

165660

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. ÜLKER ÇÖTELİOĞLU

RATLARDA  
D-ALA<sup>2</sup>, D-LEU<sup>5</sup>-ENKEPHALİN(DADLE)'İN  
NÖROPROTEKTİF ADAPTASYONA İLİŞKİN BAZI  
PARAMETRELERE ETKİLERİ

DOKTORA TEZİ

Araş. Gör. İBRAHİM AKYAZI

İSTANBUL - 2005

## İÇİNDEKİLER

<b>BÖLÜM 1. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>1</b>
<b>BÖLÜM 2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>4</b>
2.1.    Hibernasyon .....	4
2.1.1.    Hibernasyon ve klinik uygulama alanları .....	6
2.1.1.1.    Hibernasyon ve nöroproteksiyon .....	6
2.1.1.1.1.    Hipotermi .....	7
2.1.1.1.2.    İmmun düzenleme .....	7
2.1.1.1.3.    Antioksidan savunma .....	7
2.1.1.1.4.    Hipokoagulasyon .....	8
2.1.1.1.5.    Metabolik baskılanma .....	9
2.1.2.    Hibernasyonu indükleyici madde (HİM) .....	10
2.1.3.    DADLE - HİM ilişkisi ve Etkileri .....	10
2.2.    Opioid Reseptörler, Agonistler (ligandlar) ve Etkileri ....	11
2.2.1.    DADLE .....	12
2.2.1.1.    Kimyasal Yapı ve Genel Özellikleri .....	12
2.2.1.2.    Etkileri ve Olası Klinik Kullanım Alanları .....	13
2.2.1.2.1.    İskemi-reperfüzyon .....	13
2.2.1.2.2.    Organ transplantasyonu .....	14
2.2.1.2.3.    Kardioproteksiyon .....	14
2.2.1.2.4.    Gastroproteksiyon .....	15
2.2.1.2.5.    Nöroproteksiyon .....	15
<b>BÖLÜM 3. GEREÇ ve YÖNTEM</b> .....	<b>17</b>
3.1.    Gereç .....	17
3.2.    Yöntem .....	18
3.2.1.    Ozmotik pompa implantasyonu .....	20
3.2.1.1    Kullanılan araç ve malzemeler .....	20
3.2.1.2.    Ozmotik pompa .....	20

3.2.1.3.	Pompaların doldurulması .....	21
3.2.1.4.	Anestezi ve operasyon .....	22
3.2.2.	Kan örneklerin alınması .....	23
3.2.2.1.	Kullanılan araç ve malzemeler .....	23
3.2.2.2.	Yöntem .....	23
3.2.3.	Beyin doku örneklerinin alınması ve homojenizasyon .....	24
3.2.3.1.	Kullanılan araç ve malzemeler .....	24
3.2.3.2.	Yöntem .....	24
3.2.4.	Analizler .....	25
3.2.4.1.	Koagülasyon parametrelerinin belirlenmesi .....	25
3.2.4.1.1.	Kullanılan araç ve malzemeler .....	25
3.2.4.1.2.	Pıhtılaşma süresinin belirlenmesi .....	26
3.2.4.1.3.	APTT süresinin belirlenmesi .....	26
3.2.4.1.4.	PT süresinin belirlenmesi .....	26
3.2.4.1.5.	TT süresinin belirlenmesi .....	27
3.2.4.2.	Lökosit sayımı .....	27
3.2.4.3.	Total antioksidan düzeyi (TAD) 'nin belirlenmesi .....	27
3.2.4.4.	Beyin dokuda protein miktarı tayini .....	27
3.2.4.5.	Malondialdehit (MDA) miktarının belirlenmesi .....	28
3.2.4.5.1.	Kullanılan araç ve malzemeler .....	28
3.2.4.5.2.	Kullanılan kimyasal maddeler .....	28
3.2.4.5.3.	Kullanılan solüsyonlar ve hazırlanışları .....	29
3.2.4.5.4.	Analiz prosedürü .....	29
3.2.4.6.	Askorbik asit (Vitamin C) miktarının belirlenmesi .....	31
3.2.4.6.1.	Kullanılan araç ve malzemeler .....	31
3.2.4.6.2.	Kullanılan kimyasal maddeler .....	31
3.2.4.6.3.	Kullanılan solüsyonlar ve hazırlanışları .....	32
3.2.4.6.4.	Analiz prosedürü .....	33
3.2.4.6.5.	Sonuçların hesaplanması .....	34

<b>BÖLÜM 4. BULGULAR</b> .....	<b>36</b>
4.1. Vücut ısıları .....	36
4.2. Koagulasyon parametreleri .....	36
4.3. Lökosit sayıları .....	38
4.4. Total antioksidan düzeyleri .....	39
4.5. Malondialdehit düzeyleri .....	40
4.6. Askorbik asit düzeyleri .....	41
<b>BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ</b> .....	<b>42</b>
<b>BÖLÜM 6. ÖZET</b> .....	<b>46</b>
<b>BÖLÜM 7. SUMMARY</b> .....	<b>47</b>
<b>BÖLÜM 8. KAYNAKLAR</b> .....	<b>48</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>57</b>

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b>	Elde edilen örnekler ve araştırılan parametreler .....	19
<b>Tablo 2.</b>	MDA analiz prosedürü .....	30
<b>Tablo 3.</b>	Askorbik asit standart solüsyonları için dilusyon tablosu .....	33
<b>Tablo 4.</b>	Askorbik asit analiz prosedürü .....	34
<b>Tablo 5.</b>	Koagulasyon parametreleri .....	37
<b>Tablo 6.</b>	Lökosit sayıları .....	38
<b>Tablo 7.</b>	Plazma ve beyin dokuda TAD .....	39
<b>Tablo 8.</b>	Plazma ve beyin dokuda MDA değerleri .....	40
<b>Tablo 9.</b>	Askorbik asit düzeyleri .....	41

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	Ozmotik pompanın yapısı .....	20
Şekil 2. a, b.	Deri altında ozmotik pompaların yerleştirileceği cebin oluşturulması .....	22
Şekil 3. a, b.	Ozmotik pompaların oluşturulan cebe yerleştirilmesi .....	22
Şekil 4.	Askorbik asit analizi kalibrasyon grafiği .....	35
Şekil 5.	Vücut ısıları .....	36
Şekil 6.a.	APTT, PT ve TT değerleri .....	37
Şekil 6.b.	PS değerleri .....	37
Şekil 7.	Lökosit sayıları .....	38
Şekil 8.a.	Beyin dokuda TAD .....	39
Şekil 8.b.	Plazmada TAD .....	39
Şekil 9.a.	Beyin dokuda MDA düzeyleri .....	40
Şekil 9.b.	Plazmada MDA düzeyleri .....	40
Şekil 10.	Plazma Askorbik asit (AA) düzeyleri .....	41

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve çalışmalarım süresince bana her konuda yol gösteren, destek ve örnek olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ülker ÇÖTELİOĞLU'na, desteği, yardımı ve hoşgörüsüyle her zaman yanımda olan Anabilim Dalı Başkanım Sayın Prof. Dr. Mukaddes ÖZCAN'a, gerek laboratuvar çalışmalarım, gerekse tezimin yazım aşamasında bilgi birikimleri ve önerileriyle bana destek olan Sayın Doç. Dr. Murat ARSLAN'a, tüm çalışmam boyunca bana her konuda destek olan ve en zor kısımlarında beni yalnız bırakmayan Sayın Doç. Dr. Erdal MATUR'a, çalışmamın deneysel aşamasında bana özveriyle yardımcı olan asistan arkadaşlarım Araş. Gör. Dr. Elif ERGÜL EKİZ, Araş. Gör. Evren ERASLAN ve Araş. Gör. Nazife Güldal İNAL'a, doktora eğitimim boyunca hiçbir konuda yardımını esirgemeyen laborant Nilgün KUŞ'a, tez izleme komitemde değerli önerileri ile bana destek olan Sayın Prof. Dr. Ahmet ALTINEL'e, analizlerim esnasında laboratuvar olanaklarından ve bilgi birikiminden yararlanmam konusundaki desteğinden dolayı Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Biyokimya Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Özcan EREL'e, hayatımın her dönemimde olduğu gibi doktora eğitimimde de hep yanımda yer alan ve bana destek olan sevgili aileme ve isimlerini burada yazmadığım, kendisinden bir şeyler öğrendiğim herkese içtenlikle teşekkür ederim.

*Not:* Bu çalışmayı içine alan araştırma projesi İ.Ü. Veteriner Fakültesi Etik Kurulu tarafından incelenmiş ve 31.01.2003 tarih ve 65 No'lu karar ile etik kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

*Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'nca desteklenmiştir. Proje No: 102-15052003*

## BÖLÜM 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hibernasyon, belirli hayvan türlerinin aşırı soğuk ve sınırlı yiyecek kaynağıyla karşılaştığında gösterdiği (74), hipotermi, bradikardi, uzun süreli afaji ve genel metabolik baskılanma gibi birçok fizyolojik değişimi içeren biyolojik bir fenomen (73) olup, hayvanların enerjilerini korumalarını ve uzun süreli besin yokluğunda hayatta kalmalarını sağlayan eşsiz bir fizyolojik adaptasyondur (123).

Hibernant olmayan türler  $-1,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' ye kadar düşen kolonik ısı (4), yüzde birine düşen bazal metabolizma (114), ellide birine düşen oksijen tüketimi, dakikada 1-2'ye düşen solunum sayısı, 3–10 atıma düşen kalp frekansı (62, 78) ve % 90 oranında düşen beyin kan akımı (6) gibi fizyolojik parametrelerdeki aşırı değişimleri tolere edemezler. Özellikle beyin dokusunda ciddi anlamda azalan kan akımı ve oksijen miktarı göz önüne alındığında hibernasyon, ötermik ve non-hibernant hayvanlarda dakikalar içinde sinir ölümü ve beyin hasarı yaratacak koşullara karşı doğal bir adaptasyon oluşturur (6, 28, 123).

Bu nöroprotektif adaptasyon mekanizmalarının insanlarda iskemi-reperfüzyon, travmatik beyin yaralanmaları ve nörodejeneratif hastalıklar gibi durumlarda tedaviye yönelik etkileri olabilir. Yine insanlarda soğuğa toleransı arttıracak yöntemler hipotermi tedavisel yararlılığını arttırmak için kullanılabilir ve hibernasyon esnasındaki metabolik supresyondan sorumlu faktörlerin detaylı olarak anlaşılması çok geniş terapötik uygulama alanları bulabilir (28).

Hibernasyon fizyolojisi iskemi, kemik ve kas atrofisi, hipotermi, ketozis, organ transplantasyonu, obesite, böbrek yetmezliği, kardiyak aritmogenez ve alzheimer çalışmaları için de doğal bir model oluşturur (13, 34, 76, 115, 118, 128).

Dawe ve Spurrier (23) hibernasyondaki yer sincaplarının (*Citellus tridecemlineatus*) kanını ötermik yer sincaplarına transfer ederek bunlarda yaz aylarında hibernasyon oluşturmuşlardır. Bu çalışma ilk kez hibernant memelilerde doğal hibernasyondan sorumlu bir "tetikleyicinin" kanda taşındığını ve kan transfüzyonu ile



aynı türün hibernasyonda olmayan ötermik bireylerine transfer edilerek bunlarda hibernasyon oluşturulabileceğini göstermiştir. Daha sonra hibernasyondaki dağ sıçanından (*Marmota monax*) ötermik yer sincabına (*Citellus tridecemlineatus*) yapılan kan transfüzyonunun yer sincabında hibernasyonu indüklediği bulunmuş ve hibernasyon indükleyici maddenin (HİM) türe özel olmadığı gösterilmiştir (24).

Sonraki yıllarda HİM'in hibernant olmayan türler üzerindeki etkilerini inceleyen birçok çalışma yapılmış ve geniş fizyolojik etkilerinin olduğu belirtilmiştir (5, 73). Swan ve Schaette (101) 1976 yılında yaptıkları bir çalışmada hibernasyondaki yer sincaplarından elde ettikleri beyin ekstraktını sıçanlara intravenöz vererek oksijen tüketimlerinde % 35'lik bir azalma ve vücut ısılarında da 5 °C'lik bir düşme gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmalarda HİM'in primatlarda renal fonksiyonu baskıladığı (73), hipotermi, bradikardi, afaji ve beyin fonksiyonlarında opioid benzeri baskılayıcı etki (71, 75) oluşturduğu bildirilmiştir.

HİM molekülleri saflaştırılmamış ve kimyasal yapısı tam olarak belirlenememiş olmakla beraber, plazma albumin fraksiyonlarına bağlı 88 kDa'lık opioid benzeri küçük termolabil bir protein olduğu yönünde bulgular bulunmaktadır (6, 8, 10, 47, 55, 72). Bruce ve ark. (9) HİM' in endojen opioidlerin prekürsörü olduğu ya da bu opioidlerin salınımını uyararak hibernasyonu indüklediğini belirtmişlerdir. Oeltgen ve ark. (74) yaptıkları çalışmada bir delta-2 opioid olan D-Ala<sup>2</sup>, D-Leu<sup>5</sup>-Enkephalin (DADLE)'in yazın aktif olan yer sincaplarında hibernasyon oluşturduğunu ve bunun doğal HİM ile karşılaştırıldığında aynı oranda etkin olduğunu tespit etmişler ve hayvanlarda hibernasyonun indüksiyonunda delta opioid reseptörler ve bunların ligandlarının rol oynadığını ileri sürmüşlerdir.

DADLE'nin direkt infüzyonu da HİM'e benzer şekilde, hibernant olmayan hayvanlarda solunum depresyonu, analjezi, hipotansiyon ve kalp atım sayısında azalma gibi hibernasyon benzeri etkiler oluşturur (5, 46)

Zhou ve ark. (128) hibernasyonun serebral iskemi toleransı için doğal bir model oluşturmasından yola çıkarak yaptıkları çalışmada, hibernasyondaki yer sincaplarının ötermik olanlarla karşılaştırıldığında travmatik beyin yaralanmalarına karşı bir toleransa sahip olduğunu saptamış ve hibernasyonun nöroprotektif olduğunu belirtmişlerdir. Bu

konuya paralel olarak yapılan çalışmalar sonucunda hibernasyonu indükleyen DADLE'nin normoksik ve hipoksik koşullarda kortikal nöronlar için nöroprotektif olduğu (126, 127), Bax'a bağlı apoptotik süreçleri bloke ettiği (106), beyinde sinir büyüme faktörünü artırdığı ve bu nedenle nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde önemli bir klinik uygulama alanı bulabileceği (43) bildirilmiştir.

Hibernasyonun nöroprotektif etkisi, oluşan ileri düzeyde hipotermi, şiddetli lökositopeni, artan antioksidan savunma, azalan protein sentezi, oluşan hipokoagulasyon ve metabolik supresyonun additif ve sinerjik etkilerinin sonucudur (28, 128). Hibernasyonu indükleyen DADLE'nin genel doku koruyucu etkilerinde ise serbest radikal oluşumunu engelleyici ve lipid peroksidasyonunu azaltıcı özelliğinin büyük önemi bulunmaktadır (98, 105).

