



T.C
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

SIÇAN SİYATİK SİNİR İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINDA
PROANTOSİYANİDİN EKSTRESİNİN KORUYUCU ETKİSİNİN
İNCELENMESİ

DR. OYKUT DAĞTEKİN
UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
DOÇ. DR. EBRU BALLI

Bu tez, BAP-TF TTB (OD) 2011-5 TU kodlu proje olarak Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

MERSİN-2012

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimime katkıda bulunan başta tez danışmanım Doç. Dr. Ebru Ballı'ya, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Tülin Baykal'a, Prof. Dr. Banu Coşkun Yılmaz'a, Doç. Dr. Necat Yılmaz'a, Yrd. Doç. Dr. Savaş Aktaş'a;

Tezin proje aşamasında katkılarını esirgemeyen Prof. Dr. Celal Bağdatoğlu ve Prof. Dr. Derya Ümit Talas'a;

Biyokimyasal analiz aşamasındaki katkılarından dolayı Doç. Dr. Serap Yalın'a;

Tez sürecinde desteklerinden ve yardımlarından dolayı laboratuardaki çalışma arkadaşlarım Kadriye Gökkan, Gökçe Deniz Külekçi, Tuba Özcan'a ve Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Dr. Necmettin Araz'a

Asistanlığım süresince verdikleri destek ve gösterdikleri özveriden dolayı sevgili eşim Dr. Ahmet DAĞTEKİN'e ve oğullarıma teşekkür ederim.

Dr. Oykut Dağtekin

Mersin 2012

İÇİNDEKİLER

ÖZET	5
İNGİLİZCE ÖZET	6
GİRİŞ VE AMAÇ	7
GENEL BİLGİLER	9
Sinir Sisteminin Embriyolojisi	9
Sinir Sistemi	10
Nöron	11
Periferik Sinirler	12
Periferik Sinirin Bağ Doku Tabakaları	13
Schwann Hücresi	14
Periferik Sinir Lifi Tipleri	16
Periferik Sinir Vaskülarizasyonu	17
Sıçan Siyatik Sinir Vasküler Anatomisi	17
Sıçan Siyatik Sinirinin Bölgesel Kan Akımı	18
Periferik Nöropati	18
Periferik Sinir İskemisi	19
Akson Dejenerasyonu	20
Apopitoz	22
Kaspazlar	23
Kaspaz Aktivasyonu	24
Kalpainler	25
Kalpainler ve Kaspazlar Arasındaki Sinyal İlişkisi	26
Kaspaz, Kalpain ve Kalsiyum İyonu	26
Apopitozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	26
İskemi-Reperfüzyon Hasarının Fizyopatolojisi	29
İskemi-Reperfüzyon Hasarında Oluşan Biyokimyasal Değişiklikler	29
Hücre İçi Kalsiyum Dengesi	30
Mitokondri ve Hücre Hasarı	31
Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres	32
Reaktif Oksijen Türlerinin Etkileri	33

Hücrede Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynağı	34
Oksidatif Stresin Değerlendirilmesinde Kullanılan Yöntemler	35
Antioksidanlar	36
Proantosiyanidinler	40
Proantosiyanidinlerin Antioksidan ve Diğer Özellikleri	40
Proantosiyanidinler Farmakolojik Özellikleri	41
Proantosiyanidinlerin Yan Etkileri ve Güvenilirliği	42
GEREÇ VE YÖNTEMLER	43
Deneysel Çalışma.....	43
İskemi Reperfüzyon Oluşturma Modeli	43
Çalışma Grupları.....	44
İmmünofloresan İşaretleme Yöntemi	45
ELISA Yöntemi	46
Elektron Mikroskopu Doku Hazırlama Yöntemi	47
Elektron Mikroskopik Değerlendirme	48
Biyokimyasal Analiz Yöntemleri	48
İstatistiksel Analiz.....	50
BULGULAR	52
İmmünofloresan İşaretleme Bulguları	52
ELISA Bulguları.....	58
Elektron Mikroskopik Bulgular.....	59
Biyokimyasal Analiz Bulguları	68
TARTIŞMA.....	73
SONUÇ ve ÖNERİLER.....	80
KAYNAKLAR	82
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	
TABLolar DİZİNİ	
ŞEKİLLER DİZİNİ	
RESİMLER DİZİNİ	

ÖZET

Periferik sinir iskemisini takiben kan akımının yeniden başlaması oksidatif strese bağlı olarak kan sinir bariyerinin bozulmasına ve sinir hasarına neden olur. İskemi sonrası reperfüzyon hücre sel bütünlüğün bozulmasına bağlı fonksiyonel yetmezlik ile karakterize inflamatuvar ve metabolik hasara yol açar. Birçok antioksidanın insanları hastalıklardan koruyucu faydalı etkileri olduğu deneysel çalışmalarla gösterilmiştir. Kuruyemişler, tohumlar, sebzeler, meyveler ve ağaç kabuğunda doğal olarak bulunan proantosiyanidinlerin (PA) serbest radikaller ve oksidatif strese karşı koruyucu ve tedavi edici etkileri birçok çalışmada rapor edilmiştir.

Bu çalışma; sıçanlarda periferik sinir iskemi reperfüzyon (İR) hasarında, PA'in koruyucu etkisini araştırmak amacıyla yapıldı. Sıçanlar rastgele her biri 7'şerli 9 gruba ayrıldı. Sağ inguinal bölgede yapılan diseksiyon sonrasında femoral arter ve ven anevrizma mikroklipsi ile klempe edilerek siyatik sinir ve devamı tama yakın iskemik hale getirildi. Bu şekilde 3 saat iskemiye maruz bırakılan sinirde klipsler çıkarılarak deney protokolüne uygun sürelerde reperfüzyon sağlandı.

PA verilmesiyle sıçan periferik sinirinde İR hasarı belirgin derecede azaldı. Serbest radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonunun metaboliti olan malondialdehit seviyeleri; grup II'de ($1,22\pm 0,93$ nmol/ml) grup III'den ($0,76\pm 0,25$ nmol/ml) belirgin olarak daha yüksekti. Yine grup IV'te ($1,00\pm 0,63$ nmol/ml) grup V'e göre ($0,74\pm 0,33$ nmol/ml) belirgin olarak daha yüksek saptandı. Ayrıca PA'in süperoksit dismutazın antioksidan enzimatik aktivitesini belirgin derecede arttırdığı tespit edildi. Yine PA'in iskemi reperfüzyon hasarı sonucu oluşan aksonların miyelin kılıflarında delaminasyon derecelerini önemli ölçüde azalttığı belirlendi. İmmunofloresan işaretleme ve ELISA yöntemi ile yapılan ölçümlerde grup III ve grup VII'de aktif kaspaz 3 düzeylerinde azalma olduğu tespit edildi.

Sonuç olarak; PA'in periferik sinir iskemi reperfüzyon hasarında oluşan oksidatif hasar ve sinir lifi dejenerasyonuna karşı serbest radikallerin zararlı etkilerini engelleyerek antioksidan savunma sistemlerini desteklediği kanısına varıldı.

Anahtar kelimeler: İskemi-reperfüzyon, Kaspaz 3, Oksidatif stres, Periferik sinir, Proantosiyanidin

ABSTRACT

The Investigation Of Proanthocyanidin Extract Protective Effect In Rat Sciatic Nerve In Ischemia Reperfusion Injury

Blood flow after peripheral nerve ischemia leads to the destruction of blood-nerve barrier due to oxidative stress. Reperfusion after ischemia causes inflammatory and metabolic injury characterised by functional insufficiency due to the impairment of cellular integrity. The protective effect of various antioxidants from illnesses for human beings have been demonstrated by experimental investigations. The protective effects of nuts, seeds, vegetables, fruits and proanthocyanidines (PA) against both to free radicals and oxidative stress have been reported by many studies.

This study was designed to investigate therapeutic effects of PA in ischemia-reperfusion (IR) injury in rats. Rats were randomly assigned to 9 groups each consisting of 7 animals. After the dissection in the right inguinal region, femoral artery and vein were clamped with aneurysm microclips to establish ischemia in the sciatic nerve. After 3 hours of ischemia, the clips were removed and various durations of reperfusion have been performed in different experimental groups.

A marked decrease in IR injury was noticed by PA administration. Malondialdehyde, the lipid peroxidation metabolite caused by free radicals, was considerably high in the group II compared to group III. Also, the MDA level was higher in group IV compared to group V. PA also markedly increased the antioxidant enzymatic activity of superoxide dismutase. PA was shown to decrease delamination degree of axonal myelin sheaths due to IR injury. Active caspase 3 levels were seen to decrease by immunofluorescent and ELISA methods in group III and group VII.

In conclusion, PA might be suggested to support antioxidant defense systems by inhibiting the harmful effects of free radicals which may cause oxidative injury and nerve degeneration in peripheral IR injury.

Key Words: Ischemia-reperfusion, Caspase 3, Oxidative stress
Peripheral nerve, Proanthocyanidin

GİRİŞ VE AMAÇ

Sinir sistemi anatomik olarak merkezi sinir sistemi (MSS) ve periferik sinir sistemi (PSS) olmak üzere iki bölümde incelenir. MSS beyin ve medulla spinalisten oluşur. Kranial, spinal, periferik sinirler ile gangliyonlar ve serbest sinir sonlanmaları ise PSS'ni oluşturur¹.

Sinir sistemi, sinir hücresi adı verilen nöronlar ve gliya hücrelerinden meydana gelir². Nöronlar uyarıyı almak ve iletmek, ayrıca nörotransmitterler ve bilgi ile ilgili diğer molekülleri salgılamaktan sorumludurlar. Nöronlar; hücre gövdesi (perikaryon), akson ve dendritlerden oluşurlar. Akson, sinir uyarısını diğer hücrelere iletmek için özelleşmiş tek bir uzantıdır. Dendritler ise uyarıyı çevreden, duyu epitel hücrelerinden ve diğer nöronlardan almak üzere özelleşmiş çok sayıdaki uzantılardır³.

Periferik sinirler, somatik veya otonom sinir sistemlerinin afferent veya efferent sinir liflerinden oluşan yapılardır. Sinir lifi, bir akson ve çevresinde yer alan miyelin kılıftan meydana gelir. Sinir liflerine ait hücre gövdeleri MSS'nde veya gangliyonlarda yer alır. PSS'ne ait bütün aksonların çevresinde başlangıçlarından sonlanacakları yere kadar Schwann hücresi kılıfı bulunur. Schwann hücre sitoplazmasının akson çevresine konsantrik olarak sıkıca sarılması sonucunda miyelin kılıf oluşur. Miyelin kılıfı içeren sinir liflerine miyelinli sinir lifleri, miyelin kılıfı bulunmayan sinir liflerine ise miyelinsiz sinir lifleri denir. Miyelin kılıf lipidden zengin bir tabakadır ve impulsun hızlı yayılmasını sağlar¹.

