. Ciulla, C.Cageman, R. Ritch. *J.Ocul. Pharmacol. Ther.* 1999
- 96-Weisburger, J.H. Chung, F.L. Mechanism by chronic disease caused by nutritional factors and tobacco products and their prevention by tea polyphenols. *Food and Chemical Toxicology* 2002
- 97-Can-Lan, S. Jian-Min, Y. Woon-Puay, K., Mimi, C.Y. Green tea, black tea and colorectal cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Carcinogenesis* 2006
- 98-T.A. von Beek, G.P. Lelyveld, *Planta Medica*, 1992
- 99-G. Mazza, B.D. Oomach in “Botanicals and Teas, Functional Foods and Nutraceutical Series Herbs” *Chemistry, Pharmacology and Clinical Applications of St John Woth and Ginkgo biloba.* G.Mazza, B.D. Oomah(Eds), Technomic Publishing Co. Inc. Lancaster, U.S.A. 2000
- 100- B.P. Guinot, C. Brambilla, J. Duchier, A. Taytard, C. Summerhayes, ‘The Clinical Effects of BN. A specific PAF-acether antagonist, astma.’ In *Ginkgolides-Chemistry, Biology, Pharmacology and Clinical perspectives* ‘ Vol. 1.P.Braquet, ed. J.R.Prous Science Publishers, Barcelona, Spain, 1998
- 101-B.H. Jaggy, E. Koch, *Pharmazie*, 1997
- 102-Hiipakka, R.A. ShutSung, L. YungHsi, K. Modulation of endocrine systems and food intake by green tea epigallocatechin gallate. *Endocrinology* 2000
- 103-Kim SY, et al: Protective effects of EGCG on UVB-induced damage in living skin equivalents. *Arch Pharm.* Bhimani RS, et al: Inhibition of oxidative stress in HeLa cells by chemopreventive agents. *Cancer Res* 1993
- 104- Çetinkaya A, Kurutaş EB, Bülbüloğlu E ve ark. Deneysel olarak oluşturulan kolit modelinde N-asetilsistein ve L-karnitinin eritrosit antioksidan sistemler üzerine etkileri, *KSÜ TIP FAK Derg.* 2005