Bugüne kadar DADLE' nin hayvanlar üzerindeki genel doku koruyucu etkilerini inceleyen *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda, akut ve kronik DADLE uygulamaları yapılmıştır. (39, 43, 98, 99, 104, 105, 106, 110, 121). Ancak söz konusu çalışmalar içinde DADLE'nin sürekli enfüzyonunun etkilerinin incelendiği herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışmada HİM ile benzer etkiler gösteren ve opioid bir madde olan DADLE'nin, sıçanlarda ilk kez 28 günlük sürekli enfüzyonunun (2,5 µl/saat hızında; % 0,5 lik DADLE çözeltisi), hibernant hayvanlarda nöroprotektif mekanizmanın temelini oluşturan hipotermi (vücut ısısı), antioksidan savunma (total antioksidan düzeyi, malondialdehid miktarı, askorbik asit düzeyi), immun düzenleme (akyuvar sayısı) ve hipokoagulasyon'a (aktive parsiyel tromboplastin zamanı, protorombin zamanı, trombin zamanı, pıhtılaşma süresi) ilişkin bazı fizyolojik ve hematolojik parametreler üzerine etkileri araştırılacaktır. Eğer böyle bir etkinin varlığı ortaya konabilirse, DADLE'nin bu etkisinin travmatik beyin yaralanmaları, iskemi-reperfüzyon durumunda görülen sinir dokusu harabiyeti ve insanlarda alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisiyle ilgili araştırmalara katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

## BÖLÜM 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Hibernasyon

Hibernasyon, yer sincabı, hamster, kirpi, köstebek, porsuk, yarasa, yediuyur, dağ sıçanı gibi küçük memeli türlerini de içeren bazı hayvanların aşırı soğuk ve sınırlı yiyecek kaynağıyla karşılaştığında gösterdiği (7, 74), hipotermi, bradikardi, uzun süreli afaji ve genel metabolik baskılanma gibi birçok fizyolojik değişimi içeren biyolojik bir fenomen (73) olup, hayvanların enerjilerini muhafaza etmelerini ve uzun süreli besin yokluğunda hayatta kalmalarını sağlayan eşsiz bir fizyolojik adaptasyondur (123).

Hamster ve yer sincabı gibi hibernant memelilerde, derin hibernasyon esnasında vücut ısısı 0 °C' nin biraz üzerine kadar düşerek çevre ısısına yaklaşır. Bazı ektotermik omurgalılar antifiriz proteinler sayesinde vücut sıvılarının donmasını engelleyerek ya da donmayı tolere ederek sıfırın altındaki vücut ısılara ulaşabilirler, ancak hibernant olmayan endotermik türler bu ısıları doğal olarak tolere edemezler. Barnes (4) yaptığı çalışmada hibernasyondaki kutup yer sincaplarında heterojen olarak vücut ısısının (kolonik ısı) 3 haftalık bir süre boyunca yer yer -1,3 °C' ye kadar düştüğünü ve bu ısılarda bile kan akımının sürdüğünü tespit etmiştir. Aynı çalışmada bir hayvanda -2,9 °C'lik bir çekirdek ısı bulgulanmıştır. Çalışma sonrası hayvanlardan alınan kanda antifiriz maddelere rastlanmamıştır (4).

Vücut ısısındaki 40 °C' yi bulan bu önemli düşüş hücresel olayların yavaşlamasına neden olur. Oksijen tüketimi ötermik düzeyin otuz ila ellide birine (6), metabolizma ise normal bazal metabolizmanın yüzde birine kadar düşer (62).

Dakikada 120 olan solunum sayısı dakikada 1-2 solunuma düşer. 5-10 adet normal solunum sonrası bir saati bulan apne dönemleri görülebilir (6).

Dakikada 200-300 olan kalp atım sayısı hibernasyonda 3-10 atıma kadar düşebilir (62), buna rağmen kalp kası düzenli olarak kontraktıl fonksiyonunu sürdürür (70). Oysa hibernant olmayan türlerde vücut ısısı azalmasına bağlı olarak, 32 °C' de aritmi, 30

°C'de atrial fibrilasyon başlar ve 15 °C'de artan ventriküler uyarılabilirlikle birlikte, ventriküler fibrilasyon, asistol ve kalp durması şekillenir (50).

Azalan kalp frekansı ve kan basıncı beyindeki kan akımını ötermik düzeylerin % 80-90'ına düşürür. Bu denli bir azalma sıçan ya da insan gibi hibernant olmayan türlerde kısa süre içinde beyin dokusunda hasara ve sinir ölümüne neden olabilir (6).

Hibernasyondan çıkan hayvanlarda, baskılanan dolaşıma bağlı olarak iskemik hale gelen organların yeniden normal kan akımına kavuşması sonucu herhangi bir iskemi-reperfüzyon hasarı gözlenmemesi sonucundan yola çıkılarak yapılan çalışmalarda DADLE'nin non-hibernant hayvanlara ait karaciğer (121), kalp (90), jejunum (107), ve akciğer (119) gibi organlarda iskemik toleransı artırdığı belirlenmiştir.

İskemi hibernant olmayan türlerde tüm hücresel fonksiyonlardaki homeostatik kontrolü bozarken, hibernantlarda bu fonksiyonlar kontrollü olarak durdurulur ve homeostatik denge korunur. Protein sentezi normal şartlarda bozulmaya en yatkın hücresel fonksiyonlardan biridir. İskemiye bağlı olarak baskılanan protein sentezi, hibernant olmayan türlerde iskemi sonrası hücre nekrozuna neden olurken, hibernantlarda bu baskılanma herhangi bir patolojik durum yaratmamanın yanı sıra iskemiye karşı gösterdikleri toleransa da katkı sağlar (37).

Hibernasyon esnasında genel kan volümü, eritrosit ve lökosit sayıları azalırken, pıhtılaşma süresi uzar (6). Hızla oluşan lökopeni, dolaşan lökosit sayısının normal düzeyin % 90 'ına düşmesi kadar ileri derecede olabilir ve bu sayı hayvanın uyanmasıyla birlikte kısa sürede normal düzeylere ulaşır (62, 85, 95, 123).

Plazmadaki en önemli antioksidanlardan olan, normal sinir fizyolojisinde önemli rolü bulunan ve beyin için nöroprotektif olan askorbik asit (86), hibernasyonda normal düzeyin dört katına kadar çıkar (27).

### **2.1.1. Hibernasyon ve klinik uygulama alanları**

Hibernasyon fizyolojisi iskemi, kemik ve kas atrofisi, hipotermi, ketosis, organ transplantasyonu, obesite, böbrek yetmezliği, kardiyak aritmogenez ve alzheimer çalışmaları için doğal bir model oluşturur (13, 34, 76, 115, 118, 128).

Hibernasyon insanlara yönelik çeşitli klinik uygulama alanları açısından birçok araştırmacının ilgi odağı olmuş ve hibernasyon biyolojisi ve fizyolojisinde rol alan faktörlerin daha iyi anlaşılabilmesi için çok sayıda çalışma yapılmıştır.

#### **2.1.1.1. Hibernasyon ve nöroproteksiyon**

Hibernant olmayan türler, hibernasyona yönelik fizyolojik parametrelerdeki aşırı değişimleri tolere edemezler. Hibernasyon, özellikle beyin dokusunda ciddi anlamda azalan kan akımı ve oksijen miktarı göz önüne alındığında, ötermik ve non-hibernant hayvanlarda dakikalar içinde sinir ölümü ve beyin hasarı yaratacak koşullara karşı doğal bir adaptasyon oluşturur (6, 28, 123).

Bu nöroprotektif adaptasyon mekanizmalarının insanlarda iskemi-reperfüzyon, travmatik beyin yaralanmaları ve nörodejeneratif hastalıklar gibi durumlarda tedaviye yönelik etkileri olabileceği düşünülmektedir (28).

Zhou ve ark. (128) yer sincapları ile yaptıkları çalışmada, hibernasyondaki ve aktif durumdaki gruplar arasında mikrodializ problemlerinin penetrasyonu ile beyinde oluşturulan travmatik beyin hasarına verilen yangısal cevabı karşılaştırmışlardır. Hibernasyondaki hayvanlarda yangısal cevabın önemli ölçüde azaldığını bulgulamışlar ve hibernasyonun travmatik beyin hasarlarında nöroprotektif olduğunu belirtmişlerdir.

Hibernasyonun nöroprotektif etkisi, oluşan ileri düzeyde hipotermi, şiddetli lökositopeni, artan antioksidan savunma, azalan protein sentezi, oluşan hipokoagulyasyon ve metabolik baskılanmanın additif ve sinerjik etkilerinin sonucudur (28, 128).

#### **2.1.1.1.1. Hipotermi**

Hipotermi merkezi sinir sistemi dokularında hücrel hasarı sınırlamak için kullanılan en eski tedavi yöntemlerinden biridir. Isıdaki küçük bir azalma bile iskemi ve travmatik beyin yaralanmasından kaynaklanan sinirsel hasarı azaltır (11, 66). Bununla birlikte hafif bir hipotermi ancak sınırlı bir sinirsel koruma sağlar. Frerichs ve Hallenbeck (35) yaptıkları çalışmada hibernasyondaki yer sincaplarının beyin dokusunun, şiddetli hipotermik durumda (7 °C) hipoksi ve hipoglisemiye önemli ölçüde toleranslı olduğunu bulmuşlardır ve bunun nöroprotektif özelliğine dikkat çekmişlerdir. Ancak şiddetli bir hipotermi hibernant olmayan türlerce tolere edilemez ve doku hasarına yol açabilir (116). Hibernant olmayan türlerde soğuğa toleransı arttıracak yöntemler hipotermi tedavisel yararlılığını arttırmak için kullanılabilir (28).

#### **2.1.1.1.2. İmmun düzenleme**

İnme, travmatik beyin yaralanmaları ve nörodejeneratif hastalıklara eşlik eden immün aktivasyon ve yangısal reaksiyonlar nöronların ilerleyen dejenerasyonuna katkı sağlar (26). Lökosit infiltrasyonu, oksijen radikalleri oluşumuna ve proteolitik enzimlerin salınımına neden olarak ve kan akımına fiziksel engel oluşturarak doku hasarını artırır (45). Lökositopeni de hipotermi gibi hibernasyonun en önemli özelliklerinden biridir (62) ve diğer bir potansiyel nöroprotektif adaptasyondur (28). Arktik yer sincaplarında hibernasyon esnasında lökosit sayısı normalin % 1 'ine kadar azalabilir (102, 128). Azalma tüm hücre tiplerinde görülür ve formül lökosit açısından önemli bir değişiklik gözlenmez (128, 36). Uyanma ile birlikte azalan lökosit sayısı hızla ötermik düzeylere döner (62).

#### **2.1.1.1.3. Antioksidan savunma**

Oksidatif stres, serbest radikal oluşumu ile hücrel antioksidan savunma arasındaki dengesizliktir ve lipid, protein, nükleik asit gibi biomoleküllerin oksidasyonuna yol açar (28, 29). Bu durum kronik nörodejeneratif hastalıklar, iskemi-

reperfüzyon ve travmatik beyin hasarlarındaki sinir hücresi ölümleriyle yakından ilgilidir (15, 21, 60, 87). İskemi ya da travmatik beyin hasarı sonrasında serbest radikallerin oluşumu endojen antioksidanların tükenmesi ile ilişkilidir (63, 92). Hibernant hayvanlar plazma ve serebrospinal sıvıdaki 3-5 kata varan askorbik asit (Vitamin C) artışı sayesinde, sık sık periyodik olarak uyanmanın ve yeniden ısınmanın yarattığı şiddetli oksidatif stresten korunurlar (27, 29, 102). Uyanma sırasında, dokularda oksijen tüketiminin maksimuma ulaştığı ve serbest radikallerin (reaktif oksijen türleri) en üst düzeyde olduğu durumda, plazma ve sereberospinal sıvıdaki askorbik asit miktarı giderek azalır ve ötermik hayvanlardaki düzeylere düşer. Bunun nedeni suda çözünen bir molekül olan askorbatın bir antioksidan ve serbest radikal temizleyici ajan olarak dokulara penetre olmasıdır. Bu veri, güçlü bir antioksidan ve nöroprotektif madde olan askorbik asidin dokuları hibernasyondan uyanma esnasındaki oksidatif stresten koruduğunun bir göstergesidir (28, 29). Hibernasyonda, özellikle uyanma sırasında metabolik aktivitenin yoğun olduğu interskapular kahverengi yağ dokuda askorbik asidin yanı sıra süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) düzeyleri de artar (12). Artan antioksidan savunma sayesinde hibernasyondaki bir hayvanın sinir dokusunda ötermik hayvandakiyle aynı derecede bir hasar yaratmak için çok daha şiddetli bir etki gereklidir. Tüm bu veriler hibernasyon esnasında artan antioksidan savunmanın hibernasyon fizyolojisinin önemli nöroprotektif bileşenlerinden biri olduğuna işaret eder (28, 29).

#### **2.1.1.1.4. Hipokoagulasyon**

Beyinde kan akımının bozulmasıyla şekillenen kan pulcuğu aktivasyonu, adezyonu, agregasyonu ve fibrin oluşumu lökositlerin de olaya dahil olmasıyla mikrovasküler perfüzyonu zayıflatarak iskemik beyin hasarında önemli rol oynar (25, 28). Bu nedenle trombolitik ilaçlar, akut iskemik inme durumlarında potansiyel terapötik ajanlar olarak dikkat çekmiştir (53). Hibernasyon esnasında diğer potansiyel nöroprotektif adaptasyonlara uyumlu olarak pıhtılaşma süreleri de önemli ölçüde artar (100). Pıhtılaşma süresinin 5-6 kat artmasının yanı sıra pıhtı oluştuğunda, kalitesinin çok düşük ve dayanıklılığının çok az olduğu gözlenmiştir. Pıhtılaşma süresinin uzaması

hibernasyon esnasında kan akımı çok azaldığında trombus oluşumu riskini açıkça azaltmaktadır (28).

Pıhtılaşma süresinin uzamasından sorumlu mekanizmalar türler arasında farklılıklar gösterebilir. Bazı türlerde hibernasyon esnasında kan pulcukları sayısı % 90 oranında azalırken bazılarında artış gösterebilir (28, 58). Bazı durumlarda kan pulcuğu sayısı değişmezken pıhtılaşma süresi uzayabilir (28). Hibernasyondaki yer sincaplarında faktör VIII ve IX un azalmasına bağlı olarak intrinsik pıhtılaşma mekanizmasının aksadığı uzayan aktive parsiyel tromboplastin zamanı (APTT ) ile ortaya konmuştur (58).

$\alpha$ -2 makroglobulin genel bir proteaz inhibitörüdür (94). Pıhtılaşma zinciri içinde FXII'nin aktivasyonunu engelleyerek kallikreini, FXa'yı ve trombini bağlayarak birçok basamağı inhibe eder (32, 68, 109). Srere ve ark. (96) yaptıkları çalışmada  $\alpha$ -2 makroglobulin'in yer sincaplarında hibernasyon esnasında artış gösterdiğini bulgulamışlardır.  $\alpha$ -2 makroglobulin ekspresyonundaki bu artış pıhtı oluşumunu engelleyerek (96, 97) hibernasyon fizyolojisindeki nöroprotektif adaptasyonlardan biri olan hipokoagulasyona önemli bir katkı sağlar.

#### **2.1.1.1.5. Metabolik baskılanma**

Enerji tüketen işlevlerin zayıflamasıyla karakterize olan metabolik baskılanma hibernasyonun diğer bir önemli özelliğidir. Hibernasyonda vücut ısısının düşmesine eşlik eden metabolik baskılanma sadece termodinamik bir olay değil, hassas bir şekilde ayarlanan metabolik olayların bir sonucudur (13, 28). Beyin travmaları ve nörodejeneratif hastalıklarda beyindeki kan akımının enerji ihtiyacını karşılayamadığı göz önüne alınırsa, hibernasyonun bu yönü nöroproteksiyon açısından oldukça önemlidir (28). Hibernasyon esnasında metabolik hız ötermik düzeylerin % 1'ine kadar düşer (62).



### 2.1.2. Hibernasyonu indükleyici madde (HİM)

Dawe ve Spurrier (23) hibernasyondaki yer sincaplarının (*Citellus tridecemlineatus*) kanını ötermik yer sincaplarına transfer ederek bunlarda yaz aylarında hibernasyon oluşturmuşlardır. Bu çalışma ilk kez hibernant memelilerde doğal hibernasyondan sorumlu bir “tetikleyicinin” kanda taşındığını ve kan transfüzyonu ile aynı türün hibernasyonda olmayan ötermik bireylerine transfer edilerek bunlarda hibernasyon oluşturulabileceğini göstermiştir. Daha sonra hibernasyondaki dağ sıçanından (*Marmota monax*) ötermik yer sincabına (*Citellus tridecemlineatus*) yapılan kan transfüzyonun yer sincabında hibernasyonu indüklediği bulunmuş ve hibernasyon indükleyici maddenin (HİM) türe özel olmadığı gösterilmiştir (24).