İskemi organı veya dokuyu perfüze eden kan akımındaki yetersizliğe bağlı olarak gelişen geri dönüşümlü veya dönüşümsüz olabilen hücre/doku zedelenmesidir⁴. İskemik dokudaki kan akımının yeniden sağlanması ise reperfüzyon olarak adlandırılır. Doku kan akımı kesildiğinde hücre fonksiyonlarında bozulma ve hücre ölümü gözlenir. Kan akımının tekrar başlaması iskeminin yol açtığı hasarı sınırlandırmaktadır. Ancak kan ile iskemik doku arasındaki etkileşim var olan doku hasarını daha da arttırabilmektedir. Kesilmiş olan kan akımının tekrar başlaması sonucu hasarın daha da artmasına reperfüzyon hasarı denir^{5,6}.

İskemik dokudaki reperfüzyon, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini arttırırken, proinflamatuvar sitokinler ile mediatörlerin serbestleşmesi, granülosit

infiltrasyonu ve kalsiyum dengesinde bozulma gibi bir dizi olayı da başlatır⁷. ROS'nin üretimi ve birikimi lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve DNA hasarına neden olur. ROS kaspaz kaskadınının tüm basamaklarının aktivasyonunda rol oynar⁸.

İskemik nöropati genellikle diyabetes mellitus, vaskülitler, travma ve periferik vasküler hastalıklara bağlı olarak görülür⁹. İR'da kan sinir bariyerinin yıkımı sonucunda ortaya çıkan oksidatif stres ve lipid peroksidasyonu çok sayıda biyokimyasal ve patolojik değişikliklere neden olur¹⁰. Şiddetli sinir iskemisi enerji azlığını takiben iletim bozukluğu ve sinir lif dejenerasyonu ile sonuçlanır. Reperfüzyon sonucunda endotel hücrelerinde oksidatif hasar ve sonrasında endonöral ödem ile sinir lifi dejenerasyonu meydana gelir¹¹.

Serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere organizmada antioksidan savunma sistemleri veya kısaca antioksidanlar olarak adlandırılan çeşitli savunma mekanizmaları bulunmaktadır¹².

Son zamanlarda yapılan çeşitli deneysel İR modellerinde özellikle endojen antioksidan maddelerin İR hasarında koruyucu veya önleyici etkileri gösterilmeye çalışılmıştır. Ancak henüz PA'in İR hasarının neden olduğu oksidatif stres ve antioksidan savunma sistemleri ile periferik sinirde yaratmış olduğu etkileri araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tezin amacı histopatolojik ve biyokimyasal parametreler kullanılarak İR hasarı yapılan sıçanlarda PA takviyesinin çeşitli oksidatif stres ve antioksidan savunma sistemleri ile periferik sinir üzerine koruyucu etkilerini araştırmaktır.

GENEL BİLGİLER

Sinir Sisteminin Embriyolojisi

Embriyonik gelişim sürecinde ektoderm tabakası organizmada birçok yapıya farklıdır. Ektodermden farklı olan en kompleks ve ilginç yapı sinir sistemidir. Sinir sistemi gelişimi sürecinde Pax2, Pax5, Wnt1, En1, Nurr1, Shh, OTX1, OTX2, Noggin, Chordin, Slug, FGF8, b FGF, BMP, PDGF, demir, laminin, entaktin, fibrin, kollagen Tip1 gibi çok sayıda protein, gen ve farklılaşma faktörleri rol oynamaktadır.

Sinir sisteminin gelişiminde indüksiyon, proliferasyon, pattern oluşumu, hücreler arası ilişki, hücre göçü, hücre farklılaşması gibi birçok gelişimsel olay rol oynar. İndüksiyon hem sinir sisteminin notokord tarafından primer indüksiyonu hem de farklılaşan nöral dokuların kendilerini indüklemeleri (sekonder indüksiyon) şeklinde gelişir.

Gastrulasyon döneminde normal ektoderm BMP-4 (Bone morphogenetic protein) salgılayarak dorsal ektodermin nöral dokuları oluşturmasını engellemektedir. Ancak intrauterin gelişiminin üçüncü haftasında HNF-3b (Hepatic nuclear factor-3b) etkisi ile notokord oluşturulan hücreler nöral indükleyici moleküller olan noggin ve kordini salgılamaya başlarlar. Noggin ve kordin BMP-4'ün inhibitör etkisini bloke ederek yüzey ektoderminin uyarılmasını sağlar. Notokordun bu indükleyici etkisi ile yüzey ektoderm hücreleri çoğalarak, uzun kalın bir bant şeklinde nöral plağı oluştururlar. Notokordun gelişimi ile birlikte uzamaya ve genişlemeye devam eden nöral plak 18. günde invajine olarak nöral kıvrımların arasında nöral oluğu oluşturur. Üçüncü haftanın sonunda nöral kıvrımlar birbirlerine doğru uzanarak birleşmeye başlarlar ve nöral tüpü oluştururlar. Nöral tüpün oluşumu genler, ekstrinsik faktörler ve mekanik faktörleri de kapsayan bir süreçtir. Bir grup gen nöral tüpün kranial/kaudal polaritesini belirlerken, bir grup gen ve sinyal molekülü ise dorsal/lateral polariteyi belirleyerek sinir sisteminin doğru yönde gelişimini düzenlemektedir. Gelişimin ilerlemesiyle nöral tüp yüzey ektoderminden ayrılır. Nöral tüp oluşumu sırasında bazı nöroektodermal hücreler yüzey ektoderminden ayrılırlar. Nöral tüp için spesifik olan hücre yüzey moleküllerinin kaybıyla birlikte (N-CAM ve N-Kaderin) komşu hücrelerle bağlantılarını kaybederek nöral tüp ile yüzey ektodermi arasında yassı düzensiz bir kitle olan nöral kristayı oluştururlar. Çeşitli yönlerde doğru göç eden nöral krista hücreleri

mezenşim içinde dağılırlar ve çeşitli hücre ve dokulara farkedildikten sonra ise hücre adezyon moleküllerini yeniden eksprese etmeye başlarlar. Nöral krista hücreleri sinir sistemi ile ilgili olarak spinal gangliyonları (arka kök gangliyonları), otonomik sinir sistemi gangliyonlarını, bazı kranial sinir (V, VII, IX ve X) gangliyonlarını, periferik sinirlerin kılıflarını ve beyin ile medulla spinalisi saran meningeal zarları oluştururlar.

Nöral tüp MSS'ne farkedilirken, nöral krista hücreleri ise PSS ve otonomik sinir sisteminin büyük kısmını oluşturur¹³. Spinal sinirler, kranial sinirler ile kranial, spinal ve otonomik gangliyonlardan oluşan PSS'nin çoğu krista nöralis kökenlidir. Her bir nöron gövdesi modifiye Schwann hücre (SH)'leri olan satellit hücreleriyle sarılıdır. Periferik sinirlerin oluşumu medulla spinalisin bazal plağında bulunan motor nöroblastlardan aksonların uzamasıyla başlar. Büyüyen aksonlar büyüme konulu ile sarılıdır. Bu büyüme konulu gelen sinyal moleküllerine bağılı olarak akson uzunluğu ve gideceğı yön belirlenir. Yapılan son çalışmalar Hedgehog, Wnt ve BMP ailesi proteinlerinin aksonal büyümede rolleri olduğunu göstermekle birlikte, bu moleküllerin hücre iskeletini aksonların büyümesi için nasıl organize ettikleri bilinmemektedir.

Dördüncü haftanın sonunda medulla spinalisin bazal plaklarından çıkan motor sinir lifleri belirlemeye başlar ve gelişmekte olan bir kas grubuna doğru uzanan ventral sinir kökünü oluştururlar. Medulla spinalisin dorsolateraline göç eden nöral krest hücrelerinden farkedilen spinal gangliyon hücrelerinin aksonları ise dorsal sinir kökü liflerini oluştururlar. Spinal gangliyon hücrelerinin distal uzantıları ise ventral sinir köküne doğru büyüyerek ona katılır ve spinal sinirleri oluştururlar. Dorsal ve ventral primer ramuslara ayrılan spinal sinirlerin dorsal ramusları dorsoaksiyel kasları, vertebral eklemleri ve sırt derisini innerve ederler. Ventral primer ramuslar ise brakial ve lumbosakral pleksusları oluşturarak ekstremiteleri ve ön vücut duvarını innerve ederler¹³.

Sinir Sistemi

Sinir sistemi iç ve dış çevredeki değışikliklere vücudun sürekli olarak cevap vermesine olanak sağlar¹⁴. Sinir sistemi insan vücudunun en karmaşık yapısıdır ve 100 milyondan fazla sinir hücresinin (nöron) oluşturduğu bir iletişim ağıdır. Ayrıca sayıları nöronların 8-10 katına ulaşan glia hücreleri ve kan damarından zengin az miktarda bağı dokusu da içerir¹. Her nöron diğere nöronlarla ortalama olarak en az bin bağlantıya sahiptir ve bu yapı iletişim için çok karmaşık bir sistem oluşturur³.

Sinir sistemi anatomik olarak MSS ve PSS olmak üzere ikiye ayrılır. Kranial kavitede yerleşmiş beyin ve spinal kanalda bulunan medulla spinalis MSS'ni oluştururken, MSS'ne impuls iletimini sağlayan kranial, spinal ve periferik sinirler, MSS dışındaki sinir gövdeleri topluluğu olan gangliyonlar ve özelleşmiş sinir sonlanmaları ise PSS'ni oluşturur¹⁴.

Sinir sistemi fonksiyonel olarak somatik sinir sistemi ve otonom sinir sistemi olmak üzere ikiye ayrılır. Somatik sistem uyarılara karşı istemli olarak uygun cevaplar oluşturur. Vücudun hemen hemen bütün bölümlerine motor ve duysal innervasyon sağlar. Otonom sistem ise isteğimiz dışında çalışarak düz kas, kalp kası ve organların fonksiyonlarını düzenler¹.