HİM molekülleri saflaştırılmamış ve kimyasal yapısı tam olarak belirlenememiş olmakla beraber, plazma albumin fraksiyonlarına bağlı 88 kDa’lık opioid benzeri küçük termolabil bir protein olduğu yönünde bulgular bulunmaktadır (6, 8, 10, 47, 55, 72) .

Bruce ve ark. (9) HİM’ in endojen opioidlerin prekürsörü olduğu ya da bu opioidlerin salınımını uyarak hibernasyonu indüklediğini belirtmişlerdir.

### 2.1.3. DADLE - HİM İlişkisi ve Etkileri

HİM’in hibernant olmayan türler üzerindeki etkilerini inceleyen birçok çalışma yapılmış ve geniş fizyolojik etkilerinin olduğu belirtilmiştir (5, 73). Swan ve Schaette (101) 1976 yılında yaptıkları bir çalışmada hibernasyondaki yer sincaplarından elde ettikleri beyin ekstraktını sıçanlara intravenöz (İV) vererek oksijen tüketimlerinde % 35’lik bir azalma ve vücut ısılarında da 5 °C’lik bir düşme gözlemlemişlerdir. Yapılan çalışmalarda HİM’in primatlarda renal fonksiyonu baskıladığı (73), hipotermi, bradikardi, afaji ve beyin fonksiyonlarında opioid benzeri baskılayıcı etki (71, 75) oluşturduğu bulgulanmıştır.

Hibernasyon sırasındaki fizyolojik değişikliklerin profili opioidler tarafından organizmada oluşturulan etkilere paralellik gösterdiği için hibernasyonun

indüksiyonunda delta opioid reseptörler ve bunların ligandlarının rol oynadığı görüşü ortaya atılmış ve bu görüş iki temel bulguyla desteklenmiştir:

1. HİM'in primatlara intraserebroventriküler uygulanması ile yarattığı davranışsal ve fizyolojik değişiklikler opioid antagonistlerle baskılanmış ya da durdurulmuştur (75).

2. Delta-2 opioid olan D-Ala<sup>2</sup>, D-Leu<sup>5</sup>-Enkephalin (DADLE)'in yazın aktif olan yer sincaplarında hibernasyon oluşturduğu ve bunun doğal HİM ile karşılaştırıldığında aynı oranda etkin olduğu, aynı etkinin kapa ve mü opioid reseptör agonistleriyle oluşmadığı tespit edilmiştir (74).

## 2.2. Opioid Reseptörler, Agonistler (ligandlar) ve Etkileri

Morfin çok eski çağlardan beri medeniyetler tarafından iyileştirici etkileri nedeniyle tıbbi amaçlı olarak kullanılmıştır. Araştırmalar morfin ve morfin benzeri (opioid) maddelerin analjezi, miosis, bardikardi, genel sedasyon, hipotermi, ve depresyon gibi bir çok biyolojik etkisinin varlığını ortaya koymuştur (51). Opioidler etkilerini MSS ve diğer dokularda bulunan membran reseptörleri aracılığı ile oluştururlar. Bu reseptörler MSS'de yaygın ama düzensiz bir dağılım gösterirler; limbik sistem ve omurilikte yüksek yoğunlukta bulunurlar ve karmaşık bir endojen nörotransmitter sistemi ile etkileşim içindedirler. (52, 54).

1972 yılında ilk olarak memeli beyinde opioid reseptörlerinin varlığı bulunduğundan sonra (81, 82, 93), 1975 yılında opioid reseptörlerle etkileşime giren morfin benzeri endojen bir maddenin varlığı tespit edilmiş ve enkephalin olarak isimlendirilmiştir (56, 49). Met-enkephalin ve Leu-enkephalin pentapeptidlerinin bulunuşunu takiben yapılan araştırmalar morfin-benzeri aktivite gösteren çok sayıda endojen peptidin varlığını ortaya koymuş ve bunlar opioid peptidler olarak adlandırılmışlardır (108). Bu endojen opioid peptidler enkefalinler, dinorfinler ve endorfinler olarak gruplanırlar (1).

Opioid reseptörleri ile farklı ligandlar kullanılarak yapılan farmakolojik çalışmalar sonucunda dağılımları, bağladıkları ligandlar ve fonksiyonları açısından farklılıklar gösteren üç opioid reseptör tipi ortaya çıkarılmıştır; kappakappa-1, delta-delta ve mü - mü (16, 51, 59, 80). Opioid araştırmaları farklı etkinlik ve reseptör tipleri için farklı afinite ve seçicilik gösteren çok sayıda opioid ligandın belirlenmesini sağlamıştır. Bunların kullanılmasıyla da reseptör alt tiplerinin varlığı ortaya konmuştur. Gözlemlenen farmakolojik farklılıklar esas alınarak bu alt tipler kappakappa1,kappakappa2, kappakappa3, delta1, delta2, mü1, mü2 ve mü3 olarak gruplanmıştır. (51, 103).

Opioid reseptörlerin endojen ya da eksojen ligandlarla aktivasyonu ile analjezi solunum depresyonu, motorik depresyon, öfori, hormon salınımı, gastrointestinal geçişin inhibisyonu, hipotermi, sedasyon, hipotansiyon gibi sonuçlar ortaya çıkar (65, 111). Opioidler ve reseptörleri solunum, termoregülasyon, gastrointestinal motilite gibi otonom fonksiyonları kontrol ederler (54, 57). Genel olarak endokrin olayları düzenleyebilirler (38, 51, 64, 89) ve immün cevabı etkileyebilirler (88).

## **2.2.1. DADLE**

### **2.2.1.1. Kimyasal Yapı ve Genel Özellikleri**

DADLE (D-Ala<sup>2</sup>,D-Leu<sup>5</sup>-Enkephalin; C<sub>29</sub>H<sub>39</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>) delta-opioid reseptörlerde seçici agonistik etkiye sahip, enkefalin analogu, sentetik, stabil bir peptiddir. (41, 42). Sistemik uygulamalarda kan-beyin bariyerini geçebilir (3).

DADLE'nin direkt infüzyonu da HİM'e benzer şekilde, hibernant olmayan hayvanlarda solunum depresyonu, analjezi, hipotansiyon ve kalp atım sayısında azalma gibi hibernasyon benzeri genel etkiler oluşturur (5, 46).

### 2.2.1.2. Etkileri ve Olası Klinik Kullanım Alanları

Hibernasyondaki hayvanlarda aylar boyunca hipoksik koşullarda kalan organların hibernasyondan uyanma sonrası herhangi bir iskemi reperfüzyon hasarı göstermemeleri, bu hayvanların sifıra yakın vücut ısılarını ve hayati organlarda önemli düzeyde azalan kan akımını tolere edebilmeleri, DADLE ve HİM 'in hibernasyonu indüklemenin yanı sıra organların hayatta kalmalarını da destekledikleri ve koruyucu özelliklerinin bulunduğu olasılığını akla getirmiş ve bu alanda yapılan birçok çalışma ile bu koruyucu etkiler doğrulanmıştır.

DADLE'nin genel doku koruyucu etkilerinde serbest radikal oluşumunu engelleyici ve lipid peroksidasyonunu azaltıcı özelliğinin büyük önemi bulunmaktadır (98, 105).

#### 2.2.1.2.1. İskemi-reperfüzyon

DADLE'nin non-hibernant hayvanlara ait karaciğer (121), kalp (90), jejunum (107), ve akciğer (119) gibi organlarda iskemik toleransı artırdığı belirlenmiştir.

Yamanouchi ve ark. (121) yaptıkları çalışmada DADLE 'nin karaciğerde normotermik iskemi-reperfüzyon hasarına etkisini incelemişlerdir. İV olarak 5 mg/kg dozunda DADLE uygulanan sıçanlarda hepatik arter ve portal venlerde kan akımını engelleyerek iskemi oluşturmuşlardır. 45 dak. sonra kan akımını yeniden sağlayarak organı reperfüze etmişler ve sonrasında aldıkları serum ve karaciğer dokusu örneklerini iskemi-reperfüzyon hasarı yönünden incelemişlerdir. DADLE uygulanan hayvanlarda serum GPT değerleri ve karaciğer dokusunda lipid peroksidasyonu ve oksidatif stresin göstergesi olan malondialdehid (MDA) değerlerinin kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli ölçüde düşük olduğunu bulmuşlardır. Sonuç olarak DADLE ile yapılan ön tedavinin hepatositler için iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruyucu olduğunu ve bu etkiden DADLE'nin antioksidatif özelliğinin sorumlu olabileceğini belirtmişlerdir.

Summers ve ark. (99) DADLE' nin iskemik durumlardaki koruyucu etkisinden yola çıkarak, aynı koruyucu etkinin varlığını genel bir iskemik durum olan hemodinamik şok için incelemişlerdir. Çalışmada kullanılan sıçanlarda, femoral arterlerine yerleştirilen kateterler yoluyla kontrollü olarak kan alınarak, deneysel bir hemoraji oluşturulmuş, deney grubuna kanamadan 20 dak. önce DADLE uygulanmıştır (1 mg/kg, İV). Hayvanlar deney boyunca monitörize edilmiştir. 3,5 saatlik deney sonunda DADLE verilmeyen kontrol grubundaki hayvanlardan hiç biri hayatta kalmazken (ortalama ölüm süresi 57 dak.), kanama öncesi sistemik DADLE uygulanan grupta % 50 lik hayatta kalma oranı (ortalama ölüm süresi 163 dak.) bulgulanmıştır. Şiddetli hemorajik şokta DADLE uygulamasının hemodinamik stabiliteyi artırdığı ve hayatta kalma süresini önemli ölçüde uzattığı sonucunu elde eden araştırmacılar sonuç olarak DADLE ile yapılacak fizyolojik manipülasyonun şok durumunda hayatta kalmayı arttırmak ve morbiditeyi düşürmek için bir yöntem olabileceğini bildirmişlerdir.

Tubbs ve ark. (107) izole edilmiş jejunumda *in vitro* olarak iskemi-reperfüzyon oluşturmuş ve DADLE ile ön tedavinin iskemik toleransı arttırdığını bildirmişlerdir.

#### **2.2.1.2.2. Organ transplantasyonu**

HİM, organ transplantasyonu öncesi multiorgan prezervasyon preparatlarına venalar yoluyla enjekte edildiğinde organların hayatta kalma süresini 8 saatten 44 saate kadar uzatabilmektedir (18), bu prezervasyon preparatına DADLE uygulandığında süre 46 saate çıkmaktadır ki, bu da kalp ve akciğer için tarihteki en uzun korunum süresidir (17).

#### **2.2.1.2.3. Kardiyoproteksiyon**

Memelilerde hibernasyon biyolojisi, insanlarda kalp operasyonlarında kullanılan ve miyokardiyal koruma sağlayan hipotermik global iskemide görülen değişmiş kalp hücresi fizyolojisi ile yakın paralellik gösterir. Bununla birlikte bu değişimler hibernant hayvanlar tarafından aylarca tolere edilebilirken insanda bu süre 4–6 saattir (5). Bolling

ve ark. (5) bu paralellikten yola çıkarak izole edilmiş tavşan kalbi üzerinde yaptıkları çalışmada HİM ve DADLE ile yapılan ön tedavinin iskemi sonrası miyokardiyal metabolizma ve fonksiyonlarda gelişme sağladığını bulgulamışlar ve bunun klinik uygulamalarda kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

#### 2.2.1.2.4. Gastroproteksiyon

Gyires ve ark. (39) sıçanlarda intraserebroventriküler olarak uygulanan DADLE'nin etanol ve indometazin tarafından oluşturulan gastrik mukozal hasarı engellediğini bulgulamışlardır. DADLE aside bağlı (indometazin ülseri) ve aside bağlı olmayan (etanol ülseri) ülser modellerinde gastroprotektif olarak etkili bulunmuştur.

#### 2.2.1.2.5. Nöroproteksiyon

Zhou ve ark. (128) hibernasyonun serebral iskemi toleransı için doğal bir model oluşturmasından yola çıkarak yaptıkları çalışmada, hibernasyondaki yer sincaplarının ötermik olanlarla karşılaştırıldığında travmatik beyin yaralanmalarına karşı bir toleransa sahip olduğunu bulgulamış ve hibernasyonun nöroprotektif olduğunu belirtmişlerdir. Bu konuya paralel olarak, yapılan birçok çalışmada hibernasyonu indükleyen DADLE'nin nöroproteksiyona yönelik etkileri incelenmiştir.

Parkinson hastalığı nigrostriatal dopaminerjik sistemin nörodejeneratif bir hastalığıdır ve metamfetamin tarafından oluşturulan dopaminerjik terminal hasarı Parkinson hastalığı için bir model olarak önerilmiştir (105, 112). Tsao ve arkadaşları 1998 yılında (105) yaptıkları bir çalışmada İP olarak uygulanan (2-4 mk/kg) DADLE'nin merkezi sinir sisteminde dopaminerjik nöronlarda metamfetamin'in oluşturduğu hasara karşı koruyucu olduğunu bulgulamışlardır. DADLE nin bu koruyucu etkisini bir agonist olarak delta-opioid reseptörleri aktive etmesinin yanı sıra *in vitro* olarak da antioksidatif bir ajan olarak rol oynamasına bağlamış ve DADLE'nin Parkinson hastalarının tedavisinde L-Dopa ile kombine olarak kullanım alanı bulabileceğini belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar (104), 1999 yılında yaptıkları çalışmada

Metamfetaminin uygulanmasından iki hafta sonra tek doz halinde (18 mg/kg, İP) verilen DADLE'nin azalmış olan dopamin taşıyıcısı miktarını normal düzeye getirdiğini yani metamfetamin tarafından oluşturulan sinirsel hasarı geri dönüştürebildiğini bulgulamışlardır.

Glutamat nörotoksitesi, hipoksi, iskemi, hipoglisemi, epilepsi, travma ya da benzer nedenlerle gerçekleşen sinir hücresi kaybının patogeneğinde önemli rol oynar (19, 20). Zhang ve arkadaşları (127) delta-opioid reseptörlerin DADLE ile aktivasyonunun sinir hücrelerinde glutamatın neden olduğu hasarı azalttığını, bir delta-opioid reseptör antagonisti olan Naltrindol'un DADLE nin bu koruyucu etkisini bloke ettiğini ve aynı koruyucu etkinin kappa ve mu reseptör agonistleri tarafından gösterilmediğini belirlemişlerdir. Yine Zhang ve ark. 2002 yılında yaptıkları bir *in vitro* çalışma sonrası DADLE ile delta opioid reseptör aktivasyonunun normoksik ve hipoksik koşullarda nöroproteksiyon açısından çok önemli bir rol oynadığını belirtmişlerdir (126).

Hayashi ve Su (43) yaptıkları çalışmada kronik DADLE uygulamasının (8 gün boyunca 16 mg/kg) farelerde beyindeki sinir büyüme faktörünü (SBF) arttırdığını bulgulamışlar ve SBF'nin beyindeki nöroprotektif özelliğine dayanarak DADLE' nin nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde önemli bir klinik uygulama alanı bulabileceği görüşünü bildirmişlerdir.

Apoptozis ya da programlı hücre ölümü, kanser oluşumu ve nörodejenerasyonla yakından ilgilidir. Sitosolden mitokondriye Bax translokasyonu ve bunun sonucunda mitokondriden sitokrom c salınımı tip II apoptoziste çok önemli basamaklardır (122). Tsao ve (106) yaptıkları çalışmada DADLE'nin Bax'la ilgili kritik apoptotik basamakları bloke ettiğini bulgulamışlardır.

## BÖLÜM 3. GEREÇ ve YÖNTEM

### 3.1. Gereç

Araştırma, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yürütüldü.

Araştırmada 48 adet genç erkek Wistar albino sıçan kullanıldı (ortalama ağırlık: 250,09 ±24,59). Sıçanlar İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı 'ndan sağlandı.

Sıçanlar deneysel süreç boyunca İ.Ü. Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı bünyesinde oluşturulan deney hayvanları odasında barındırıldı.

Deney hayvanları odasında ışıklandırma sistemine bağlanan zamanlayıcı 12/12 saat aydınlık/karanlık periyodu uygulanacak şekilde ayarlandı. Yine bir zamanlayıcı aracılığı ile periyodik olarak çalıştırılan iki adet fan ile odanın havalandırması sağlandı. Deney boyunca odanın nem ve ısı değeri kaydedildi. (ortalama ısı: 25,3 °C; ortalama nem: % 66,5)

Sıçanlar 28x40x16 ebatlarında üzerleri tel ızgaralı plastik bireysel kafeslerde bakıldı. Altlık olarak yonga talaş kullanıldı. Beslemede ticari pelet sıçan yemi kullanıldı ve peletler ızgara üzerine konularak, su ise 330 ml'lik çelik bilyeli ticari kemirgen sulukları (IMAC-Biber) ile *ad libitum* olarak verildi.

Hayvan materyali dışındaki gereçler ilgili yöntemlerin başlığı altında verilmektedir.



### 3.2. Yöntem

Araştırmada kullanılan sıçanlar kontrol ve deneme olmak üzere 24'erli iki gruba ayrıldı. Hayvanlar deneysel çalışmadan bir hafta önce deney odasına alınarak ortama adaptasyonları sağlandı. Bireysel kafesler çelik raflara gruplara göre dizilerek kontrol grubu tek, deneme grubu çift numaralar alacak şekilde numaralandırıldı. Gerek adaptasyon, gerekse deneme süresi içinde hayvanların vücut ısıları dijital termometre ile günlük olarak ölçüldü ve kaydedildi.

Deneysel çalışmanın ilk gününde deney grubu hayvanlara DADLE, kontrol grubuna ise serum fizyolojik içeren ozmotik mini pompalar interscapular bölgeye implante edildi.

28 günlük deney aşaması süresince deneme grubu sıçanlar deri altı yolla ozmotik pompaların pompalama hızına bağlı olarak saatte 2,5 µl % 0,5'lik DADLE çözeltisi aldılar.

Deneme süresi sonunda kardiyak ponksiyonla alınan kan örnekleri ve beyin dokudan alınan örneklerde Tablo 1.'deki analizler yapıldı.

**Tablo 1.** Elde edilen örnekler ve araştırılan parametreler:

<b>Örnek</b>	<b>Parametre</b>
Antikoagulansız kan	Pıhtılaşma süresi
% 3,8'lik sodyum sitratlı kan plazması	Aktive parsiyel tromboplastin zamanı (APTT)
	Protrombin Zamanı (PT)
	Trombin zamanı (TT)
Heparinli tam kan	Akyuvar sayısı
Heparinli kan plazması	Askorbik asit
	Malondialdehid (MDA)
	Total antioksidan düzeyi (TAD)
Beyin doku homojenizati	Malondialdehid (MDA)
	Total antioksidan düzeyi (TAD)

### 3.2.1. Ozmotik pompa implantasyonu

#### 3.2.1.1 Kullanılan araç ve malzemeler

- Ozmotik mini pompa (2ML4, Durect – Alzet)
- Hassas terazi (Precisa, 1620D)
- Dijital termometre (Kruuse)
- Steril yumuşak doku operasyon seti
- Steril serviyet bezi
- Steril eldiven
- Cerrahi dikiş ipliği (ipek - 2/0)
- Enjektör (2 ml)

#### 3.2.1.2. Ozmotik pompa

Ozmotik pompalar fare, sıçan ve diğer laboratuvar hayvanlarında yapılan araştırmalar için dizayn edilmiş implante edilebilir minyatür pompalardır. Uygulanacak kimyasal ajanları pompanın tipine göre saatte 0,25 -10 µl arasında değişen kontrollü hızlarda bir günden dört haftaya kadar değişen süreler boyunca infüze edebilirler. Deri altı ya da periton içi implante edilerek sistemik uygulamalar için kullanılabilirler gibi bir kateter aracılığıyla intravenöz, intraarteryel ya da herhangi bir hedef organa infüzyon amacıyla da kullanılabilirler.



Şekil 1. Ozmotik pompanın yapısı

Pompalar ozmotik yer değiştirme esasına göre çalışırlar. İ içe geçmiş  silindirden oluşurlar. En dış tabaka selülozik yapıda yarı geçirgen bir zardır. Bu silindirin içinde, en iteki geçirgen olmayan rezervuarı çevreleyen aşırı doygun bir tuz çözeltisi (ozmotik tabaka) vardır. En içte bulunan rezervuar deney hayvanına uygulanacak madde ile doldurulur. Pompa implante edildiğinde dokulararası sıvı, pompada bulunan tuz çözeltisi ile arasındaki ozmotik fark nedeniyle yarı geçirgen membranı geçerek pompaya girmeye başlar. Bu sıvı tuz tabakasının genleşmesine neden olarak en iteki esnek test maddesi rezervuarına baskı yapar. Bu baskı sonucu test maddesi akış moderatörü yoluyla pompa dışına itilir. En dış membran sert bir yapıda olduğu ve genleşemediği için dokulararası sıvının pompaya giriş hızı ile pompaya doldurulmuş olan test maddesinin dışarıya pompalanma hızları aynıdır.

### 3.2.1.3. Pompaların doldurulması

İmplantasyon ncesi pompalara doldurulacak olan DADLE zeltisi 5 mg/ml konsantrasyonunda (% 0,5) hazırlandı. İkişer ml hacimli 24 adet ozmotik pompa için 240 mg DADLE 48 ml steril distile su içinde çözdürüldü. Steril koşullarda, 24 adet pompaya, hazırlanan % 0,5 'lik DADLE zeltisi, diğer 24'ne de serum fizyolojik dolduruldu.

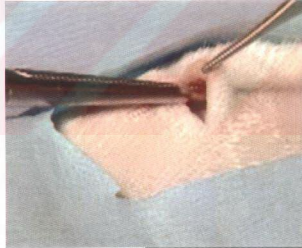
Steril ortam sağlandıktan sonra oda ısısındaki DADLE zeltisi ve serum fizyolojik hava kabarcığı kalmamasına zen gösterilerek enjektöre çekildi. Enjektörün ucuna kt uçlu doldurma kanülü takıldı ve kanül dik olarak tutulan pompa içine st kısımdaki açıklıktan ucu pompanın dip kısmına ulaşacak Şekilde ilerletildi. Enjektördeki sıvı yavaşça pompaya enjekte edildi. Kanül çıkarıldıktan sonra aynı açıklıktan akış moderatörü üzerindeki kapak pompaya temas edecek Şekilde yerleştirildi. Akış moderatörünün yerleştirilmesiyle pompanın ucunda oluşan sıvı damlası silindi.

### 3.2.1.4. Anestezi ve operasyon

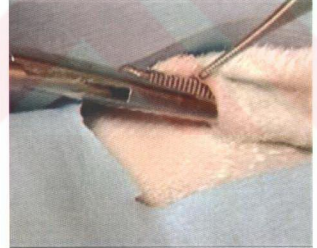
Operasyon öncesi tartılan ve vücut ağırlıkları not edilen sıçanlara ketamin/xylazin anestezisi uygulandı. Anestezi için ketamin 75 mg/kg, xylazin ise 10 mg/kg dozunda aynı enjektöre çekilerek intramusküler olarak uygulandı. İnterskapular bölge traş ve dezenfekte edilerek operasyon için hazırlandı.

Operasyon için kullanılacak alet, malzeme ve operasyon alanının sterilizasyonu sağlandı. Anesteziye giren sıçanlar operasyon örtüsü üzerine yüz üstü yatırıldı. Makasla interskapuler bölgede deri üzerine yaklaşık 1 cm genişliğinde sagittal bir kesik yapıldı. Yapılan kesitten sokulan bir hemostatik pensle deri altı bağ doku kaudale doğru küt olarak diseke edilerek pompanın sığabileceği bir cep oluşturuldu. Pompalar akış moderatörünün bulunduğu uç kaudale gelecek şekilde, açılan cep içine yerleştirildi. Operasyon yarası ipek iplik kullanılarak basit ayrı dikişler ile kapatıldı. Operasyon sonrası hayvanlar bireysel kafesler içinde ayılmaları için hazırlanmış olan ısıtılmış odaya alınarak vücut ısıları takip edildi. Anesteziden çıkan ve vücut ısıları normale dönen sıçanlar deney odasına alındı.

*Şekil 2. a, b.  
Deri altında  
ozmotik  
pompların  
yerleştirileceği  
cebin  
oluşturulması.*

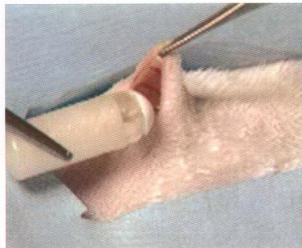


*Şekil 2. a*

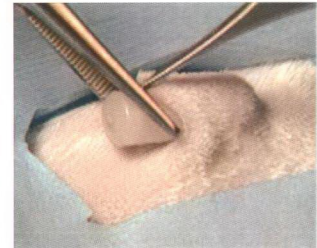


*Şekil 2. b*

*Şekil 3. a, b.  
Ozmotik  
pompların  
oluşturulan  
cebe  
yerleştirilmesi.*



*Şekil 3. a*



*Şekil 3. b*

### 3.2.2. Kan örneklerinin alınması

#### 3.2.2.1. Kullanılan araç ve malzemeler

- Soğutmalı santrifüj (Medifriger BL, JP Selecta)
- Üç parçalı, tek kullanımlık plastik enjektör; 2 ve 10 ml.
- Antikoagülsüz kapiller tüp.
- Deney tüpü; EDTA'lı ve kuru.
- Sodyum sitrat; %3,8
- Heparin çözeltisi; 7500 U/ml

#### 3.2.2.2. Yöntem

Kullanılacak tüm tüpler ve enjektörler önceden numaralandırılarak hazırlandı.

Anestezi altındaki hayvanlar önceden numaralanmış plastik tablalar üzerine sırt üstü yatırılıp kollarından bantlanmak suretiyle sabitlendiler. Kardiyak ponksiyon için enjektörle mediandan sfenoid kırıkdağın altından girilerek kanül hayvanın sol omzuna doğru yönlendirildi. APTT, PT ve TT değerlerinin belirlenmesinde kullanılacak kan, önceden 0,2 ml % 3,8'lik sodyum sitrat çekilerek hazırlanmış olan 2 ml'lik enjektörlere (sodyum sitrat / kan oranı; 1 / 9) alındı. 2 ml'lik hacmin dolmasından sonra enjektör kanülden ayrıldı ve pıhtılaşma sürelerinin belirlenmesi için her hayvan için iki adet antikoagülsüz kapiller tüp dolduruldu. Sonrasında kanüle takılan heparin ile kaplanmış 10 ml'lik enjektörlere kan alındı.

Heparinli kanın 0,5 ml'si akyuvar sayıları belirlenmek üzere ayrı bir tüpe alındı. Kalan kan santrifüje edilerek askorbik asit, MDA ve total antioksidan (TAD) değerlerinin belirlenmesi için plazmaları ayrıldı. Sodyum sitratlı kanlar santrifüje edildi (3500 devir/dak., 15 dk.), APTT, PT ve TT değerlerinin belirlenmesi için plazmaları ayrıldı.

### 3.2.3. Beyin doku örneklerinin alınması ve homojenizasyon

#### 3.2.3.1. Kullanılan araç ve malzemeler

- Soğutmalı santrifüj (Medifriger BL, JP Selecta)
- Derin dondurucu (Arçelik)
- Homojenizatör (Ultra Turrax – IKA)
- Dijital büret (Isolab- Digitrat 50ml)
- Hassas terazi (Precisa – 125ASCS)
- pH-metre (Hanna Instruments – HI 9321)
- Plastik kapaklı tüp (Eppendorf)
- Buz, buz aküsü, termos
- Saat camı
- Makas, dişli penset, bistüri ucu
- Tampon çözelti (140 mM KCl içeren 20 mM Tris-HCl, pH 7,4)
- 25 ml kapaklı plastik santrifüj tüpü

#### 3.2.3.2 Yöntem

Kan alınarak sakrifiye edilen hayvanlar yüz üstü çevrilerek kafatası üzerindeki deri tabakası uzaklaştırıldı. Eğri uçlu bir otopsi makası ile cranium ile atlas arasındaki bağlantı ayrıldı. Açığa çıkan foramen occipitale magnumdan sokulan makas ile her iki yandan yaklaşık olarak parietal ve temporal kemiklerin birleşim yerine kesikler atıldı. Daha sonra her iki gözün iç açılarını birleştirecek şekilde lakrimal kemiklere atılan bir kesikle kafatasının üst çatısını oluşturan parietal ve frontal kemikler uzaklaştırıldı. Açığa çıkan beyin dokusu bir pensetle kafatası içinden bütün olarak çıkarılarak pH'sı 7,4 olan, 140 mM KCl içeren 20 mM'lık Tris-HCl soğuk tampon çözeltisi içine daldırılarak yıkandı, kurutma kağıdı ile fazla sıvı alındı ve derin dondurucudan çıkarılan bir saat camı üzerine alınarak tartıldı. Ağırlığı not edilen doku buz içinde bekletilen santrifüj tüpü içine konuldu. Üzerine dijital büretle ağırlığının 10 katı oranında soğuk

bir saat camı üzerine alınarak tartıldı. Ağırlığı not edilen doku buz içinde bekletilen santrifüj tüpü içine konuldu. Üzerine dijital büretle ağırlığının 10 katı oranında soğuk tampon çözelti eklendi. Homojenizatör ucu tüpün içine daldırılarak beyin doku homojenize edildi. Homojenizat soğutmalı santrifüj ile 20.000 g ve 4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi. MDA ve TAD değerleri belirlenmek üzere süpernatantlar ayrıldı.

### **3.2.4. Analizler**

#### **3.2.4.1. Koagülasyon parametrelerinin belirlenmesi**

##### **3.2.4.1.1. Kullanılan araç ve malzemeler**

- Koagülometre (KC1 – Amelung)
- APTT, PT ve TT Kitleri (Diagnostica Stago)
  - C.K. Prest 2 (APTT)
  - Neoplastine CI Plus 2 (PT)
  - STA Thrombin 2 (TT)
- Antikoagülsüz kapiller tüpler
- Kronometre
- Otomatik pipet (100, 200 µl)
- Çelik bilye
- 0,025 M CaCl çözeltisi



#### **3.2.4.1.2. Pıhtılaşma süresinin belirlenmesi**

Pıhtılaşma süreleri kapillar tüp yöntemi (22) ile belirlendi. Her hayvan için iki adet antikoagülsüz kapiller tüpe kan dolduruldu. İki dakikalık bekleme süresinden sonra kapiller tüpün bir ucuna yakın kısmında cam testeresi ile bir çentik oluşturuldu. Bu noktadan kırılan tüpün her iki parçası arasında fibrin iplikçiklerinin varlığı kontrol edildi. Aynı işleme fibrin oluşumu görülene kadar 30'ar saniye aralıklarla devam edildi. İplikçikler görüldüğünde pıhtılaşma süresi not edildi.

#### **3.2.4.1.3. Aktive Parsiyel Tromboplastin Süresinin (APTT) belirlenmesi**

Test kitinin içinde bulunan reaktif 2'nin tamamı reaktif 1'e eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi ve hafifçe çalkalanarak homojen hale getirildi.

Koagulometre çalıştırılarak 37 °C'ye ulaşması beklendi. 0,1 ml Plazma koagulometredeki plastik tüpe pipetlendi ve tüpün içine çelik bilye atıldı. Plazmanın üzerine 0,1 ml reaktif eklendi ve 37 °C'de 3 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüpe, kronometre aktif hale getirilerek 0,1 ml 0,025 M CaCl<sub>2</sub> pipetlendi. Pıhtının oluşmasıyla birlikte otomatik olarak duran kronometredeki zaman değeri okunarak not edildi.

#### **3.2.4.1.4. Protrombin Süresinin (PT) belirlenmesi**

Test kitinin içinde bulunan reaktif 2'nin tamamı reaktif 1'e eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi ve hafifçe çalkalanarak homojen hale getirildi.

Koagulometre çalıştırılarak 37 °C'ye ulaşması beklendi. 0,1 ml Plazma koagulometredeki plastik tüpe pipetlendi ve tüpün içine çelik bilye atıldı ve 37 °C'de 2 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüpe, kronometre aktif hale getirilerek 0,1 ml reaktif pipetlendi. Pıhtının oluşmasıyla birlikte otomatik olarak duran kronometredeki zaman değeri okunarak not edildi.