Nöron

Sinir hücreleri veya nöronlar uyarıları alabilen, değiştirebilen, iletebilen, belirli hücre aktivitelerini başlatabilen, nörotransmitterler ve diğer bilgi moleküllerini üretebilen hücrelerdir. Nöronlar sinaps olarak bilinen özel alanlar aracılığı ile birbirleri ile bağlantı kurarak bilgi aktarımı yolu ile yaygın bir ağ oluştururlar. Nükleus ve çevresindeki sitoplazmadan oluşan hücre gövdesi soma veya perikaryon olarak adlandırılır. Nöron sitoplazmasına nöroplazma denir. Nöronlar uzantılı hücrelerdir. Hücre gövdesinden iki tür sitoplazmik uzantı çıkar. Gövdeden çıktıktan sonra sıklıkla dallanarak ilerleyen çok sayıdaki uzantılara dendrit, her nöron için bir adet olan daha ince uzantıya akson denir. Akson hücre gövdesinin koni şeklinde bir çıkıntısı olarak izlenen akson tepesinden başlar. Akson tepesinin apeksinden aksonu saran miyelin kılıfın görülmeye başladığı bölgeye kadar olan bölüm inisiyal segment olarak adlandırılır. Bu bölge aksiyon potansiyallerinin olduğu bölgedir. Aksonun plazma membranına aksolemma, sitoplazmasına aksoplazma denir. Akson hücre gövdesinden bir başka nörona veya efektör hücreye uyarı taşırken dendrit periferden gelen uyarıları hücre gövdesine taşır.

Nöronların oval veya yuvarlak şekilli geniş nükleusları genellikle perikaryonun ortasında yer alır. Hücrenin yüksek aktivitesinin bir göstergesi olarak nükleus ökromatiktir ve nükleolus belirgindir. Işık mikroskopik düzeyde perikaryonda ve dendritlerde bazofilik ve metakromatik olarak boyanan granüler materyal izlenir. Nissl cisimcikleri veya Nissl granülleri olarak isimlendirilen bu granüller elektron mikroskopik olarak granüllü endoplazma retikulumu (GER) dur. Perinüklear sitoplazmada ayrıca çok sayıda mitokondriyon, belirgin Golgi kompleksi, lizozom, mikrotübüller, nörofilamentler, vezikül ve inklüzyonlar

bulunur. Organelden zengin olmaları nöronların yüksek aktivitelerinin göstergesidir.

Aksoplazmada mitokondri, mikrotübül, nörofilament ve granülsüz endoplazma retikulumu (ER) bulunmasına rağmen, ribozom ve GER yoktur. Dendritler bir ağacın dalları gibi hücre gövdesinden ayrılan ve dallanma gösteren kısa uzantılardır. Dallanma nöronun reseptör yüzey alanını genişletir. Dendritlerde Golgi kompleksi hariç tüm organeller bulunur. Akson çapı perikaryondan çıktığı noktadan sonlandığı noktaya kadar aşağı yukarı sabittir. Bunun aksine dendritin çapı ise dallandıkça daralır.

Akson ve dendritin önemli kısmını oluşturan hücre iskeleti, nöronların asimetrik kurulumuna izin verir ve nöronal fizyolojide esansiyeldir. Nöronal hücre iskeleti mikrofilamentler, mikrotübüller ve ara filamentler olmak üzere üç tip hücre iskeleti elemanından meydana gelmektedir. Mikrotübüller ve mikrofilamentler nöronal gelişim ve nöronal hücre şeklinin kurulmasına, göç süreci, aksonal büyüme, sinaptik plastisite, proteinlerin ve organellerin hücre içi taşınması fonksiyonlarında rol oynar. Mikrotübüller birçok nörotoksik durumda hedefdir. Ara filament proteinleri ise hücre stabilitesini sağlayan hücre iskeleti komponentleridir^{15,16}.

Nöronların sentez aktivitesi büyük ölçüde hücre gövdesinde gerçekleştiği için sentezlenen maddelerin uzantılara gönderilmesi için bir transport sistemine ihtiyaç vardır. Aksonal transport çift yönlü gerçekleşen bir olaydır. Hücre gövdesinden akson ucuna, akson ucundan hücre gövdesine mikrotübül ve ara filamentler aracılığı ile moleküller ve bilgi taşınarak intrasellüler bir iletişim sağlanır¹.

Periferik Sinirler

PSS'nin varlığı ilk olarak MÖ 460-370 yıllarında Hipokrat tarafından tarif edilmiştir¹³. Bir periferik sinir (PS) sinir lifleri, gangliyonlar ve duyuşal veya motor son plaklarından oluşur. Duyuşal sinir (afferent) lifleri, periferden son plaklar (reseptörler) aracılığıyla alınan duyuları beyin-omurilik sistemine iletirler. Duyu sinirlerinin hücre gövdeleri dorsal spinal arka kökler içerisinde yerleşmiştir. Motor (efferent) sinirlerin hücre gövdeleri ise spinal kordun ön boynuzundadır ve buradan çıkarak kaslara (somatomotor) veya organlara (viseromotor) giderler. Afferent uyarılar arka boynuzdan, efferent uyarılar ise ön boynuzdan iletirler. Duyuşal ve motor sinirler içeren periferik sinirler, dorsal ve ventral spinal köklerin birleşmesinden oluşmaktadır. Duyuşal ve motor liflerin somatik

olanları kemik, iskelet kasları ve deri ile ilişkili olup, genel vücut duyusunu oluştururlar. Visseral olanları ise iç organlar, damarlar ve müköz zarlarla ilgilidir. Otonom sinir sistemine ait sinir hücreleri ise MSS içinde ve dışında bulunan çekirdek ve gangliyonlarda toplanmışlardır¹³.

PS'ler bir veya daha fazla akson demetinden oluşmuştur. Sinir lifi bir akson ve çevresinde yer alan kılıflardan meydana gelir. Sinir liflerine ait hücre gövdeleri MSS'inde veya gangliyonlarda yer alır. PSS'ne ait bütün aksonların çevresinde başlangıçlarından sonlanacakları yere kadar Schwann kılıfı bulunur. Schwann hücre kılıfı, SH'nin sitoplazmasıdır¹.

Orta büyüklükteki bir sinir, bazıları miyelinsiz, bazıları ise farklı kalınlıktaki miyelin kılıfları ile çevrelenmiş binlerce sinir lifini kapsar. Az sayıda miyelinsiz liften oluşan çok ince sinirler hariç sinirler, miyelin ve kollajen içeriği nedeniyle beyaz, homojen, parlak bir görünüm sergilerler³.

Periferik Sinirin Bağ Doku Tabakaları

PS'ler bağ dokusu tarafından çevrelenen sinir lifi demetleridir. Bağ dokusu periferik sinirin %21–81'ini oluşturur. Eklem bölgelerinde bu oranın arttığı bilinmektedir. Bağ dokunun görevi periferik siniri korumak ve beslemektir¹⁷⁻¹⁹.

PS bağ dokusu temel olarak dört ayrı tabakadan oluşur. Bu tabakalar en dıştan içe doğru; mezonöryum, epinöryum, perinöryum ve endonöryum olarak sıralanmaktadır. Mezonöryum tabakası, PS gövdesini saran ve sinirin etrafındaki dokulara göre kolayca hareketini sağlayan gevşek yapılı bir bağ doku tabakasıdır¹⁹.

Sinirler dıştan epinöryum adı verilen sıkı bağ dokusundan oluşan fibröz bir tabaka ile sarılmıştır^{20,21}. Mezodermden köken alan epinöryum periferik sinir kesitinin %30-70'ini oluşturur. Bir periferik sinirde ne kadar fasikül varsa epinöryum o kadar kalındır. Epinöryum aynı zamanda sinir lifleri arasındaki boşluğu da doldurur. Kan damarları sinir boyunca epinöryumda seyrederek. Hematoksilen eozin (HE) ile boyalı kesitlerin incelenmesinde epinöryumun yoğun kollajen lif, fibroblast ve kan damarlarından oluştuğu görülür. Ayrıca adipositler, mast hücreleri, histiyositler ve lenfatik damarlar da bulunur. Epinöryum, bölgesel lenf nodlarına açılan lenf kanalları içerir^{20,22}.

Epinöryumun internal bileşeni fasikülleri ayırarak birbiri üzerinde kaymasına izin verirken eksternal bileşeni ise periferik siniri dış etkenlerden koruyan bir yastık görevi görür. Bu nedenle, eklem bölgelerinde daha kalın bir

yapıya sahiptir. Perinöryum ile karşılaştırıldığında gerilim kuvvetine karşı direnci düşüktür^{22,23}.

Sinir liflerinin bir araya gelmesiyle fasiküller meydana gelmektedir. Bu yapılar perinöryum tabakası ile çevrilidir. Perinöryum dairesel, boyuna ve çapraz yerleşim gösteren kollajen liflerden oluşan ince fakat kuvvetli bir bağ doku tabakasıdır. Perinöryum sıkı bağlantılarla birbirlerine tutunmuş hücre tabakalarından oluşur ve kalınlığı sinir lifinin çapına bağlıdır. Hücreler arasındaki sıkı bağlantı kompleksleri kan-sinir bariyeri (KSB)'nin temelini oluşturur^{14,19}.

KSB'ni oluşturan elemanların birisi de endonöryumdaki kapillerlerin endotel hücreleridir. Metabolik olarak aktif bir difüzyon bariyeri olması nedeniyle osmotik dengenin sürdürülebilmesi ve endonöryum içindeki sıvı basıncının korunmasında önemli rol oynamaktadır^{17,22,23}. Ana görevi çevrelediği fasikülleri korumak olan perinöryum el bileği gibi bazı bölgelerde kalın bir yapıya sahip iken dirsek gibi yapılarda daha ince bir yapıya sahiptir. Bir sinir gövdesinin gerilim kuvveti ve esnekliği endonöryum ve epinöryumdan daha çok perinöryuma bağlıdır. Perinöryum sağlam olduğu sürece sinirin elastikliği ve bütünlüğü korunur¹⁹.

Perinöryum kılıfının içinde tek tek aksonları ve SH'lerini çevreleyen gevşek bağ doku yapısında endonöryum bulunur. Endonöryum rutin hematoksilen eozin ışık mikroskopi preparatlarında ayırt edilemezken, özel bağ doku boyaları ile ayırtedilebilir. Yapısında kollajen ve retiküler lifler, fibroblastlar, makrofajlar, mast hücreleri ve kapiller damarlar bulunur. İçerdiği uzun yerleşimli tip I kollajen sayesinde gerilmeye karşı kuvvetli bir yapı haline gelir. Sinirde bulunan endonöral damarlar, SH'lerini ve miyelini sarar. Endonöryumun fibröz ve hücreli komponentleri endonöral sıvı ile çevrilidir. Endonöral sıvı basıncı, çevre doku basınçlarına göre daha yüksektir. Bu fark sayesinde akson kendisine zarar verecek toksik maddelerden uzak tutulur^{14,22,24}.