#### **3.2.4.1.5. Trombin süresinin (TT) belirlenmesi**

Test kitinin içinde bulunan reaktif 2 ml distile su ile sulandırıldı. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi ve baloncuk oluşmamasına dikkat edilerek hafifçe çalkalanarak homojen hale getirildi.

Koagulometre çalıştırılarak 37 °C'ye ulaşması beklendi. 0,2 ml Plazma koagulometredeki plastik tüpe pipetlendi ve tüpün içine çelik bilye atıldı ve 37 °C'de 2 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüpe, kronometre aktif hale getirilerek 0,2 ml reaktif pipetlendi. Pıhtının oluşmasıyla birlikte otomatik olarak duran kronometredeki zaman değeri okunarak not edildi.

#### **3.2.4.2. Lökosit sayımı**

Lökosit sayıları elektronik impedans esasına dayalı olarak otomatik kan sayım cihazı (Medonic 570) kullanılarak belirlendi.

#### **3.2.4.3. Total antioksidan düzeyi (TAD) 'nin belirlenmesi**

Beyin doku ve plazmada total antioksidan düzeyleri (TAD) Erel (30, 31) tarafından geliştirilen kitler kullanılarak otoanalizörde (Aeroset – Abbott) belirlenmiştir.

#### **3.2.4.4. Beyin dokuda protein miktarı tayini**

Beyin dokuda protein miktarı Lowry (61)'nin yöntemine göre belirlenmiş ve beyin dokudaki MDA ve TAD miktarları belirtilirken protein miktarına oranlanmıştır.

### 3.2.4.5. Malondialdehit (MDA) miktarının belirlenmesi

#### 3.2.4.5.1. Kullanılan araç ve malzemeler

- Santrifüj (Heraeus, Labofuge 400)
- Su banyosu (Nüve – BM600 )
- Spektrofotometre (Shimadzu, UV 1201)
- Hassas terazi (Precisa – 125ASCS)
- Vorteks karıştırıcı (IKA-MS2)
- Isıtıcıly manyetik karıştırıcı (Elektromag – M221, M22)
- Ayarlanabilir otomatik pipet (100-1000 µl; 1-5 ml)
- Dispenser (2-10 ml)
- Vidalı kapaklı cam deney tüpü
- Balon joje
- Tüp sporu

#### 3.2.4.5.2. Kullanılan kimyasal maddeler

- Trikloroasetik asit (Riedel-de Haën,  $C_2HCl_3O_2$ , Katalog No.27242)
- 2-Tiyobarbitürik asit (Fluka,  $C_4H_4N_2O_2S$ , Katalog No: 88481)
- 1,1,3,3-Tetraetoksipropan (Fluka,  $C_{11}H_{24}O_4$ , Katalog No: 86570)
- n-Butanol (Riedel-de Haën,  $C_4H_{10}O$ , Katalog No: 34931)
- Etanol (Riedel-de Haën,  $C_2H_6O$ , Katalog No: 32221)

### 3.2.4.5.3. Kullanılan solüsyonlar ve hazırlanışları

- **Triklorasetik asit solüsyonu: (%20) (TCA):**

200 g Triklorasetik asit tridistile suda çözülerek 1 litreye tamamlandı.

- **Tiyobarbitürik asit solüsyonu (% 0,67) (TBA):**

1,675 g Tiyobarbitürik asit tridistile suda çözülerek 250 ml'ye tamamlandı (buzdolabında saklandı).

- **1.1.3.3.Tetraetoxipropan (TEP) (Standart solüsyon):**

0,494 ml 1.1.3.3.Tetraetoxipropan etanol ile 100 ml'ye tamamlandı. Bu karışımdan 0,1 ml alınarak tridistile su ile 100 ml'ye tamamlandı (20 µmol/l).

### 3.2.4.5.4. Analiz prosedürü

MDA'nın analizi Yoshioka ve ark.'ın (124) geliştirdiği "Tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri" yöntemi ile yapıldı. Analiz için numune sayısı kadar vidalı kapaklı cam deney tüpü numaralanarak kör ve standart tüpleri ile birlikte bir tüp sporuna dizildi. Standart tüpüne 0,5 ml TEP standardı pipetlenirken, deney tüplerine 0,5'er ml numune (plazma / beyin doku homojenizatı) pipetlendi, kör tüpüne ise bir şey konulmadı. Deney ve standart tüplerine 2,5 ml, kör tüpüne ise 3 ml TCA solüsyonu eklendi. Tüm tüplere 1 ml TBA solüsyonu eklendi ve vorteks mikserde karıştırıldı. Tüpler kapakları sıkıca vidalanarak kaynar su banyosunda 30 dak. tutuldu. Süre bitiminde akan su altında soğutularak tüm tüplere dispenser ile 4'er ml n-Butanol eklendi. Tüpler vorteks mikserde karıştırıldı ve 3000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi. Ayrılan butanol tabakası ayrı tüplere alınarak absorbansları spektrofotometrede 535 nm dalga boyunda köre karşı okundu. Absorbanslar aşağıdaki formüle konarak MDA değerleri nmol/ml olarak hesaplandı.

$$\text{MDA } (\eta\text{mol/ml}) = \frac{\text{Örneğin absorbanısı}}{\text{Standartın absorbanısı}} \times 20$$

**Tablo 2.** Malondialdehit (MDA) analiz prosedürü

		<b>Deney</b>	<b>Kör</b>	<b>Standart</b>
1.	Plazma	0,5 ml	-	-
2.	Standart	-	-	0,5 ml
3.	TCA sol	2,5 ml	3 ml	2,5 ml
4.	TBA sol	1 ml		
5.		Vortex		
6.		Su banyosu (100 °C) 30 dk		
7.		Soğutma		
8.	n-Butanol	4 ml		
9.		Vortex		
10.		Santrifüj (3000 rpm, 10 dak.)		
11.		Butanol tabakasının ayrı tüpe alınması		
12.		Köre karşı absorbanısının okunması: $\lambda = 535 \eta\text{m}$		

### 3.2.4.6. Askorbik asit (Vitamin C) miktarının belirlenmesi

#### 3.2.4.6.1. Kullanılan araç ve malzemeler

- Santrifüj (Heraeus, Labofuge 400)
- Su banyosu (Memmert -WB22)
- Spektrofotometre (Shimadzu, UV 1201)
- Hassas terazi (Precisa – 125ASCS)
- Vorteks karıştırıcı (IKA-MS2)
- Isıtıcı manyetik karıştırıcı (Elektromag– M221, M22)
- Ayarlanabilir otomatik pipet (100-1000 µl; 1-5 ml)
- Dispenser (2-10 ml)
- Cam deney tüpü
- Balon joje
- Tüp sporu
- Parafilm

#### 3.2.4.6.2. Kullanılan kimyasal maddeler

- Trikloroasetik asit (Riedel-de Haën,  $C_2HCl_3O_2$ , Katalog No.27242)
- 2,4-Dinitrofenilhidrazin (Fluka,  $C_6H_6N_4O_4$ , Katalog No: 42210)
- Tiyoüre (Riedel-de Haën,  $CH_4N_2S$ , Katalog No: 33717)
- Bakır II sülfat pentahidrat (Riedel-de Haën,  $CuO_4S 5H_2O$ , Katalog No: 12849)
- Sülfürik asit (% 95-98) (Merck,  $H_2SO_4$ , Katalog No: 100713)
- Askorbik asit (Riedel-de Haën,  $C_6 H_8O_6$ , Katalog No: 33034)

### 3.2.4.6.3. Kullanılan solüsyonlar ve hazırlanışları

- **Triklorasetik asit solüsyonu: (%6) (TCA):**

60 g Triklorasetik asit distile suda çözülerek 1 litreye tamamlandı.

- **2,4-Dinitrofenilhidrazin ayracı:**

2 g kristal madde 100 ml 4,5 M sülfürik asit içinde çözdürüldü, filtre kâğıdından geçirildi.

- **Tiyöüre solüsyonu (%5):**

5 g Tiyöüre bir miktar distile suda çözülerek 100 ml'ye tamamlandı.

(buzdolabında saklandı)

- **Bakırsülfat solüsyonu:**

0,94 g bakırsülfat bir miktar distile suda çözülerek 100 ml'ye tamamlandı.

- **Renk ayracı:**

20 kısım 2,4-Dinitrofenilhidrazin ayracına 1 kısım bakır sülfat, 1 kısım tiyöüre solüsyonu eklendi.

- **Sülfürik asit:**

- o 4,5 M: 75 ml distile su soğutularak konsantr sülfürik asitle 100 ml'ye tamamlandı.

- o 12 M: 33 ml distile su soğutularak konsantr sülfürik asitle 100 ml'ye tamamlandı.

- **Askorbik asit standart çözeltileri:**

50 mg askorbik asit 50 ml %6 TCA içinde çözdürüldü. Böylelikle 1 mg/ml konsantrasyonunda stok solüsyon elde edildi.

Stok solüsyondan belirli miktarlar alınıp 50 ml'ye tamamlanarak Tablo 3.'deki şekilde dilue edildi ve kalibrasyon eğrisi için gerekli olan solüsyonlar hazırlandı.

**Tablo 3.** Askorbik asit standart solüsyonları için dilüsyon tablosu

	Stok solüsyonu (ml)	Toplam hacim (ml)	Askorbik asit konsantrasyonu ( $\mu\text{g/ml}$ )
1	0,1	50	2
2	0,3	50	6
3	0,5	50	10
4	0,6	50	12
5	0,9	50	18
6	1	50	20
7	1,2	50	24
8	1,8	50	36
9	2	50	40

#### 3.2.4.6.4. Analiz prosedürü

Askorbik asit analizi Haag (40)'ın yöntemine göre yapıldı. Analiz için örnek sayısı kadar santrifüj tüpü numaralanarak bir tüp sporuna dizildi. Tüplere 0,5'er ml plazma ve üzerine 1 ml %6 TCA solüsyonu pipetlendi. Vorteks mikserde karıştırıldıktan sonra 3000 devir/dak. 4° C'de 15 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar numaralanmış yeni tüplere alındı. Deney tüplerinin yanı sıra 0,5 ml % 6 TCA içeren kör tüpü ve askorbik asit stok çözeltisinin hazırlanmış olan dilüsyonlarından 0,5'er ml içeren 9 adet tüp hazırlandı. Tüm tüplere 0,2'şer ml renk ayracı eklendi ve tüpler ağızları parafilmle kapatılarak 38 C'ye ayarlanmış su banyosunda 4 saat inkübe edildiler. İnkübasyon sonunda üzerlerine 1'er ml 12 M sülfürik asit eklenen tüpler vorteks mikserde karıştırıldılar ve absorbansları spektrofotometrede 520 nm dalga boyunda köre karşı okundu.

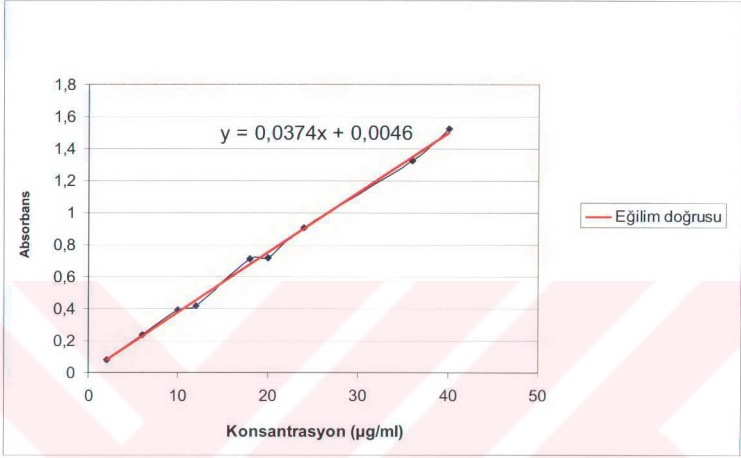


**Tablo 4.** Askorbik asit analiz prosedürü

1		Deney	Kör	Standart
2	Plazma	0,5 ml	-	-
3	% 6 TCA	1 ml	-	-
4	Vorteks		-	-
5	Santrifüj 4°C / 3000 rpm /15 dak.		-	-
6	Süpernatant	0,5 ml	-	-
7	% 6 TCA	-	0,5 ml	-
8	Standart sol.	-	-	0,5 ml
9	Renk ayracı	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
10	Su banyosu (38 °C 4 saat)			
11	12 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1 ml			
12	Vorteks			
13	Köre karşı absorbsanın okunması: $\lambda = 520$ nm			

### 3.2.4.6.5. Sonuçların hesaplanması

Hazırlanmış askorbik asit stok solüsyonundan elde edilen dilüsyonların köre karşı absorbsanları okunarak not edildikten sonra, her dilüsyonun askorbik asit konsantrasyonu ve verdiği absorbsan bir tabloya taşınarak Excel (MS<sup>®</sup> Office 2003) programında bir x-y dağılım grafiği oluşturuldu (Şekil 4.). Oluşturulan grafikteki veri serisi için doğrusal bir eğilim çizgisi eklendi. Bu eğilim doğrusunun denklemi grafik üzerinde gösterildi. Test tüpleri için okunan absorbsanlar elde edilen denkleme konularak her numune için askorbik asit konsantrasyonları hesaplandı.

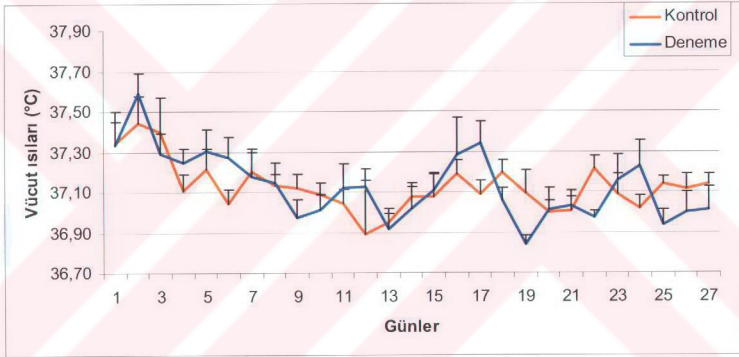


Şekil 4. Askorbik asit analizi kalibrasyon grafiği

## BÖLÜM 4. BULGULAR

### 4.1. Vücut ısıları

Grupların günlük vücut ısı ortalamalarına ait grafik Şekil 5.'de gösterilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark gözlenmemiştir.



Şekil 5. Kontrol ve 28 gün boyunca % 0,5'lik DADLE verilen sıçanların Vücut ısıları Günlük ortalama değerlere ait standart hatalar hata çubukları şeklinde gösterilmiştir.

### 4.2. Koagülasyon parametreleri

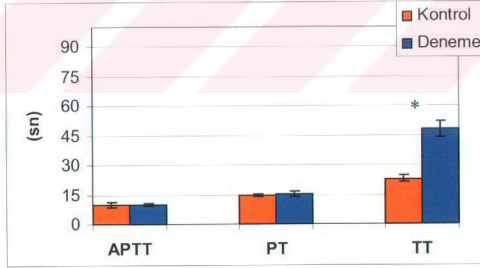
Pıhtılaşma süresi (PS), Aktive parsiyel tromboplastin zamanı (APTT), Protrombin zamanı (PT) ve Trombin zamanı (TT) sonuçları Tablo 5.'de verilmiştir. Trombin zamanı deneme grubunda kontrole oranla uzamıştır ( $p < 0,05$ ). Diğer parametrelerde her iki grup arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark gözlenmemiştir. APTT, PT ve TT değerleri Şekil 6.a'da, PS ise Şekil 6.b' de grafiklerle gösterilmiştir.

**Tablo 5.** Koagulasyon parametreleri

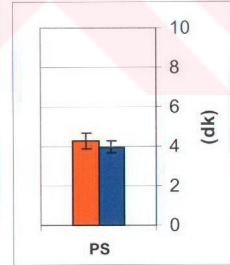
		$\bar{x}$	$\pm$	$S_{\bar{x}}$
<b>APTT</b> <b>(sn)</b>	K	10,00		1,3
	D	10,23		0,7
<b>PT</b> <b>(sn)</b>	K	14,76		0,5
	D	15,27		1,3
<b>TT</b> <b>(sn)</b>	K	22,71		1,7
	D	47,90	*	4,0
<b>PS</b> <b>(dk)</b>	K	4,25		0,4
	D	3,94		0,3

K: kontrol, D: deneme, APTT: aktive parsiyel tromboplastin zamanı, PT: protrombin zamanı, TT: trombin zamanı, PS: pıhtılaşma süresi

\* Kontrol ve deneme gruplarına ait ortalamalar arasındaki farklılıklar istatistiksel düzeyde önemlidir. ( $P < 0,05$ )



**Şekil 6.a.** APTT, PT ve TT değerleri



**Şekil 6.b.** PS değerleri

\* Kontrol ve deneme gruplarına ait ortalamalar arasındaki farklılıklar istatistiksel düzeyde önemlidir. ( $P < 0,05$ )

Ortalama değerlere ait standart hatalar hata çubukları şeklinde gösterilmiştir.

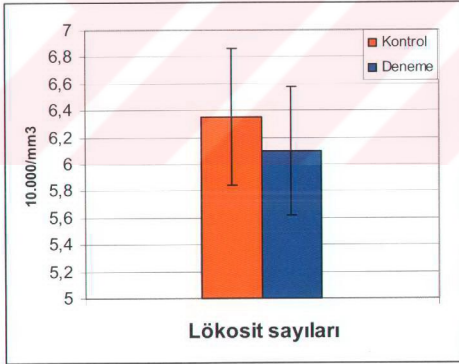
### 4.3. Lökosit sayıları

Lökosit sayıları Tablo 6.'da ve Şekil 7.'de gösterilmektedir. Gruplar arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark gözlenmemiştir.

**Tablo 6.** Lökosit sayıları

		$\bar{x}$	$\pm$	$S_{\bar{x}}$
<b>Lökosit</b> <b>(<math>10^3/\text{mm}^3</math>)</b>	K	6,35		0,51
	D	6,10		0,48

*K: kontrol, D: deneme,*



**Şekil 7.** Lökosit sayıları

*Ortalama değerlere ait standart hatalar hata çubukları şeklinde gösterilmiştir.*

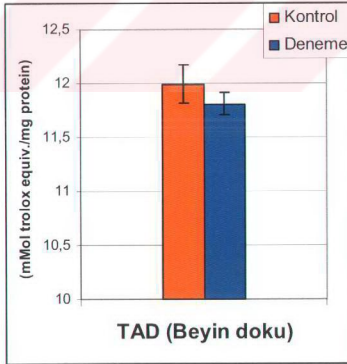
#### 4.4. Total antioksidan düzeyleri (TAD)

Beyin doku ve plazmada belirlenen total antioksidan düzeyleri Tablo 7.'de verilmiştir. Gruplar arasında plazma ve beyin doku total antioksidan düzeyleri açısından istatistiksel önemde bir fark gözlenmemiştir. Değerler ait grafikler Şekil 8.a. ve 8.b.' de gösterilmiştir.

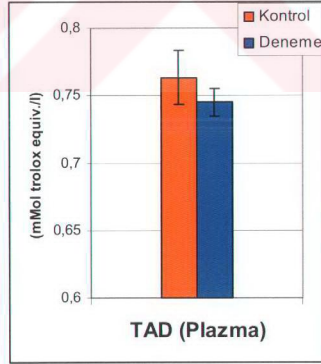
**Tablo 7.** Plazma ve beyin dokuda TAD

		$\bar{x}$	$\pm$	$S_{\bar{x}}$
<b>TAD (Beyin doku)</b> (mmol trolox equiv./ mg protein)	K	11,992	0,18	
	D	11,810	0,10	
<b>TAD (Plazma)</b> (mmol trolox equiv./l)	K	0,763	0,02	
	D	0,745	0,01	

TAD: total antioksidan, K:Kontrol, D: Deneme.



Şekil 8.a. Beyin dokuda TAD



Şekil 8.b. Plazmada TAD

Ortalama değerlere ait standart hatalar hata çubukları şeklinde gösterilmiştir.

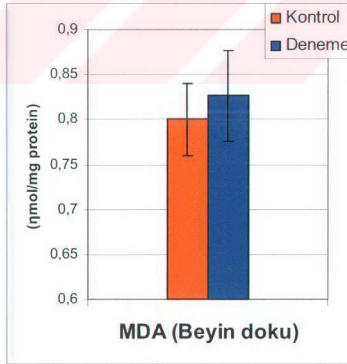
#### 4.5. Malondialdehit (MDA) düzeyleri

Lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA düzeyleri Tablo 8.'de verilmiştir. Değerlere ait grafikler Şekil 9.a. ve b.'de gösterilmiştir. Değerler açısından her iki grup arasında istatistiksel önemde bir fark gözlenmemiştir.

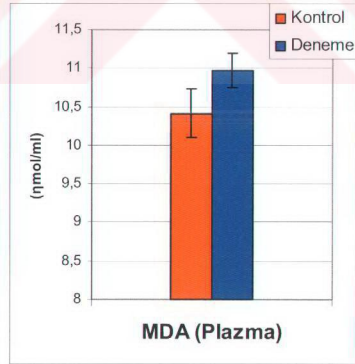
**Tablo 8.** Plazma ve beyin dokuda MDA değerleri

		$\bar{x}$	$\pm$	$S_{\bar{x}}$
<b>MDA (plazma)</b> ( $\eta$ mol/ml)	K	10,415	0,32	
	D	10,967	0,22	
<b>MDA (beyin dokusu)</b> ( $\eta$ mol/mg protein)	K	0,7999	0,04	
	D	0,8262	0,05	

MDA.: malondialdehid, K:Kontrol, D: Deneme.



**Şekil 9.a.** Beyin dokuda MDA düzeyleri



**Şekil 9.b.** Plazmada MDA düzeyleri

Ortalama değerlere ait standart hatalar hata çubukları şeklinde gösterilmiştir.

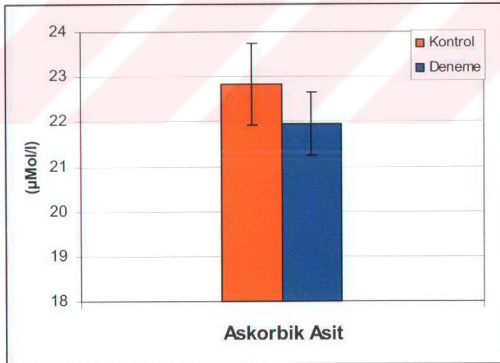
#### 4.6. Askorbik asit (AA) düzeyleri

Plazma askorbik asit düzeyleri Tablo 9.'da verilmiştir. Değerlere ait grafikler Şekil 10.'da gösterilmiştir. Plazma AA düzeyleri açısından her iki grup arasında istatistiksel önemde bir fark gözlenmemiştir.

**Tablo 9.** Askorbik asit düzeyleri

		$\bar{x}$	$\pm$	$S_{\bar{x}}$
AA ( $\mu\text{Mol/L}$ )	K	22,83		0,92
	D	21,96		0,70

AA: Askorbik asit; K: Kontrol, D: Deneme.



**Şekil 10.** Plazma Askorbik asit (AA) düzeyleri

Ortalama değerlere ait standart hatalar hata çubukları şeklinde gösterilmiştir.



## BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

DADLE'nin yer sincaplarında doğal HİM ile aynı etkinlikte hibernasyon oluşturan 28 günlük sürekli enfüzyonunun sıçanlardaki etkilerinin incelenmesinin amaçlandığı bu çalışmada deneme ve kontrol grubu hayvanların vücut ısısı, lökosit sayıları, koagülasyona ilişkin parametreler (APTT, PT, TT ve PS değerleri) , plazma ve beyin dokuda TAD ve MDA değerleri ve plazma askorbik asit değerleri incelenmiştir.

Yapılan kaynak taramasında DADLE'nin sıçanlarda uzun süreli uygulanmasına ilişkin bir araştırmaya rastlanılmadı. Bu çalışmada ise % 0,5'lik DADLE çözeltisinin 2,5 µl/saat hızında 28 gün süreyle sürekli deri altı enfüzyonu vücut ısısında istatistiksel önemde bir değişikliğe neden olmadı (Şekil 5.).

Applebaum ve Holtzman (2) fiziksel kısıtlanma stresi uyguladıkları sıçanlarda DADLE'nin intraserebroventriküler (İCV) verilmesinin vücut ısısında artışa, stres uygulanmamış hayvanlarda ise düşmeye neden olduğunu bildirmektedirler. Vybiral ve Jansky (110) yaptıkları çalışmada tavşanlara hipotalamus içine 50 µg DADLE uyguladıklarında kısa süreli bir hipotermi bulgulamışlar, DADLE'nin aynı yolla daha düşük dozda (5 µg) ve intravenöz uygulamada (500 µg) vücut ısısı üzerine herhangi bir etkisinin gözlenmediğini belirtmişlerdir. Tsao ve ark. (105) DADLE' yi intraperitoneal (İP) olarak 4 mg/kg, Yu ve ark. (125) aynı yolla 18 mg/kg dozunda uyguladıklarında farelerde vücut ısısında bir değişim gözlemlememişlerdir.

Literatürden de izlenildiği gibi DADLE uygulamasının vücut ısısı üzerine etkileri uygulama yolu, doz (110) ve türe (79) göre değişiklikler gösterdiği gibi hayvanın uygulama sonrasında strese maruz kalıp kalmaması da vücut ısısında düşme ya da yükselmeye yol açacak kadar zıt sonuçlar doğurabilmektedir (2).

Bu veriler ışığında genel olarak DADLE'nin MSS içine yapılan uygulamalarda doza bağlı olarak hipotermik bir etki gösterebilirken, sistemik uygulamalarda vücut ısısı üzerine bir etkisinin olmadığı söylenebilir.

Yapılan literatür taramalarında bugüne kadar DADLE'nin ya da diğer delta opioidlerin koagulyasyona yönelik parametrelere etkilerinin incelendiği herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak yapılan çalışmalarda hibernasyonun (6, 28, 123, 128) ve keza DADLE'nin (43, 104, 105, 106, 126, 127) sinir koruyucu etkilerinin olduğu ileri sürülmüş, Drew ve ark. (28) sinir korunumuyla ilgili adaptif mekanizmaları inceledikleri derlemede hipokoagulyasyonun hibernasyonda önemli bir nöroprotektif mekanizma olduğunu belirtmişlerdir.

Bu çalışmada DADLE uygulanan grupta TT değeri artarken ( $p < 0,05$ ) gruplar arasında APTT, PT ve PS değerleri açısından istatistiksel önemde bir fark gözlenmemiştir (Tablo 5.). Yapılan çalışmalarda (96, 97) hibernasyon esnasında  $\alpha$ -2 makroglobulin ( $\alpha$ -2M) düzeyinin arttığı ve bunun da hipokoagulyasyondan sorumlu olduğu belirtilmiştir.  $\alpha$ -2M koagulyasyon zincirinde faktör Xa' yı bağlayarak, aktive olmuş bu faktörü intrinsik ve ekstrinsik pıhtılaşma mekanizmalarının kesişim noktasında inhibe eder (68), ayrıca trombinin bağlar (32) . Bu çalışmada pıhtılaşma zincirindeki bu iki önemli unsuru (FXa ve trombin) sınavan TT 'deki uzama deneme grubu hayvanlarda  $\alpha$ -2M düzeyinin artmış olma olasılığı ile açıklanabilir.

Lökopeni, hibernasyonun karakteristik özelliklerinden biri olmasının (6, 62, 85, 95, 102, 123, 128) yanı sıra, hibernasyonda görülen diğer bir potansiyel sinir koruyucu adaptasyondur (28) ve hibernantların iskemi-reperfüzyon hasarlarına karşı gösterdiği toleransın temellerinden birini oluşturur. Hibernasyon esnasında önemli ölçüde düşen lökosit sayısının, uyanma sırasında hızlı bir şekilde normal düzeye dönmesi (36, 62, 85, 95), hücrelerin depolandığı ve hazırda beklediği şekilde, yani vasküler endoteldeki marjinsasyonlarıyla açıklanmaktadır (28). Yasuma ve ark. (123) hibernasyondaki yer sincabı plazmasının sıçan mikrovasküler endotel doku kültürüne uygulandığında endotel hücrelerinde doza bağlı olarak ICAM-1 (interselüler adezyon molekülü) ekspresyonunun arttığını ve bunun da lökositlerin endotele yapışmak suretiyle marjinsasyonuna neden olduğunu belirtmişlerdir. House ark. (48) hücre kültürü kullanarak yaptıkları *in vitro* çalışmada DADLE'nin doğal öldürücü (Natural Killer, NK) hücre aktivitesini, Wang ve ark. (113) DADLE'nin dalak hücre kültüründe antikor ve lökotrien C4 oluşumunu baskıladığını bulmuşlardır. DADLE'nin ve opioid agonistlerin immun düzenleyici etkilerini konu alan çalışmalar (33, 44, 69, 91, 120)

yapılmış olmasına rağmen, yapılan taramalarda sistemik DADLE uygulamasının lökosit sayıları üzerine etkilerinin incelendiği bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışmada % 0,5'lik DADLE çözeltisinin 2,5 µl/saat hızında 28 gün süreyle sürekli deri altı enfüzyonu sonucunda deneme grubunda lökosit sayısının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında düşük olduğu ancak iki grup arasındaki farkın istatistiksel öneme sahip olmadığı saptandı (Tablo 6.). Opioidler tarafından oluşturulan immün düzenleme opioidlerin immün sistem hücreleri üzerine direkt etkileri ya da, opioidlerin MSS yoluyla indirekt olarak immün sistemi etkilemeleri şeklinde iki temel mekanizma ile ortaya çıkabilir (117). Delta opioid agonistlerin ozmotik pompa yoluyla sürekli verilmesinin immunosupresif etkili olduğu belirtilmiştir (83). Bu çalışmada deneme grubu hayvanlarda lökosit sayısında kontrol grubuna oranla görülen düşüş istatistiksel öneme olmasa bile, benzer bir immunosupresif etkinin genel bir sonucu olabileceği gibi, hibernasyondakine benzer bir mekanizma ile lökositlerin marjınasyonunun artmasından da kaynaklanmış olabilir.

Hibernasyonda metabolik aktivitenin yoğun olduğu interskapular kahverengi yağ dokuda askorbik asit, süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) düzeyleri artar (12). Hibernant hayvanlar plazma ve serebrospinal sıvıdaki 3-5 kata varan askorbik asit artışı sayesinde, sık sık periyodik olarak uyanmanın ve yeniden ısınmanın yarattığı şiddetli oksidatif strese korunurlar (27, 29, 102). Artan antioksidan savunma hibernasyon fizyolojisinin önemli nöroprotektif bileşenlerinden biridir (28, 29). Yapılan taramalarda DADLE'nin kronik olarak sistemik uygulanmasının antioksidan düzeyleri ve oksidatif stres üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Tsao ve ark. (105) İP olarak uygulanan (2-4 mg/kg) DADLE' nin merkezi sinir sisteminde dopaminerjik nöronlarda metamphetamine'in oluşturduğu hasara karşı koruyucu olduğunu bulmuşlar ve DADLE nin bu koruyucu etkisini delta-opioid reseptörlerinin aktivasyonunun yanı sıra *in vitro* olarak da antioksidatif bir ajan olarak rol oynamasına bağlamışlardır. Rebrova ve ark. (84) delta opioid reseptör agonistlerinin izole, perfüze sıçan kalbinde antioksidan etkileri olduğunu, oksidatif stresi azalttığını, Maslov ve Rebrova (67) delta-2 reseptör agonistlerinin oluşturduğu antioksidan etkinin izole perfüze sıçan kalbinde serbest radikal hasarına karşı koruyucu olduğunu belirtmişlerdir. Bu bulgularla çelişkili olarak, DADLE'nin delta opioid reseptörleri stimüle ederek, G-proteinler aracılığıyla ATP'ye duyarlı potasyum

kanallarının açılmasını sağladığı ve bunun serbest radikal oluşumuna neden olduğu da bildirilmektedir (14, 77, 90).