Schwann Hücresi

SH'leri periferik sinir sisteminin majör glial hücreleridir, sinir hasarında rejenerasyonun başarılmasında ve fonksiyonların yeniden kazanılmasında vazgeçilmezdir²⁵. Olgun PSS'nde miyelini yapan SH'leri, miyelini yapmayan SH'leri, nöromusküler kavşağın perisinaptik SH'leri ve nöronların hücre gövdelerini çevreleyen uydu (satellit) hücreleri bulunur²⁶. SH'leri nöral krest kökenlidir. Nöral krest hücrelerinden SH meydana gelmesi Sox 10

transkripsiyon faktörü gerektirir. SH prekürsörleri doğumdan önce ilk olarak immatür SH'lerini oluşturur. Bu immatür SH'lerinin postnatal akibeti ilişkide oldukları akson çapına bağlıdır. SH'leri büyük çaplı aksonlarla ilişki kurarsa miyelin yapan SH'lerine farklılaşır, küçük çaplı aksonlarla karşılaşan SH'leri ise miyelin yapmayan SH'leri olarak kalır. Bu son basamak SH'lerinin yaşamları boyunca geri dönüşümlüdür. Bu durum dikkat çekici şekilde akson kaynaklı sinyallere bağlıdır, fakat anahtar sinyal belirlenememiştir. Transkripsiyon faktörü Krox-20 SH'nin miyelin yapımı için vazgeçilmezdir²⁵.

Son çalışmalar, SH'nin miyelin yapımına başlamasında aksomal kalınlık kadar aksomal yüzeyden eksprese edilen nöroregulin 1 tip III miktarında belirleyici olduğunu göstermiştir. Farelerde, transkripsiyon faktörü Sox 10 veya nöroregulin-1 sinyalinin inaktive edilmesi SH prekürsörleri ve sonraki SH'lerinde kayıplara neden olmaktadır. Buna çok sayıda motor nöron ve dorsal kök gangliyon nöronlarındaki ölümün eşlik etmesi, nöronların gelişmekte olan glialardan kaynaklanan yaşam sinyallerine bağımlı olduğunu akla getirir. Miyelin temel olarak; MSS beyaz cevheri ve geniş motor aksonlar içeren periferik sinirlerde bulunan, lipid ve proteinden oluşan bir membrandır²⁷.

SH'nin bazal lamina ve akson arasında yerleşmesi miyelinizasyon sürecindeki ilk ve en önemli basamaktır. SH'leri siniri gruplar halinde çevreler ve periferik sinir lifi demetindeki miyelin kılıf yapacağı akson ile ilişki kurarak miyelin kılıfı yapmaya başlar. SH aksomal membrana hücre adhezyon moleküllerinden nectin-like (Necl4 veya SynCAM) aracılığı ile bağlanır. Yapılan son çalışmalarda akso-glial yüzde Necl çifti tanımlanmıştır. Necl4 (SynCAM4) SH'de ve Necl1 (SynCAM3) aksomal membranda SH-akson bağlantısında önemli rol oynar²⁸. Necl4 akson-glial arayüz boyunca miyelin ilişkili glikoprotein ile birlikte kümelenmiştir. Bu bölge gelecekte internoda şekillenir. Neurofascin 155, TAG-1 ve gliomedin SH membranının akson yüzünde bulunur ve ranvier nodu etrafında SH-akson etkileşiminde önemlidir. SH plazma membranı yalnızca radyal değil longitudinal boyutta da polarizedir. Longitudinal olarak aksonun tamamen miyelinizasyonu miyelin membranının polarizasyonunun kanıtıdır²⁸. SH'nin yüzey membranı aksonun çevresine spiral şeklinde sarılmıştır. Böylece miyelin lameller tabakalar halinde yerleşmiştir²⁷.

Miyelin kılıfın oluşması esnasında, her bir akson etrafında 50'ye kadar ulaşabilen sayıda dönüş yapılır. Akson ilk olarak SH'lerinin yüzeyindeki bir oluşun içinde uzanır. Aksonu çevreleyen oluşun kenarlarının birleşmesiyle, en

içteki halkanın intersellüler boşluğu daralır ve iç mezakson oluşur. İlk lamel, sıkı bir şekilde düzenlenmemiştir, yani ilk birkaç tabaka içinde bir miktar sitoplazma vardır. Aynı şekilde en dıştaki tabaka da Schwann hücre nükleusu ile bir miktar sitoplazma içermektedir. Son tabakanın plazma membranının kendine yaklaşır şekildeki pozisyonu, dış mezaksonu oluşturur. SH aksonun etrafını sararken, sitoplazma SH'nin ortak merkezli dönen membranları arasında sıkışmış olarak kalır. Daha sonra plazma membranının iç tabakaları birleşir. Elektron mikroskopik inceleme ile iç tabakaların bu birleşme yerleri, kalın yoğun çizgiler şeklinde olan opak bir bölge şeklinde görülür. Bu yoğun koyu lamelleri, dış membran yapraklarının birleşmesiyle oluşan, daha az yoğun olan intraperiod bölgeler takip eder¹⁴.

Aksonun miyelinize segmentleri, "Ranvier düğümleri" olarak isimlendirilen düzenli bir şekilde yerleşmiş miyelin içermeyen alanlar ile birbirinden ayrılmaktadır¹. Ranvier düğümleri, Na⁺ ve K⁺ iyon kanalları bakımından zengindir. Aksiyon potansiyellerinin sıçrayarak ilerlemesine (saltatorik iletim) ve böylece uyarının hızlı bir şekilde iletilmesine yardımcı olurlar. Bu birbirini takip eden düzenlenme aynı çaptaki miyelinsiz akson boyunca olan impuls iletimine göre yaklaşık on kat fazladır²⁷.

Miyelinli aksonlar yalnızca Ranvier düğümlerinde dış ortamın etkisi altındadır. Miyelin kılıf aksiyon potansiyelinin hızlı iletilmesinin yanında aksonal bütünlüğü de sağlar. Miyelin yapan glia hücresinden kaynaklanan sinyaller, aksonal membranda hızlı iletim için esansiyel olan nod ve paranodlarda iyon kanallarının dağılımı gibi özelleşmeleri uyarır. Miyelinli liflerde her akson tek bir SH tarafından sarılırken, miyelinsiz liflerde bir SH birden fazla aksonu çevrelemektedir^{2,28}.

Miyelin kompozisyonu hücre yüzeyine veya hücre içi membranlara göre daha fazla lipid içerir. PS'de miyelinin içeriği %70-85 lipid %15-30 proteindir. Miyelin kılıf unsature yağ asit zincirleri içerir^{9,27}. Miyelin kılıfını oluşturan lipidlerin bileşiminde kolesterol %25, galaktolipid %29 ve fosfolipidler %46 oranında bulunmaktadır. Galaktoserebrozid miyelindeki major galaktolipiddir²⁷.

Periferik Sinir Lifi Tipleri

PS'ler içerisinde taşıdıkları bilgilerin içeriğine, önemine ve vardıkları noktalara göre çeşitlilik gösteren birçok lif bulunmaktadır. Bu lifler özelliklerine göre A, B ve C grupları olarak sınıflandırılmıştır. A tipi lifler motor ve duysal liflerdir. A liflerinin çapları çok büyüktür ve miyelinli somatik afferent lifleri ve

iskelet motor liflerini içermektedirler. Miyelin tabakasına sahip olmaları nedeniyle sinir iletimi daha hızlı olmaktadır²⁹. B tipi lifler daha küçük çapa sahiptirler. Bu lifler A tipi liflere göre iletim hızı olarak daha düşük bir değere sahiptir. Otonomik sinir sistemine ait pregangliyonik motor lifleri içermektedirler. C tipi lifler ise A ve B liflerine göre oldukça küçük bir çapa ve iletim hızına sahiptirler. Pregangliyonik ve postgangliyonik otonomik motor ve duysal lifler gibi miyelinsiz afferent lifler C tipi lifler için birer örnektir².

Periferik Sinir Vaskülarizasyonu

PS'ler, impuls iletimi ve aksonal transport için sürekli bir enerji gereksinimi içindedir. PS kanlanması durması sinir fonksiyonunun hızla bozulmasına yol açar. Bir PS'in kesilmesi sonrası uyarılabilirlik 3-8 gün sürdüğü halde, tam iskemi altında kalması sonucu yarım saat içinde tüm ileti fonksiyonu durur³⁰⁻³⁵.

PS'ler ekstrensek ve intrinsek mikrovasküler sistemlerle beslenen ve vaskülarizasyonu iyi olan yapılardır. Ekstrensek sistem, rejonel büyük arter ve venlerden gelen dallardan oluşur. Ekstrensek sisteme ait damarlar, siniri çevreleyen gevşek bağ dokusu (mezonöryum) içinde ilerlerler. Lokal besleyici damarlar epinöryuma ulaştınca inen ve çıkan dallara ayrılarak intranöral intrinsek vasküler sistemle anastomozlar yaparlar³⁶⁻³⁸. İntrinsek mikrovasküler sistem epinöral, perinöral ve endonöral pleksuslardan ve aralarındaki kommunikan dallardan oluşur. İntrinsek mikrovasküler sistem epinöryum içinde uzunlamasına ilerler ve ekstrensek damarlardan segmental dallar alır³⁹.

İntrinsek vasküler sistemin ana longitudinal damarları epinöryumda yerleşiktir. Epinöral pleksusta çok sayıda ve longitudinal uzanan arteriol ve venüller yer alır. Bu damarlar perinöral ve endonöral pleksuslara çok sayıda kommunikan dal ile bağlantılıdır. Daha sonra perinöryum içinde vasküler pleksuslar oluşur. Bu damarlar endonöral boşluğa karakteristik bir şekilde oblik olarak girerler. İntrinsek ve ekstrensek sistemler birbirleriyle denge içindedir ve her biri diğerindeki fonksiyonel bozuklukları kompanse edebilir^{32,40,41}.