Bu çalışmada ise % 0,5'lik DADLE çözeltisinin 2,5 µl/saat hızında 28 gün süreyle sürekli deri altı enfüzyonu sonucunda deneme grubunda plazma askorbik asit, plazma ve beyin dokuda total antioksidan düzeylerinin düştüğü ve buna uyumlu olarak plazma ve beyin dokuda MDA düzeylerinin yükseldiği ancak gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı saptandı (Tablo 7, 8, 9.). DADLE'nin düşük dozda, uzun süreli sürekli perfüzyonunun antioksidan savunmada bir iyileşmeye ve dolayısıyla oksidatif strese bir azalmaya neden olmaması, düşük dozlarda maddenin, Tsao ve ark. (105)'nin belirttiği şekilde serbest radikalleri elimine edici bir antioksidan ajan olarak etkimesinden çok opioid bir agonist olarak delta opioid reseptörlerle etkileşerek ATP'ye duyarlı potasyum kanallarının açılmasını sağladığı ve serbest radikal oluşumuna neden olduğu şeklinde yorumlanabilir.

Bu çalışmada yer sincaplarında doğal HİM ile aynı etkinlikte hibernasyon oluşturan 28 günlük sürekli DADLE enfüzyonu TT'de önemli ölçüde uzamaya neden olurken, nöroproteksiyona yönelik diğer parametrelerde istatistiksel önemde bir değişiklik oluşmamıştır.

Sonuç olarak bu doz ve sürede uygulanan DADLE'nin *in vivo* yapılan bu çalışmada, organ prezervasyon preparatları ve hücre kültürleriyle yapılan *in vitro* çalışmalarda olduğu gibi belirgin doku koruyucu etkileri gözlenmemiştir. Ancak bu çalışmanın DADLE 'nin farklı kronik dozları ile yapılacak çalışmalara ışık tutacağı kanısındayız.

## BÖLÜM 6. ÖZET

Bu çalışmada ilk defa, DADLE'nin yer sincaplarında doğal HİM ile aynı etkinlikte hibernasyon oluşturan 28 günlük sürekli enfüzyonunun sıçanlardaki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. İncelenecek parametreler, hibernasyonun nöroprotektif özelliğinin temelini oluşturan hipotermi, antioksidan savunma, immun düzenleme ve hipokoagulasyon'a ilişkin bazı fizyolojik ve hematolojik parametreler arasından seçilmiştir.

Araştırmada 24'ü kontrol ve 24'ü deneme grubunu oluşturmak üzere toplam 48 adet genç erkek Wistar albino sıçan kullanıldı. Deney grubu hayvanlara D-Ala<sup>2</sup>, D-Leu<sup>5</sup>-Enkephalin (DADLE), kontrol grubuna ise serum fizyolojik içeren ozmotik mini pompalar interskapular bölgeye implante edildi. Böylece 28 günlük deney süresince, deneme grubu sıçanlar % 0,5'lik DADLE çözeltisini 2,5 µl/saat hızında sürekli olarak deri altı yolla aldılar. Tüm hayvanların vücut ısısı deney süresince günlük olarak izlendi.

Deney sonunda deneme ve kontrol grubu hayvanların lökosit sayıları, APTT, PT, TT ve PS değerleri, plazma ve beyin dokuda TAD ve MDA değerleri ve plazma askorbik asit düzeyleri incelendi.

Deneme grubu hayvanlarda kontrol grubuna oranla TT değerinin arttığı gözlemlendi. Tüm diğer parametreler yönünden gruplar arasındaki farklılıkların istatistiksel öneme sahip olmadığı bulguları.

## **BÖLÜM 7. SUMMARY**

### **The Effects of D-Ala<sup>2</sup>, D-Leu<sup>5</sup>-Enkephalin (DADLE) on Some Parameters Related to Neuroprotective Adaptation in Rats**

In this study, for the first time, it is aimed to investigate the effects of D-Ala<sup>2</sup>, D-Leu<sup>5</sup>-Enkephalin's (DADLE) 28 days continuous infusion to rats, that induces hibernation in ground squirrels with the same efficiency of natural HIT (hibernation induction trigger). Investigated parameters have been selected among hypothermia, physiological and hematological parameters related to antioxidant protection, immune regulation and hypocoagulation which constitutes the bases of the neuroprotective feature of hibernation.

A total of 48 young Wistar male albino rats were used. Animals were divided into control and experimental groups each consist of 24 rats. Osmotic mini pumps containing DADLE and saline implanted to interscapular region of experimental and control groups of animals respectively. Therefore, experimental group animals received a 0,5 % DADLE solution subcutaneously with a pumping rate of 2,5 µl/h during 28 days experimental period . Body temperature of all animals scored daily throughout the experiment.

Leukocyte numbers, APTT, PT, TT values, coagulation time, total antioxidant and MDA levels in plasma and brain and plasma ascorbic acid levels of experimental and control groups animals were investigated.

It was found that TT increased in experimental group compared to control. It was determined that differences between all other parameters were not statistically significant.

## BÖLÜM 8. KAYNAKLAR

1. Akil, H., Watson, S.J., Young, E., Lewis, M.E., Khachaturian, H., Walker, J.M. 1984. Endogenous opioids: biology and function. *Annu. Rev. Neurosci.* 7, 223–55.
2. Appelbaum, B.D., Holtzman, S.G. 1986. Stress-induced changes in the analgesic and thermic effects of opioid peptides in the rat. *Brain Res.* 377(2), 330–6.
3. Banks, W.A., Kastin, A.J. 1990. Peptide transport systems for opiates across the blood-brain barrier. *Am. J. Physiol.* 259(1 Pt 1), E1–10.
4. Barnes, B.M. 1989. Freeze avoidance in a mammal: body temperatures below 0 degree C in an Arctic hibernator. *Science.* 244(4912), 1593–5. 3
5. Bolling, S.F., Tramontini, N.L., Kilgore, K.S., Su, T.P., Oeltgen, P.R., Harlow, H.H. 1997. Use of "natural" hibernation induction triggers for myocardial protection. *Ann. Thorac. Surg.* 64(3), 623–7.
6. Boyer, B.B., Barnes, B.M. 1999. Molecular and Metabolic Aspects of Mammalian Hibernation. *BioScience.* 49(9), 713–724.
7. Bölükbaşı, F. 1989. Fiziyojji Ders Kitabı – Vücut Isısı ve Sindirim. Cilt 1. A.Ü. Veteriner Fakültesi Yayınları 27–30.
8. Bruce, D.S., Bailey, E.C., Crane, S.K., Oeltgen, P.R., Horton, N.D., Harlow, H.J. 1997. Hibernation-induction trigger I. Opioid-like effects of prairie dog plasma albumin on induced contractility of guinea pig ileum. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 58(3), 621–5.
9. Bruce, D.S., Cope, G.W., Elam, T.R., Ruit, K.A., Oeltgen, P.R., Su, T.P. 1987. Opioids and hibernation. I. Effects of naloxone on bear HIT'S depression of guinea pig ileum contractility and on induction of summer hibernation in the ground squirrel. *Life Sci.* 41(18), 2107–13.
10. Bruce, D.S., Cox, D.E., Crane, S.K., Denholm, M.L., Dhyanchand, R.J., Hampl, M.J., Kary, J.A., Krober, A.S., Oeltgen, P.R., Horton, N.D., Harlow, H.J. 1997. Hibernation-induction trigger. II. In vitro effects of prairie dog plasma albumin on mouse vas deferens contractility. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 58 (3), 627–630.
11. Busto, R., Dietrich, W.D., Globus, M.Y., Valdes, I., Scheinberg, P., Ginsberg, M.D. 1987. Small differences in intraschemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 7(6), 729–38.
12. Buzadzic, B., Spasic, M., Saicic, Z.S., Radojicic, R., Petrovic, V.M., Halliwell, B. 1990. Antioxidant defenses in the ground squirrel *Citellus citellus*. 2. The effect of hibernation. *Free Radic. Biol. Med.* 9(5), 407–13.

13. Carey, H.V., Mangino, M.J., Southard, J.H. 2001. Changes in gut function during hibernation: implications for bowel transplantation and surgery. *Gut*. 49, 459–461.
14. Carreira, R.S., Facundo, H.T., Kowaltowski, A.J. 2005. Mitochondrial K<sup>+</sup> transport and cardiac protection during ischemia/reperfusion. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38(3), 345–52.
15. Cernak, I., Savic, V.J., Kotur, J., Prokic, V., Veljovic, M., Grbovic, D. 2000. Characterization of plasma magnesium concentration and oxidative stress following graded traumatic brain injury in humans. *J. Neurotrauma.* 17(1), 53–68.
16. Chang, K.J., Cuatrecasas, P. 1979. Multiple opiate receptors. Enkephalins and morphine bind to receptors of different specificity. *J. Biol. Chem.* 254(8), 2610–8.
17. Chien, S., Oeltgen, P.R., Diana, J.N., Salley, R.K., Su, T.P. 1994. Extension of tissue survival time in multiorgan block preparation with a delta opioid DADLE ([D-Ala<sup>2</sup>, D-Leu<sup>5</sup>]-enkephalin). *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 107(3), 964–7.
18. Chien, S., Oeltgen, P.R., Diana, J.N., Shi, X., Nilekani, S.P., Salley, R. 1991. Two-day preservation of major organs with autoperfusion multiorgan preparation and hibernation induction trigger. A preliminary report. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 102(2), 224–34.
19. Choi, D.W. 1988. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron.* 1(8), 623–34.
20. Choi, D.W., Rothman, S.M. 1990. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu. Rev. Neurosci.* 13, 171–82.
21. Cohen, G. 2000. Oxidative stress, mitochondrial respiration, and Parkinson's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 899, 112–20.
22. Çöteliöğlu, Ü. 2002. Pratik Fizyoloji Ders Notları, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, Ders Notu–134. S.44–45.
23. Dawe, A.R., Spurrier, W.A. 1969. Hibernation induced in ground squirrels by blood transfusion. *Science.* 163(864), 298–9.
24. Dawe, A.R., Spurrier, W.A., Armour, J.A. 1970. Summer hibernation induced by cryogenically preserved blood "trigger". *Science.* 168(930), 497–8.
25. Dawson, D.A., Ruetzler, C.A., Hallenbeck, J.M. 1997. Temporal impairment of microcirculatory perfusion following focal cerebral ischemia in the spontaneously hypertensive rat. *Brain Res.* 749(2), 200–8.
26. del Zoppo, G.J., Hallenbeck, J.M. 2000. Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke. *Thromb. Res.* 98(3), 73–81.
27. Drew, K.L., Osborne, P.G., Frerichs, K.U., Hu, Y., Koren, R.E., Hallenbeck, J.M., Rice, M.E. 1999. Ascorbate and glutathione regulation in hibernating ground squirrels. *Brain Res.* 851(1–2), 1–8.



28. Drew, K.L., Rice, M.E., Kuhn, T.B., Smith, M.A. 2001. Neuroprotective adaptations in hibernation: therapeutic implications for ischemia-reperfusion, traumatic brain injury and neurodegenerative diseases. *Free Radic. Biol. Med.* 31(5), 563–73.
29. Drew, K.L., Toien, O., Rivera, P.M., Smith, M.A., Perry, G., Rice, M.E. 2002. Role of the antioxidant ascorbate in hibernation and warming from hibernation. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 133(4). 483–92.
30. Erel, O. 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin. Biochem.* 37(4), 277–85.
31. Erel, O. 2004. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem.* 37(2), 112–9.
32. Feinman, R.D., Yuan, A.I., Windwer, S.R., Wang, D. 1985. Kinetics of the reaction of thrombin and alpha 2-macroglobulin. *Biochem. J.* 231(2), 417–23.
33. Fischer, E.G. 1988. Opioid peptides modulate immune functions. A review. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 10(3), 265–326.
34. Frerichs, K.U. 1999. Neuroprotective strategies in nature - novel clues for the treatment of stroke and trauma. *Acta Neurochir. Suppl.* 73, 57–61.
35. Frerichs, K.U., Hallenbeck, J.M. 1998. Hibernation in ground squirrels induces state and species-specific tolerance to hypoxia and aglycemia: an in vitro study in hippocampal slices. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18(2), 168–75.
36. Frerichs, K.U., Kennedy, C., Sokoloff, L., Hallenbeck, J.M. 1994. Local cerebral blood flow during hibernation, a model of natural tolerance to "cerebral ischemia". *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 14(2), 193–205.
37. Frerichs, K.U., Smith, C.B., Brenner, M., DeGracia, D.J., Krause, G.S., Marrone, L., Dever, T.E., Hallenbeck, J.M. 1998. Suppression of protein synthesis in brain during hibernation involves inhibition of protein initiation and elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 95(24), 14511–6.
38. Genazzani, A.R., Petraglia, F. 1989. Opioid control of luteinizing hormone secretion in humans. *J. Steroid Biochem.* 33(4B), 751–5.
39. Gyires, K., Müllner, K., Ronai, Z.A. 2001. Activation of Central Opioid Receptors May Induce Gastric Mucosal Defence in the Rat. *Journal of Physiology - Paris.* 95 (1–6). 189–196.
40. Haag, W. 1985. Zur Methodik und Praktischen Bedeutung der Vitamin C-Bestimmung beim Rind in Vergangenheit und Gegenwart, Inaugural Dissertation, Justus Liebig Universitaet, Giessen.
41. Hasegawa, H., Nakamura, A., Shinohara, Y., Baba, S. 1997. Determination of [D-Ala2,D-Leu5]enkephalin and the metabolites containing C-terminal D-leucine by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 689(2), 287–94.

42. Hayashi, T., Hirata, H., Asanuma, M., Ladenheim, B., Tsao, L.I., Cadet, J.L., Su, T.P. 2001. Delta opioid peptide [D-Ala<sup>2</sup>, D-Leu<sup>5</sup>]enkephalin causes a near complete blockade of the neuronal damage caused by a single high dose of methamphetamine: examining the role of p53. *Synapse*. 39(4), 305–12.
43. Hayashi, T., Su, T.P. 2003. Chronic [D-Ala<sup>2</sup>, D-Leu<sup>5</sup>]enkephalin treatment increases the nerve growth factor in adult mouse brain. *Eur. J. Pharmacol.* 464(2–3), 237–9.
44. Heagy, W., Shipp, M.A., Finberg, R.W. 1992. Opioid receptor agonists and Ca<sup>2+</sup> modulation in human B cell lines. *J. Immunol.* 149(12), 4074–81.
45. Hernandez, L.A., Grisham, M.B., Twohig, B., Arfors, K.E., Harlan, J.M., Granger, D.N. 1987. Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury. *Am. J. Physiol.* 253(3 Pt 2), H699–703.
46. Holaday, J.W. 1982. Cardiorespiratory effects of mu and delta opiate agonists following third or fourth ventricular injections. *Peptides*. 3(6), 1023–9.
47. Horton, N.D., Kaftani, D.J., Bruce, D.S., Bailey, E.C., Krober, A.S., Jones, J.R., Turker, M., Khattar, N., Su, T.P., Bolling, S.F., Oeltgen, P.R. 1998. Isolation and partial characterization of an opioid-like 88 kDa hibernation-related protein. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 119(4), 787–805.
48. House, R.V., Thomas, P.T., Bhargava, H.N. 1996. A comparative study of immunomodulation produced by in vitro exposure to delta opioid receptor agonist peptides. *Peptides*. 17(1), 75–81.
49. Hughes, J. 1975. Isolation of an endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphine. *Brain. Res.* 88(2), 295–308.
50. Johansson, B.W. 1996. The hibernator heart--nature's model of resistance to ventricular fibrillation. *Cardiovasc. Res.* 31(5), 826–32.
51. Jordan, B.A., Cvejic, S., Devi, L.A. 2000. Opioids and their complicated receptor complexes. *Neuropsychopharmacology*. 23(4 Suppl), 5–18.
52. Kaya, S. 2000. Narkotik Ağrı Kesiciler ve Antagonistleri. In: Kaya, S., Pirinçci, İ., Bilgili, A. (ed.) *Veteriner Uygulamalı Famakoloji*. Cilt 1. Medisan Yayınları. Ankara. 353–357.
53. Kelley, R.E. 2000. Thrombolytic therapy for acute ischemic stroke. *J. La. State. Med. Soc.* 152(5), 253–8.
54. Kieffer, B.L. 1999. Opioids: first lessons from knockout mice. *Trends Pharmacol. Sci.* 20(1), 19–26.
55. Kondo, N., Kondo, J. 1992. Identification of novel blood proteins specific for mammalian hibernation. *J. Biol. Chem.* 267(1), 473–8.
56. Kosterlitz, H.W., Hughes, J. 1975. Some thoughts on the significance of enkephalin, the endogenous ligand. *Life Sci.* 17(1), 91–6.
57. Kromer, W. 1988. Endogenous and exogenous opioids in the control of gastrointestinal motility and secretion. *Pharmacol. Rev.* 40(2), 121–62.