Sıçan Siyatik Siniri Vasküler Anatomisi

Sıçanlarda siyatik sinirin damarlanması, medulla spinalisten çıktıktan ve pelvise girdikten sonra, A. Glutealis inferior ve eşlik eden venler tarafından sağlanır. İnferior gluteal arter, posterior mezonöryumda arteria komitansı (nervi ischiadici) oluşturarak sinirde kanlanmayı gerçekleştirir. Sıçan siyatik sinirinin ikinci büyük kanlanma kaynağı A. poplitea ve genellikle popliteal arter yanındaki

iki popliteal vendir. Popliteal arter siyatik sinire uyluk distali ve diz eklemi hizasında ulaşır ve bu düzeyde aşağı ve yukarı dallar göndererek siyatik sinirin uyluk 1/3 distalinden itibaren, trifurkasyon dahil, aşağıya kadar kanlanmasının tamamına yakınıni gerçekleştirir. Yapılan mikroradyografik çalışmalar ve disseksiyonlarda %40-50 sıklıkla uyluk 1/3 orta bölümde bir intermediat arterin siyatik sinirin kanlanmasını sağladığı saptanmıştır⁴²⁻⁴⁵.

Sıçan Siyatik Sinirinin Bölgesel Kan Akımı

1905 yılında Okada, yalnızca inferior gluteal arterin bağlanması tüm siyatik sinirde iskemik dejenerasyon yaratacağını öne sürmüştür. Sonraki deneysel çalışmalarda Okada'nın bulguları doğrulanmamış ve siyatik sinirin intrinsek ve ekstrinsek dolaşımından birisinin tıkanması halinde diğerinin kompensasyon için yeterli olabileceği vurgulanmıştır. Hess, iliak arter ligasyonunu ve sonra Myers, epinöryumun disseksiyonu sonrasında oluşan değişiklikleri incelemiştir. Nukada'ya göre sıçan siyatik siniri beslenmesini femoral ve internal iliak arterler ile sağlar. İnternal iliak arter ligasyonu sonucunda siyatik sinirin pelvik bölge ve uyluk bölgesinin 1/3 üst ve 1/3 orta bölümlerinde kan akımı önemli ölçüde azalmıştır. Femoral arterin ligasyonu uyluğun 1/3 alt bölümünde ve bunun distalinde kalan siyatik sinir trifurkasyonu ile bunun tibial, peroneal ve sural dallarında tam bir iskemiye yol açmıştır. Femoral arter ligasyonu siyatik sinir kan akımında en şiddetli azalmaya yol açarken, iliak arter ligasyonu orta derecede azalmaya neden olmaktadır. Sladky, femoral arter ligasyonu sonucu siyatik sinirin izlediği yol boyunca regional kan akımı değişikliklerini ortaya koymuştur⁴⁶⁻⁵².

Periferik Nöropati

Yüzden fazla periferik nöropati tipi saptanmıştır. Nöropati nedenleri genetik, metabolik, enfeksiyöz, immun aracılıklı, vasküler, ilaç ve toksin kaynaklı, maligniteyle ilişkili ve basıya bağlı veya travmatik olarak kategorize edilebilir. Lezyon distalinde aksonda harabiyet vardır. Aksondaki harabiyette SH'leri yaşadığı için sinir rejenerasyonu mümkündür. Farklı nöropatilerde patolojik değişikliklerin gelişmesinde iskemi majör rol oynar⁷.

Polinöropatileri oluşturan hastalık süreçleri ön planda hücre gövdesini etkiliyorsa nöronopati, başlıca akson hasarına neden oluyorsa aksonopati ve sinir liflerinin miyelin kılıfı primer olarak hasara uğruyorsa miyelinopati söz konusudur⁵³.

Periferik Sinir İskemisi

PS iskemisini takiben kan akımının yeniden başlaması oksidatif strese bağlı sinir hasarı ve kan sinir bariyerinin bozulması ile sonuçlanır. PS'ler uyarıların iletimi ve aksonal transportu desteklemek için sürekli enerjiye ve yüksek metabolik aktiviteye ihtiyaç duyarlar. Kan akımında kesilme iletimin aksamasına neden olur. İmpuls iletimi ve aksonal transport intranöral mikrosirkülasyon ile sağlanan aralıksız enerjiye bağlıdır. Kan sirkülasyonunun kesintiyi takiben hızlı düzelmemesi aksonal ölümle sonuçlanır^{54,55}.

Geçici iske mi periyodundan sonra kan akımının yeniden başlaması reperfüzyon hasarına sebep olabilir. Reperfüzyon hasarı aşırı Ca^{++} yüklenmesi, serbest yağ asitlerinde yükselme, extrasellüler asidozis, kapiller permeabilitede artma, kan sinir bariyerinde bozulma, NO metabolizmasının bozulmasına neden olur⁵⁴. Buna ek olarak reperfüzyon sinirde oksidatif strese neden olur ve serbest radikal oluşumu hücrenin savunma mekanizmalarını bozar⁵⁵.

İskemik sinir hasarı segmental demiyelinizasyon, endonöral ödem, iletimde bozulma, aksonal dejenerasyon ile multifokal veya diffüz sinir lifi kaybını içerir⁵⁴. Diyabetes mellitus, vasküler oklüziv hastalıklar, nekrotizan vaskülitler ve travma sadece periferik sinir iskemisi ile ilgili nöropatiye neden olan birkaç patolojik durumdur. Son yıllarda yoğun olarak siyatik sinirde oluşturulmuş İR incelenmiştir⁵⁶.

ROS kaspaz kaskadının tüm basamaklarının aktivasyonunda rol oynar. ROS mitokondri dışında sfingomiyelinazı aktive ederek seramid üretimine neden olur ve granülositlerde hücre içi apoptoz mediatörüdür. Fas reseptörlerinin ROS ile uyarılması da apoptozu uyarır. ROS mitokondrial membran potansiyelinde bozulmaya neden olarak mitokondrial porlardan sitokrom C'nin serbestleşmesine katkıda bulunur⁸.

Normal dokular iskemik hasara karşı çok sayıda defans mekanizmasına sahiptir. PSS'de bol miktarda bulunan lipidden zengin miyelin reperfüzyon esnasındaki serbest radikal aracılı lipid peroksidasyonunun hedefidir. İR ile ilişkili toksik substanslar dokulardaki koruyucu sistemleri bozar ve ROS'nin dokuda birikmesine neden olur^{7,54}.

İR miyelinli liflerde daha fazla hasara yol açar. Lif dejenerasyonu endonöral ödem ile ilgilidir. Aksonda çekilme (büzüşme) ve şişme görülür. Çarpıcı morfolojik değişiklikler elektron mikroskopik incelemede miyelin kılıfta vakuolizasyon ve delaminasyon şeklinde görülür. Bazı liflerde belirgin total

akson yıkımı ve bal peteği görünümü açıktır. SH'de de dejeneratif değişiklikler görülür. Miyelinsiz liflerde ise ödem ile birlikte vakuolizasyon ve dejenerasyon olur⁷.

Akson Dejenerasyonu

İskemik, nörodejeneratif veya nöroinflamatuvar hastalıkları içeren nöropatiler gibi çok sayıda nörolojik hastalık lokal akson patolojisi ile karakterizedir. Birçok sinyal yolağı aksonal dejenerasyona yol açar. Ancak bu yıkıcı süreçteki mekanizma henüz anlaşılammıştır⁵⁷⁻⁵⁹.

Aksonun selektif dejenerasyonu çeşitli metabolik, toksik ve inflamatuvar hastalıkları içine alan hasar durumları ve normal gelişim sırasında ortaya çıkan nöron ölümü olmaksızın ortaya çıkar. Akson dejenerasyonu aktif ve düzenlenmiş self-destrüksiyon programıdır ve apoptoza benzer. Akson dejenerasyon programının moleküler yapısı ve nasıl kontrol edildiği tartışmalıdır. Selektif akson dejenerasyonu multiple skleroz ve AIDS gibi çeşitli hastalıklarda klinik olarak önemlidir⁵⁶.

Aksonopati seçici akson dejenerasyonu ile karakterizedir fakat nöron hücre gövdesi üzerinde belirgin değildir. Aksonopati toksik maddeye maruz kalma sonucu (akrilamid, organofosforlar) ve diyabet gibi hastalıklarda görülür. Wallerian dejenerasyon klasik aksonal dejenerasyona örnektir ve hücre gövdesinden ayrılan distal aksonda meydana gelen olaylar dizisidir. Aksonal hücre iskeletinde hızlı kırılma, mitokondri dejenerasyonu, mikroglia ve makrofaj toplanması gerçekleşir.

Aksonopatinin diğer formu dying-back nöropati veya distal aksonopatidir^{60,61}. Dying-back nöropatide sıklıkla hücre gövdesi kaybından önce aksonal patoloji belirgindir. Bunun nedeni hücre gövdesinin akson distali için gerekli proteinleri ya da enzimleri üretememesi veya aksonal transport sistemindeki bozukluk olabilir⁵⁶. Bu süreçte distalden başlayıp proksimale ilerleyen aksondaki patoloji progresif olarak nöronu dejenerasyona uğratır. Sistemik metabolik bozukluklar, toksinler ve bazı kalıtsal nöropatiler sinir hücresinde metabolik düzensizlik oluşturur.

Gelişim sırasında ve hasardan sonra nöritlerde (akson ve dendritlerde) otodestrüksiyon ortaya çıkar. Bu süreç aksonal mikrotübüllerde ve nörofilamentlerde bozulma ve aksonal fragmentasyonu içerir⁶².

İR nöronal ödem, KSB'de bozulma, sinir lifi dejenerasyonu, sinir iletim hızında azalma, membran lipidlerinde peroksidasyon, serbest radikal birikimi

gibi değişikliklere neden olur. İR hasarında biyokimyasal değişiklikler ve aksonal hasar kan örnekleri ve sinir biyopsilerinde gösterilmiştir. Çeşitli periferik vasküler hastalıklar, artroma, toksik metabolit birikimi diyabet gibi durumlarda nöronal kan akımının ve nöronal fonksiyonların değiştii deneysel çalışmalarda ve hastalarda benzer şekilde gözlenmiştir. Nöronal kan akımında ve nöronal fonksiyonlardaki değişim nöropatik hastaların yaşam kalitelerinde kısmi ve/veya kalıcı bozulmaya neden olmaktadır⁵³.

Ekstrasellüler Ca^{++} 'un kanal aracılığı ile hücre içine girişi aksonal dejenerasyonun başlaması için kritiktir⁵⁸. İntraaksonal Ca^{++} seviyelerinin artışı ve Ca^{++} bağımlı hücre iskeletinin yıkımı sonucunda lokal aksonal yaşam faktörlerinin ekspresyonunun bozulması akson dejenerasyonunun nedeni olarak ileri sürülmektedir. Ca^{++} girişi iyon spesifik mekanizma üzerinden aksonal dejenerasyonda erken basamaktır ve kalpain aktivasyonuna öncülük eder. Akut aksonal dejenerasyonda primer mekanizma kalpainin Ca^{++} bağımlı aktivasyonudur. Spektrin ve tubulin gibi mikrotübül ile ilgili komponentler ve nörofilamentler kalpaine duyarlıdır^{56,58,63}.

Hücrede global apoptotik yolağın aktivasyonu için lokal kaspaz aktivasyonu gerekli değildir. Ancak örneğın sinir sonlanmaları, aksonlar ve dendritler gibi hücrenin farklı bölümleri toksik saldırılara karşı daha hassastır ve bu bölgelerde başlayan apoptotik sinyallerin somaya yayılması sonucunda apoptotik sinir hücresinin ölümü gerçekleşir⁶⁴.

Sinir iskemisi bu patolojik anormalliklerin gelişmesinde anahtar rol oynar. Ağrı ve hissizlik gibi nöropatik semptomlar iskemik uzuvda sıklıkla başlangıç semptomlarıdır ve kısa süreli uzuv iskemilerinde görülür. Post iskemik semptomlar kan akımının yeterli miktarda geri dönmesine karşın aylarca sürebilir ve reperfüzyonun yeniden başlaması sonucunda sinir hasarı düzelebilir. Daha önceden yapılan çalışmalarda reperfüzyonun çeşitli dokularda iskeminin etkisini genişlettiği öne sürülmüştür.

Epinöral, endonöral mikrodamarların ve venüllerin yapısında bulunan endotelial hücrelerde ve perisitlerde şişme sıklıkla uzun süren iskemi ile reperfüzyon periyoduna sekonderdir. Sinir iskemisi demiyelinizasyona yol açarken reperfüzyon miyelin kılıfta selektif hasara neden olur.

Reperfüzyon hasarında altta yatan olası mekanizmalar serbest radikal üretimi, sitokinler gibi kemotraktan mediatörlerin serbestleşmesi ve nötrofillerin aktivasyonunu kapsar. ROS üretimi nötrofil aktivasyonuna yol açar. Nötrofiller

reperfüzyonun yol açtığı öldürücü hücre hasarında rol oynar. İR hasarında lökositlerin adherensi endotel hasarına yol açar. İR'da endotel hücreleri ve perisitlerde meydana gelen şişme vasküler lümen çapını daraltır ve yeniden kan akımı olduğunda kan akımına direnci artırır. İR sinirde endotelial serbest radikal üretimi, perivasküler demiyelinizasyon ve sinir ödeminin özellikle de intramiyelik ödemin başlamasında tetikleyici mekanizmadır. İntramiyelik ödem miyelin lamellerinin intraperiyot çizgilerden ayrılmasına neden olur. Bu patolojik bulgular farklı dokulardaki oksijen radikallerinin neden olduğu hasarla benzerlik gösterir⁹.

Apopitoz

Hücre ölümü, morfolojik ve biyokimyasal özellikleri ile açıkça ayırt edilebilen apopitoz ve nekroz olarak iki şekilde gerçekleşir⁶⁵. Apopitoz terimi ilk kez Kerr ve ark. tarafından 1972 yılında kullanılmıştır⁶⁶. Fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde görülen yoğunlaşmış kromatin parçaları nedeniyle büzüşme nekrozu adı verilmiştir^{66,67}. Bu olayın dokularda tek tek hücre kaybına sebep olduğundan latince ayrı düşmek anlamına gelen apopitoz denmiştir (Apo; ayrı, Ptozis; düşmek). Apopitoz genetik olarak kontrol edilen fizyolojik mekanizmalarla düzenlenir. Normal embriyonik gelişimde ve yetişkin doku homeostazisinin korunmasında önemlidir. Apopitoz önceleri hücre ölümünün fizyolojik bir şekli olarak düşünülmesine rağmen toksinler, nörolojik hasar ve dejeneratif nörolojik hastalık modellerinde patolojik hücre ölümüne de aracılık ettiği bildirilmiştir⁶⁶⁻⁶⁸.

Büyüme faktörlerinin geri çekilmesi, sitokinler, hücre içi Ca⁺⁺ miktarındaki artış, Tümör Nekroze Edici Faktör, Değiştirici Büyüme Faktörü β , Fas Ligand (Fas/FasL) sisteminin aktive olması, DNA hasarı nedeniyle bir tümör supresör gen olan p53'ün aktive olması, viral-bakteriyal enfeksiyonlar ve glukokortikoidler apopitozu etkileyen uyarılardan bazılarıdır. Ayrıca hipertermi, radyasyon, sitotoksik antikanser ilaçları ve hipoksi gibi nekroz oluşturabilen etkenler de apopitozu tetiklemektedir^{69,70}.

Apopitozun indüksiyonu, hücre yüzey ölüm reseptörlerinin uyarılması, Sitokrom c'nin salıverilmesi, apoptozom oluşumu (sitokrom c + apoptozis aktive edici faktör 1 (Apaf-1) + kaspaz-9), mitokondriyal transmembran potansiyelinin değişmesi, kaspazların aktivasyonu, fosfotidilserinin hücre membranının iç yüzünden dış yüzüne yer değiştirmesi, DNAaz'ın aktivasyonu sonucu DNA'nın fragmentasyonu (internükleozomal DNA fragmentasyonu) ve yapısal

proteinlerin yıkılmasına bağılı olarak apopitoza özgü morfolojik değişikliklerin meydana gelmesi apopitozun basamaklarını oluşturur⁷¹.

Nükleer kondensasyon (piknozis), nükleer fragmentasyon (karyoreksis), normal görünümde sitoplazmik organeller ve intakt plazma membranı apopitozda görülen hücrenel değişikliklerdir. Piknotik nükleus yarım ay veya hilal şeklinde görülür. Nükleer fragmentasyonu takiben, membranla çevrili apopitotik cisimcikler hücreden ayrılır ve komşu epiteliyal hücreler ve makrofajlar tarafında fagositoz ile yutulur⁶⁷.

Nekroz, fiziksel veya kimyasal uyarıların etkisi ile gerçekleşen patolojik bir süreçtir. Hücrenin parçalanması ve toksik bileşenlerin serbestleşmesi ile karakterizedir. Bu süreç genellikle inflamasyon, vasküler hasar, çevre doku hasarı ve fibrozis ile sonuçlanır. Apopitoz ve nekroz dokularda ve hücre kültürlerinde aynı uyarana maruz kalmakla aynı anda ortaya çıkabilir. Sonuç olarak, hücre içi ATP konsantrasyonu ve mitokondriyal fonksiyonların durumu hücrenin ölüm biçiminde kritik faktördür⁶⁷.

Kaspazlar

Kaspazlar hücre ölüm yolağında apopitozda asıl rolü oynayan, sistein proteaz ailesini oluştururlar. Sitoplazmada normalde inaktif proenzimler olarak bulunurlar. Kaspazlar mitokondride membran hasarı oluşturur. Enzimler, inaktif proenzimler olarak sentezlenirler (prokaspaz). Proteolizisten sonra aktifleşirler. Kaspazların aktivasyonu ve inaktivasyonu apopitoz inhibitör proteinler ve kalpainler gibi diğer faktörlerle de kontrol edilir. Kaspazlar; sitokin üretimine katkıda bulunanlar (kaspaz 1,4,5,13), proteolizisi "başlatıcılar" (kaspaz 2,8,10) ve "uygulayıcılar" (kaspaz 3,6,7) olarak sınıflandırılırlar⁷²⁻⁷⁴.

Ölüm sinyali veren başlatıcı kaspazlar, adaptöre bağlanırlar ve hücreyi apopitoza yönlendirirler. Ancak başlatıcı kaspazlar apopitozu gerçekleştirmez ancak gerçekleştirecek olan kaspazları aktifleştirirler. Apopitozu gerçekleştiren uygulayıcı (effektör) kaspazlardır. Uygulayıcı kaspazlar, başlatıcı kaspazların akışını aktive ederler. Apopitotik programın merkezi bileşeni kaspazlardır. Kaspaz aktivasyonu hücreye özgüdür ve kaspaz inhibitörlerinin efektör kaspazları inhibe ederek apopitozu engellediği gösterilmiştir. Ayrıca apopitoz inhibitör protein (IAP) ailesinin kaspazlardan ayrı olarak, transkripsiyon faktörlerinin modülasyonu ve hücre siklusunun kontrolünde de yer alarak apopitozu inhibe ettiği bilinmektedir. Bu inhibitörler malign hücrelerde yüksek düzeyde eksprese edilmektedir. Kaspazlar, proteinleri yalnızca aspartik asit

bulunan bölgelerden keser. Böylece kaspazların kısıtlı proteolizisi nedeniyle, hücrede lizis şekillenmez ve apoptotik cisimcikler oluşur^{75,76}.

Kaspaz Aktivasyonu

Ölüm reseptörlerinin aracılık ettiği ekstrinsik yolak ve mitokondrinin aracılık ettiği intrinsik yolak olmak üzere kaspazlar iki yolak üzerinden aktive olur. Ekstrinsik yolak, Fas ligandı ve TNF gibi hücre ölüm sinyallerinin Fas ve TNF reseptörlerine spesifik olarak bağlanması ile plazma membranından başlar. Prokaspaz 8/10 kompleks multiprotein yapısındadır ve Fas veya TNF reseptörleri ile birleşmiş ölüm bölgelerinde ölümü başlatan kompleks sinyaller oluşturur. Aktifleşen kaspaz 8/10 aktif efektör kaspazlardır ve apoptozda hedef proteinlerin bölünmesine öncülük ederler. Kaspaz 8 mitokondri ile ilişkili yolda Bcl-2 ailesinin üyesi olan Bid'i aktive eder. tBid mitokondriyal yolağın aktifleşmesini tetikler. Bu apoptozu uyaran yollar arasındaki sinyal geçişleri sonucunda, ölüm reseptörlerinin aracılık ettiği yolak mitokondriye yayılır. Mitokondri aracılı yolda, hücre stres ve proapoptotik proteinlerin aktivasyonu sonucunda mitokondriden sitokrom c serbestleşir. Sitolozde, Apaf1, pro-kaspaz-9 ve ATP varlığında sitozolik apoptozom kompleksini oluşturur. Sonuçta, prokaspaz 9 ve daha sonra pro kaspaz 3 aktive olur⁷⁷. Apoptozda kaspaz aktivitesini kontrol eden çok sayıda mekanizma vardır. Bcl-2 ailesi proteinleri apoptozda esas düzenleyici faktörlerdir ve iki gruba ayrılırlar. Grup I proteinler anti apoptotik proteinlerdir (Bcl-2 ve Bcl-xL) ve esas fonksiyonları pro apoptotik proteinleri inhibe etmektir. Grup II proteinler pro apoptotik proteinlerdir (Bid, Bax ve Bak). Sitoplazmada lokalize olan Bax ve Bak proteinleri, hücre hasarı ve apoptoz sinyaline cevap olarak sitoplazmadan mitokondriyal dış membrana transloke olurlar ve voltaj kapılı anyon kanalları'nın (VDAC) açılmasını kolaylaştırır. Bu değişiklik MMP kaybına neden olur ve sitokrom c serbestleşir. Buna karşın, anti apoptotik Bcl-XL VDAC'a bağlanarak kanalı kapatır. tBID'in proapoptotik aktivitesi Bax ve Bak'ın oligomerizasyonunu tetikler⁷⁸. Ca⁺⁺'un neden olduğu streste MPT porları açılır ve sitokrom c sitozole serbestleşir⁷⁹.