58. Lechler, E., Penick, G.D. 1963. Blood clotting defect in hibernating ground squirrels (*Citellus tridecemlineatus*). *Am. J. Physiol.* 205(5), 985–8.
59. Lord, J.A., Waterfield, A.A., Hughes, J., Kosterlitz, H.W. 1977. Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature.* 267(5611), 495–9.
60. Love S. 1999. Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathol.* 9(1), 119–31.
61. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193(1), 265–75.
62. Lyman, C.P., Chatfield, P.O. 1955. Physiology of hibernation in mammals. *Physiol Rev.* 35(2), 403–25.
63. Lyrer, P., Landolt, H., Kabiersch, A., Langemann, H., Kaeser, H. 1991. Levels of low molecular weight scavengers in the rat brain during focal ischemia. *Brain Res.* 567(2), 317–20.
64. Maggi, R., Pimpinelli, F., Martini, L., Piva, F. 1995. Inhibition of luteinizing hormone-releasing hormone secretion by delta-opioid agonists in GT1-1 neuronal cells. *Endocrinology.* 136(11), 5177–81.
65. Manzanares, J., Corchero, J., Romero, J., Fernandez-Ruiz, J.J., Ramos, J.A., Fuentes, J.A. 1999. Pharmacological and biochemical interactions between opioids and cannabinoids. *Trends Pharmacol Sci.* 20(7), 287–94.
66. Marion, D.W., Penrod, L.E., Kelsey, S.F., Obrist, W.D., Kochanek, P.M., Palmer, A.M., Wisniewski, S.R., DeKosky, S.T. 1997. Treatment of traumatic brain injury with moderate hypothermia. *N. Engl. J. Med.* 336(8), 540–6.
67. Maslov, L.N., Rebrova, T.Iu. 2000 Comparative analysis of the cardioprotective effect of antioxidant dibunol and agonists of mu- and delta-opioid receptors during oxidative stress. *Eksp. Klin. Farmakol.* 63(3), 24–8.
68. Meijers, J.C., Tjiburg, P.N., Bouma, B.N. 1987. Inhibition of human blood coagulation factor Xa by alpha 2-macroglobulin. *Biochemistry.* 26(18), 5932–7.
69. Mendelsohn, L.G., Kerchner, G.A., Culwell, M., Ades, E.W. 1985. Immunoregulation by opioid peptides: I. Absence of classical opioid receptor on human mononuclear cells. *J. Clin. Lab. Immunol.* 16(3), 125–9.
70. Milsom, W.K., Zimmer, M.B., Harris, M.B. 1999. Regulation of cardiac rhythm in hibernating mammals. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 124(4), 383–91.
71. Myers, R.D., Oeltgen, P.R., Spurrier, W.A. 1981. Hibernation "trigger" injected in brain induces hypothermia and hypophagia in the monkey. *Brain Res. Bull.* 7(6), 691–5.
72. Oeltgen, P.R., Bergmann, L.C., Spurrier, W.A., Jones, S.B. 1978. Isolation of a hibernation inducing trigger(s) from the plasma of hibernating woodchucks. *Prep. Biochem.* 8(2–3), 171–88.
73. Oeltgen, P.R., Blouin, R.A., Spurrier, W.A., Myers, R.D. 1985. Hibernation "trigger" alters renal function in the primate. *Physiol. Behav.* 34(1), 79–81.

74. Oeltgen, P.R., Nilekani, S.P., Nuchols, P.A., Spurrier, W.A., Su, T.P. 1988. Further studies on opioids and hibernation: delta opioid receptor ligand selectively induced hibernation in summer-active ground squirrels. *Life Sci.* 43(19), 1565–74.
75. Oeltgen, P.R., Walsh, J.W., Hamann, S.R., Randall, D.C., Spurrier, W.A., Myers, R.D. 1982. Hibernation "trigger": opioid-like inhibitory action on brain function of the monkey. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 17(6), 1271–4.
76. Opthof, T., Rook, M.B. 2000. The hibernators heart. Nature's response to arrhythmogenesis? *Cardiovasc. Res.* 47(1). 6–8.
77. Pain, T., Yang, X.M., Critz, S.D., Yue, Y., Nakano, A., Liu, G.S., Heusch, G., Cohen, M.V., Downey, J.M. 2000. Opening of mitochondrial K(ATP) channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. *Circ. Res.* 87(6), 460–6.
78. Pakhotin, P.I., Pakhotina, I.D., Belousov, A.B. 1993. The study of brain slices from hibernating mammals in vitro and some approaches to the analysis of hibernation problems in vivo. *Prog. Neurobiol.* 40(2), 123–61.
79. Pang, I.H., Bernardini, G.L., Clark, W.G. 1984. Hyperthermic response of the cat to intraventricular injection of the opioid delta-receptor agonist D-Ala2-D-Leu5-enkephalin. *Brain Res. Bull.* 13(2), 263–8.
80. Paterson, S.J., Robson, L.E., Kosterlitz, H.W. 1983. Classification of opioid receptors. *Br. Med. Bull.* 39(1), 31–6.
81. Pert, C.B., Snyder, S.H. 1973. Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science.* 179(77), 1011–4.
82. Pert, C.B., Snyder, S.H. 1973. Properties of opiate-receptor binding in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 70(8), 2243–7.
83. Rahim, R.T., Meissler, J.J. Jr., Cowan, A., Rogers, T.J., Geller, E.B., Gaughan, J., Adler, M.W., Eisenstein, T.K. 2001. Administration of mu-, kappa- or delta2-receptor agonists via osmotic minipumps suppresses murine splenic antibody responses. *Int. Immunopharmacol.* 1(11), 2001–9.
84. Rebrova, T.Iu., Maslov, L.N., Tam, S.W. 2001. The contribution of antioxidant enzymes in the cardioprotective effect of opioids during oxidative stress. *Vopr Med Khim.* 47(3), 338–45.
85. Reznik, G., Reznik-Schuller, H., Emminger, A., Mohr, U. 1975. Comparative studies of blood from hibernating and nonhibernating European hamsters (*Cricetus cricetus* L). *Lab. Anim. Sci.* 25(2), 210–5.
86. Rice, M.E. 2000. Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci.* 23(5), 209–16.
87. Rottkamp, C.A., Nunomura, A., Raina, A.K., Sayre, L.M., Perry, G., Smith, M.A. 2000. Oxidative stress, antioxidants, and Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 1, S62–6.
88. Roy, S., Loh, H.H. 1996. Effects of opioids on the immune system. *Neurochem. Res.* 21(11), 1375–86.

89. Schafer, M.K., Martin, R. 1994. Opioid peptides in the pituitary: a hormone, a paracrine modulator and a peptide in search of a function. *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* 375(11), 737–40.
90. Schipke, J.D., Nickel, F., Gams, E., Sunderdiek, U. 2004. Protective effects of a delta-opioid-receptor agonist and an oxygen radical scavenger on posts ischemic hearts. *Herz.* 29(3), 331–40.
91. Shahabi, N.A., Heagy, W., Sharp, B.M. 1996. Beta-endorphin enhances Concanavalin-A-stimulated calcium mobilization by murine splenic T cells. *Endocrinology.* 137(8), 3386–93.
92. Shohami, E., Beit-Yannai, E., Horowitz, M., Kohen, R. 1997. Oxidative stress in closed-head injury: brain antioxidant capacity as an indicator of functional outcome. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 17(10), 1007–19.
93. Simon, E.J., Hiller, J.M., Edelman, I. 1973. Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic (3H) Etorphine to rat-brain homogenate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 70(7), 1947–9.
94. Sottrup-Jensen, L., Sand, O., Kristensen, L., Fey, G.H. 1989. The alpha-macroglobulin bait region. Sequence diversity and localization of cleavage sites for proteinases in five mammalian alpha-macroglobulins. *J. Biol. Chem.* 264(27), 15781–9.
95. Spurrier, W.A., Dawe, A.R. 1973. Several blood and circulatory changes in the hibernation of the 13-lined ground squirrel, *Citellus tridecemlineatus*. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 44(2), 267–82.
96. Srere, H.K., Bekle, D., Wang, L.C., Martin, S.L. 1995. Alpha 2-Macroglobulin gene expression during hibernation in ground squirrels is independent of acute phase response. *Am. J. Physiol.* 268(6 Pt 2), R1507–12.
97. Srere, H.K., Wang, L.C., Martin, S.L. 1992. Central role for differential gene expression in mammalian hibernation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 89(15), 7119–23.
98. Su, T.P. 2000. Delta opioid peptide [D- Ala(2),D-Leu(5)]enkephalin promotes cell survival. *J. Biomed. Sci.* 7(3), 195–9.
99. Summers, R.L., Li, Z., Hildebrandt, D. 2003. Effect of a delta receptor agonist on duration of survival during hemorrhagic shock. *Acad. Emerg. Med.* 10(6), 587–93.
100. Svihla, A., Bowman, H.R., Ritenour, R. 1951. Prolongation of clotting time in dormant estivating mammals. *Science.* 114(2960), 298–9.
101. Swan, H., Schatte, C. 1977. Antimetabolic extract from the brain of the hibernating ground squirrel *Citellus tridecemlineatus*. *Science.* 195(4273), 84–5.
102. Toien, O., Drew, K.L., Chao, M.L., Rice, M.E. 2001. Ascorbate dynamics and oxygen consumption during arousal from hibernation in Arctic ground squirrels. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 281(2), R572–83.

103. Traynor, J. 1989. Subtypes of the kappa-opioid receptor: fact or fiction? *Trends Pharmacol. Sci.* 10(2), 52–3.
104. Tsao, L.I., Cadet, J.L., Su, T.P. 1999. Reversal by [D-Ala<sup>2</sup>,D-Leu<sup>5</sup>]enkephalin of the dopamine transporter loss caused by methamphetamine. *Eur. J. Pharmacol.* 372(3), R5–7.
105. Tsao, L.I., Ladenheim, B., Andrews, A.M., Chiueh, C.C., Cadet, J.L., Su, T.P. 1998. Delta opioid peptide [D-Ala<sup>2</sup>,D-leu<sup>5</sup>]enkephalin blocks the long-term loss of dopamine transporters induced by multiple administrations of methamphetamine: involvement of opioid receptors and reactive oxygen species. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 287(1), 322–31.
106. Tsao, L.I., Su, T.P. 2001. Hibernation-induction peptide and cell death: [D-Ala<sup>2</sup>,D-Leu<sup>5</sup>]enkephalin blocks Bax-related apoptotic processes. *Eur. J. Pharmacol.* 428(1), 149–51.
107. Tubbs, R.J., Porcaro, W.A., Lee, W.J., Blehar, D.J., Carraway, R.E., Przyklenk, K., Dickson, E.W. 2002. Delta opiates increase ischemic tolerance in isolated rabbit jejunum. *Acad. Emerg. Med.* 9(6), 555–60.
108. Van den Brink, O.W.V., Rosenfeldt, F.L., Penny, D.J., Esmore, D.S., Lloyd, R., Rothschild, L., Quick, D., Pepe, S. 2003. Endogenous cardiac opioids: enkephalins in adaptation and protection of the heart. *Heart Lung Circ.* 12, 178–187.
109. van der Graaf, F., Koedam, J.A., Bouma, B.N. 1983. Inactivation of kallikrein in human plasma. *J. Clin. Invest.* 71(1), 149–58.
110. Vybiral, S., Jansky, L. 1997. Hibernation triggers and cryogens: do they play a role in hibernation? *Comp. Biochem. Physiol. A. Physiol.* 118(4), 1125–33.
111. Waldoer, M., Bartlett, S.E., Whistler, J.L. 2004. Opioid Receptors. *Annual Review of Biochemistry.* 73, 953–90.
112. Walsh, S.L., Wagner, G.C. 1992. Motor impairments after methamphetamine-induced neurotoxicity in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 263(2), 617–26.
113. Wang, H., Lin, J., Liu, J. 1995. Regulation of anti-SRBC antibody production by opioids and their mechanisms. *Chin. Med. Sci. J.* 10(3), 125–30.
114. Wang, L.C.H., Lee, T.F. 2000. Perspectives on metabolic suppression during mammalian hibernation and daily torpor. In: *Life in the Cold*, edited by Heldmaier G., and Klingenspor M. Berlin: Springer-Verlag, 152-158.
115. Wang, S.Q., Zhou, Z.Q. 1999. Medical significance of cardiovascular function in hibernating mammals. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 26(10), 837–9.
116. Wass, C.T., Lanier, W.L. 1996. Hypothermia-associated protection from ischemic brain injury: implications for patient management. *Int. Anesthesiol. Clin.* 34(4), 95–111.
117. Welters, I. 2003. Opioids and immunosuppression. *Clinical relevance?* *Anaesthesist.* 52(5), 442–52.

118. Wickler, S.J., Hoyt, D.F., van Breukelen, F. 1991. Disuse atrophy in the hibernating golden-mantled ground squirrel, *Spermophilus lateralis*. *Am. J. Physiol.* 261(5 Pt 2), R1214–7.
119. Wu, G., Zhang, F., Salley, R.K., Diana, J.N., Su, T.P., Chien, S. 1996. Delta Opioid extends hypothermic preservation time of the lung. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 111(1), 259–67.
120. Wybran, J. 1985. Enkephalins and endorphins as modifiers of the immune system: present and future. *Fed. Proc.* 44(1 Pt 1), 92–4.
121. Yamanouchi, K., Yanaga, K., Okudaira, S., Eguchi, S., Furui, J., Kanematsu, T. 2003. [D-Ala<sup>2</sup>, D-Leu<sup>5</sup>] enkephalin (DADLE) Protects Liver against Ischemia-Reperfusion Injury in the Rat. *J. Surg. Res.* 114(1), 72–7.
122. Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T.I., Jones, D.P., Wang, X. 1997. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science.* 275(5303), 1129–32.
123. Yasuma, Y., McCarron, R.M., Spatz, M., Hallenbeck, J.M. 1997. Effects of plasma from hibernating ground squirrels on monocyte-endothelial cell adhesive interactions. *Am. J. Physiol.* 273, R1861–9.
124. Yoshioka, T., Kawada, K., Shimada, T., Mori, M. 1979. Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 135(3), 372–6.
125. Yu, L., Kuo, Y.M., Cherng, C.F. 2001. Opioid peptides alleviated while naloxone potentiated methamphetamine-induced striatal dopamine depletion in mice. *J. Neural Transm.* 108(11), 1231–7.
126. Zhang, J., Gibney, G.T., Zhao, P., Xia, Y. 2002. Neuroprotective role of delta-opioid receptors in cortical neurons. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 282(6), C1225–34.
127. Zhang, J., Haddad, G.G., Xia, Y. 2000. Delta-, but not mu- and kappa-, opioid receptor activation protects neocortical neurons from glutamate-induced excitotoxic injury. *Brain Res.* 885(2), 143–53.
128. Zhou, F., Zhu, X., Castellani, R.J., Stimmelmayer, R., Perry, G., Smith, M.A., Drew, K.L. 2001. Hibernation, a model of neuroprotection. *Am. J. Pathol.* 158(6), 2145–51.

## ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında İstanbul'da doğdum. İlköğrenimimi Bahçelievler İlkokulu'nda, orta ve lise eğitimimi İstanbul Lisesi'nde tamamladım. 1994 yılında yüksek öğrenime başladığım İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 1999 yılında mezun oldum. Aynı yıl İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün açmış olduğu sınavla İ.Ü. Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimime başladım. 2000 yılında aynı anabilim dalına araştırma görevlisi olarak atandım ve halen bu görevimi sürdürmekteyim.