Kalpaine benzer şekilde, kaspazlar da hücre iskeleti proteinleri, sinyal transdüksiyonu sağlayan enzimler, hücre siklusu proteinleri ve nükleer DNA onarım proteinlerini içeren sınırlı sayıda hücre protein substratına sahiptir. Hücre iskeletinin kaspazlar tarafından parçalanması hücre morfolojisinde değişikliklere yol açar⁷⁹.

Aktif kaspaz-3 aksotomiyi takiben dejeneratif nöronlarda eksprese edilir⁷⁷. HIV ile ilişkili periferik nöropatide duyuşal liflerdeki aksonal dejenerasyonun aksondaki lokal kaspaz aktivasyonuna bağlı olduğu ileri sürölmektedir⁸⁰.

Kalpainler

Kalpainler papainase ailesinden Ca^{++} bağımlı sistein proteazlardır. Genel olarak kalpainin nekroz ve apoptozisin her ikisinde de aktive olduğuna inanılır. ER stresinde bozulmuş Ca^{++} dengesi apoptozisi indükler ve kalpainler belirgin olarak aktive olur⁸¹⁻⁹¹.

Hücre içi Ca^{++} miktarının artışı hücre iskeleti ve miyelin proteinlerinin degradasyonuna neden olan kalpainlerin aktivasyonuna yol açar. Birkaç tip nörodejeneratif hastalık hücre içi Ca^{++} miktarının artışı ve kalpain aktivasyonu nedeniyle oluşun proteolizis ile ilişkilidir. Bu durum iskemi/anoksi, travma, Alzheimer ve Parkinson hastalıklarında da görülür. Ca^{++} bağımlı nötral proteazların aktivasyonu ilk olarak 1964 yılında Guroff tarafından tanımlanmıştır. Kalpainler doku spesifik kalpainler ve tüm dokularda bulunan kalpainler olmak üzere iki grupta sınıflandırılmıştır. Tüm dokularda bulunan kalpainler, μ - ve m-kalpain izoformlarını içerir. Kalpainlerin fizyolojik fonksiyonları hala tam olarak anlaşılammıştır. Protein kinaz C aktivasyonu, protein turnover, nekrozis ve apoptoz ile hücre ölümlünde rolleri olduğu kanıtlanmıştır.

MSS lezyonlarında kalpainlerin aktivasyonundan sonra sonuç programlı hücre ölümlü veya apoptozun neden olduğu aksonal bozulmadır. Ayrıca kaspazlar da MSS lezyonlarında apoptoz oluşması ile ilişkilidir⁹².

Fizyolojik Ca^{++} düzeylerinde kalpainler normal dinamik hücre iskeleti turnoverini düzenlerler. Hücre iskeleti proteinleri hücre füzyonu ve hücre şeklindeki değişikliklerde, nörit uzaması ve sinaptik sonlanmaların yeniden şekillenmesinde rol oynar. Sonuç olarak, Ca^{++} yükselmesi kalpain aktivitesinin yükselmesine ve hücre iskeletinin bozulmasına ve dolayısıyla hücre hasara neden olur. İskemik stroke ve Wallerian dejenerasyonunda gözlenen Ca^{++} aracılı hücre hasarı kalpain aktivasyonu ile hücre iskeleti komponentlerinin bozulmasına bağlıdır. Kalpainler apoptoz düzenleyici faktörler ve kaspazlar üzerinden apoptoziste rol oynar. Kalpain için substrat olan çok sayıda hücre hasar hedef tanımlanmıştır⁹³⁻⁹⁸. Kalpain aktivitesi, otoproteolitik salınım, fosforilasyon, Ca^{++} konsantrasyonu ve endojen inhibitör kalpastatin ile regüle edilir⁹⁹⁻¹⁰⁴.

Kalpainler ve Kaspazlar Arasındaki Sinyal İlişkisi

Kalpainler ve kaspazlar arasındaki ilişkide birkaç farklı özellik vardır. Sistein proteazların bu iki ailesi benzer substrat spesifitelerine sahiptir. Bcl-xL ve Bcl-2 antiapoptotik proteinler kalpain ve kaspazların her ikisinin de aktifleşmesini (yarıklanmadan korurlar) engellerler. Kalpainler prokaspazları inhibe eder veya aktifleştirirler. Diğer taraftan kaspazlar endojen spesifik kalpain inhibitörü kalpastatini indirgeyerek kalpain aktivitesini düzenlerler⁸²⁻⁹¹.

Kaspaz, Kalpain ve Kalsiyum İyonu

Kalpain sistemi, hücre füzyonu ve hücre hareketi sırasında hücre membranına bağlı hücre iskeletinin yeniden şekillenmesinde, sinyal transdüksiyon yolağında moleküllerin proteolitik modifikasyonu, hücre bölünmesi sırasında ilerletici kontrol enzimlerinin degradasyonunda, gen ekspresyonunun regülasyonunda, apoptotik yolda çok sayıda farklı rolere sahiptir. Çok sayıda proteolitik enzim apoptoz ile ilişkilidir. Ca^{++} bağımlı olmayan sistein proteazlar ve kaspazlar apoptozda majör rol oynarlar. Kalpainlerin, kaspazların ve bazı başka proteinlerin aktifleşmesinde rol oynadıkları düşünülür. Bazı çalışmalara göre, kalpain kaspaz 7, 8 ve 9'u aktive eder. Ayrıca m-kalpain pro kaspaz 12'nin aktif kaspaza dönüşümünü sağlar. Tek taraflı hipoksi ve iskemide beyin hücrelerinde m-kalpain ilk olarak prokaspaz 3'ü aktifleştirir. Antikanser bir ajan olan sisplatin ER stresi ve apoptozise neden olur. Bu süreçte, sisplatin Ca^{++} ve kalpain bağımlı olarak prokaspaz 12'nin aktivasyonuna neden olur¹⁰⁵. Bu yüzden bazı durumlarda kalpain apoptozda pozitif regülatör görevi görürken, bazı durumlarda da ortamda bulunan kaspazları inaktifleştirerek negatif regülatör görevi yapar. Kalpainler, apoptozda hücre iskeleti proteinlerinin degradasyonuna katılırlar. Kalpain iskemik doku hasarında apoptoz ve nekrozun her ikisine de katılır.

ER stresini takibeden Ca^{++} düzensizliğinde m-kalpain aracılığı ile kaspaz 12 aktivasyonunun olduğu yapılan son çalışmalarda gösterilmiştir. Neonatal hipoksi ve iskemide beyinde kalpainlerin Ca^{++} aracılı aktivasyonu ve daha sonra apoptozda anahtar protein olan kaspaz 3'ün aktivasyonu patolojik apoptozda deneysel yolda gösterilmiştir⁸⁵.

Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

1- HE boyama

Hematoksilen nükleusu boyadığından apoptotik hücreler nükleus morfolojisine göre değerlendirilir. Hücre küçülmesi veya sitoplazmik küçülme,

kromatinin kondanse olması ve nükleus zarının periferinde toplanması, nükleusun küçülmesi veya parçalara bölünmesi bu yöntemde gözlenebilen değişikliklerdir.

2- Giemsa boyama

HE gibi nükleus morfolojisi esas alınarak apoptotik hücrelerin tanınmasını sağlar¹⁰⁶.

3- Floresan mikroskopi

Floresan maddelerin (Hoechst boyası, DAPI, propidium iyodür, akridin orange, etidyum bromür, FITC) kullanılması ile yapılan boyama şeklidir.

4- Faz kontrast mikroskopi

Ölen hücreler yapıştıkları alt tabakadan ayrılacakları için besiyeri içinde yüzmeye başlarlar. Hücreler henüz alt tabakadan ayrılmamışlarsa hücrelerin sitoplazmasında ortaya çıkan vakuollerde izlenebilir. Faz kontrast mikroskobu ile apoptotik hücreler üzerinde gelişen cecikler (blebs) izlenebilir. Ayrıca, bazı hücre tiplerinde 'blister' olarak adlandırılan hücrenin sitoplazmasından dışarı taşar gibi görülen bir veya birkaç tane büyük vakuol gözlenebilir. Bu vakuoller hücreden ayrılıp besiyeri içinde yüzebilirler ve içleri boş küresel yapılar olarak görünürler.

5- Anneksin V yöntemi

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde membran lipidlerinden biri olan fosfatidil serin bulunmaktadır. Eğer hücre apoptoza giderse normalde iç yüzde yerleşmiş fosfatidil serin molekülleri hücre zarının dış yüzeyine transloke olur. Anneksin V, hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfatidil serine bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde (örneğin FITC) ile işaretlendiğinde apoptotik hücre görünür hale gelir. FITC-Anneksin V kompleksinin hücre yüzeyindeki fosfatidil serine bağlanma oranı flow sitometri ile ölçülebilmektedir.

6- TUNEL yöntemi

DNA kırıklarının tanınmasını sağlar.

7- M30 yöntemi

Sitokeratin 18'in kaspazların etkisiyle kırılması sonucu açığa çıkan yeni antijenik bölgenin immunohistokimyasal yöntemle boyanması prensibine dayanır. Sadece sitokeratin 18 ekspres eden epitelyal kaynaklı dokularda kullanılması mümkündür. Sitokeratin 18 tek katlı ve glandüler epitelyum hücrelerinde bulunan tip 1 intermediate filament proteindir. Çoğunlukla akciğer,

karaciğer, prostat, göğüs ve kolon kanser tiplerinde eksprese edilirken, lenfoid ve nöral hücrelerde bulunmaz.

8- Kaspaz - 3 yöntemi

Sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz 3 immünohistokimyasal boyama metoduyla belirlenebilir¹⁰⁷.

9- Agaroz jel elektroforezi

Orta büyüklükte ve büyük DNA moleküllerini elektroforezle ayırmak için kullanılır¹⁰⁶.

10-Western blotting

Western blotlama ya da immüno blotlama denilen yöntem, bir protein karışımı içindeki belirli bir proteini ve büyüklüğünü saptamak için kullanılan nicel bir yöntemdir. Bu metot istenilen bir proteine karşı yönlendirilen yüksek kalitede bir antikor kullanımına bağlıdır. Bu antikor prob gibi kullanılarak ilgili protein bir karışımın içinden saptanabilir. Western blot hücrede ne kadar protein biriktiğini gösterir. Bu metot yardımıyla apoptoza özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadıklarının (örneğin bcl-2) ya da kırılıp kırılmadıklarının (örneğin kaspaz-3) saptanması mümkündür. Sitokrom c'nin mitokondriye çıkıp çıkmadığı da bu metodla belirlenebilir. Yalnız, sitokrom c tespitinde önce alt-fraksiyonlama yapılarak hücrenin mitokondriyal ve sitoplazmik fraksiyonları ayrılır. Ardından, normalde sitoplazmik fraksiyonda bulunması beklenmeyen sitokrom c'nin bu fraksiyonda tespit edilmesi halinde hücrelerin apoptoza gittikleri anlaşılır.

10- ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)

ELISA yönteminde, antijen-antikor kompleksine bir enzimle işaretli antiglobulinin ilave edilmesi ve sonra substratın eklenmesi ile eğer antijen veya antikor var ise renk oluşumunun gözlenmesi esasına dayanmaktadır. Duyarlı, spesifik ve çabuk sonuç veren bir testtir¹⁰⁶.

11- Elektron Mikroskopi (EM)

Morfolojik değişikliklerin en doğru olarak gözleendiği yöntemdir. Sitoplazmik küçülme, kromatin kondensasyonu ve fragmentasyonu izlenebilirken, mitokondrinin durumu, hücre zarı ya da nükleus membranının bütünlüğünün bozulup bozulmadığı gibi subsellüler detaylar da izlenebilir¹⁰⁶.

Apoptozdaki yapısal değişiklikler asıl olarak ışık ve elektron mikroskopide gözlenebilir. Kerr ve ark. fizyolojik şartlarda ve farklı dokulardaki hücre ölümünde apoptoz kavramını elektron mikroskopik araştırmalarında ifade etmişlerdir⁶⁶. EM apoptotik hücre ayırımında hala altın standarttır¹⁰⁸.

İskemi Reperfüzyon Hasarının Fizyopatolojisi

İskemi, hücrede enerji düzeyinin düşmesine ve toksik metabolitlerin dokuda birikmesine yol açarak hücre disfonksiyonu ve sonrasında hücre ölümüne kadar gidebilen bir dizi biyokimyasal reaksiyonu başlatır. İskemik ortamda doku adenosin trifosfat (ATP) düzeyi azalmakta, asidoz oluşmakta ve uzun iskemi sürelerinin ardından gelen reperfüzyon sonrası boşalan ATP depoları organ canlılığını sürdürmek için yeterli miktarda doldurulamamaktadır. Reperfüzyon sonrası ortama gelen nötrofiller ve bunlardan açığa çıkan mediatörlerin zararlı etkileri de eklenince organ veya doku ölümü kaçınılmaz olmaktadır.

İR sonrası dokularda mikrovasküler fonksiyon bozukluğu gelişir. Arteriyollerde endotele bağımlı dilatasyon bozulur, kapillerlerde lökosit tıkaçları oluşur, sıvı filtrasyonu artar, postkapiller venüllerde plazma proteinler damar dışına çıkar ve lökositlerin hareketliliği başlar. Aktive olan endotel hücreleri daha fazla ROS ve daha az nitrik oksit (NO) üretir. Endotel hücrelerinde süperoksit radikali ve nitrik oksit arasındaki dengesizlik inflamatuvar mediyatörlerin üretim ve salınımına öncülük ederken, adhezyon moleküllerinin biyosentezini de artırır. Hipoksi sonucu geri dönüşümsüz değişikliklerin gelişmesi için geçen süre değişkendir. İskelet kasları saatlerce hipoksiyi tolere edebilmesine karşın beyin için bu süre çok kısadır; kalp için ise yaklaşık 60 dakika kadardır. Sonuç olarak iskemi, hücreleri hasara uğratar ve öldürür. Bu nedenle iskemi durumunda kan akımı en kısa zamanda tekrar sağlanmalıdır. Fakat dokularda oksijenizasyonun tekrar sağlanması hasarlı bölgede ROS'lerinin artmasına ve geçici olarak hasarın ağırlaşmasına sebep olabilmektedir. İskemi nedeniyle ortamın asitleşmesi, hasarlı hücrelerden demir iyonlarının salınımı, mitokondriyal solunum zincirlerindeki aksamalar nedeni ile de dokularda ROS'lerinin sentezi uyarılır.

İR hasarının fizyopatolojisi tam olarak açığa kavuşmamıştır. Birbiriyle ilişkileri net olarak ortaya konulamasa da hücrel ve humoral olaylar dizisi hasara yol açar. ROS'leri, kompleman, endotel ve nötrofiller olmak üzere başlıca dört komponent bu olaylar dizisinde etkilidir¹⁰⁹⁻¹¹³.

İskemi Reperfüzyon Hasarında Oluşan Biyokimyasal Değişiklikler

İskemi sonrasında hücrelerde pek çok metabolik ve yapısal değişiklikler oluşmaktadır. İskemi hücrede oksidatif fosforilasyonu bozarak hücre içi ATP ve fosfokreatin sentezinde azalmaya yol açar. Bu durum hücre membranının

ATP'ye bağımlı iyonik pompa fonksiyonunu bozarak hücreye daha fazla Ca^{++} , Na^+ ve su girmesi ile sonuçlanır¹¹⁴. Na^+ ve suyun hücre içinde birikimiyle akut hücrel şişme meydana gelir. Hücre içinde yüksek olan K^+ konsantrasyonu azalır. K^+ 'un bu azalışı voltaj bağımlı Ca^{++} kanallarını uyarır ve ER'dan Ca^{++} salınır¹¹⁵.

Sitoplazmik serbest Ca^{++} normalde ATP bağımlı Ca^{++} taşıyıcıları ile oldukça düşük yoğunluklarda tutulur. İskemi veya toksinler hücre dışı Ca^{++} 'un plazma membranından hücre içine akışına yol açar. Bunu hücre içi stoklardan Ca^{++} 'un serbest bırakılması izler. Artan sitoplazmik Ca^{++} sıra ile çeşitli fosfolipazları (membran hasarını ilerletir), proteazları (yapısal ve membran proteinlerini katabolize eder), ATPazları (ATP kaybını hızlandırır) ve endonükleazları (genetik materyali parçalar) aktive eder¹¹⁶.

Sonraki olay ribozomların GER'dan ayrılması ve polizomlardan monozomların oluşumu ile protein sentezinin azalmasıdır. Hipoksi düzelmez ise mitokondriyal fonksiyonun daha da kötüleşmesi ve membran permeabilitesinin artması daha fazla morfolojik bozulmaya neden olur. Ozmotik regülasyon kaybindan dolayı tüm hücrelerde şişme görülür. Eğer oksijen eski haline dönerse yukarıdaki tüm bozukluklar geri dönüşümlüdür. Mitokondri sağlamken ATP üretilebilir, Na^+ - K^+ pompası çalışır, hücre içi laktik asit okside edilebilir ve DNA hasarı ortadan kalkar. Ayrıca ribozomlar tekrar ER'a bağlanır. Lizozomlar ise hasarlı hücrel yapıları sindirir ve yıkılanlar yerine konarak olay geri döner. Bununla beraber iskemi devam ederse geri dönüşümsüz zedelenme gelişir. Morfolojik olarak geri dönüşümsüz zedelenmeye mitokondrilerin daha şiddetli vakuolizasyonu ve mitokondri matriksinde şekilsiz ve Ca^{++} 'dan zengin yoğunlukların birikimi, plazma membranlarının geniş hasarı ve lizozomların şişmesi eşlik eder¹¹⁶.

Hücre İçi Kalsiyum Dengesi

Hücre içi Ca^{++} dengesindeki değişiklikler nörotoksisitede majör rol oynar. Ca^{++} iyonları hücre büyümesi ve farklılaşması, membranın uyarılabilirliği, sinaptik aktivite, nörotransmitterlerin ekzositozu gibi çok sayıdaki hücrel fonksiyon ile ilişkilidir. Bundan dolayı hücre içi serbest Ca^{++} konsantrasyonu katı bir şekilde düzenlenmelidir. Optimal nöronal fonksiyonlar için nöronlarda Ca^{++} 'un hücre içine giriş çıkışı, depolanması ve hücre içi konsantrasyonunun korunması arasındaki dengenin sağlanması için kompleks mekanizmalar bulunmaktadır¹¹⁷⁻¹¹⁹. Ca^{++} girişi başlıca plazma membranındaki Ca^{++} bağımlı

voltaj kanalları ve Ca^{++} ile çalışan ligand kanalları üzerindedir. Bundan başka Ca^{++} girişi nöronlar ve glia hücreleri arasındaki gap junctionlar aracılığı ile olabilir.

Hücre içindeki Ca^{++} , Ca^{++} bağlayıcı protein olan kalmodulin ile reaksiyona girer ve hücre içi organellere sekestre olur. ER üzerinde lokalize olan Ca^{++} -ATPaz pompası Ca^{++} için yüksek affiniteye sahiptir. ER Ca^{++} 'un asıl deposudur. Mitokondriler de Ca^{++} sekestre eder. Fazla miktardaki Ca^{++} hücre dışına plazma membranındaki Ca^{++} -ATPaz ile taşınır¹²⁰⁻¹²⁴.

Ca^{++} 'un aşırı yüklenmesi proteazlar, lipazlar ve endonükleazları içeren enzimlerin aşırı stimülasyonuna neden olur. Majör etkisi kalpain aktivasyonudur. Kalpain hücre iskeletinin yıkılmasında anahtar proteindir. Ca^{++} 'un aşırı yüklenmesinin bir diğer sonucu mitokondriyal disfonksiyon, kaspaz aktivasyonu ve apoptoz indüksiyonu olabilir. Ayrıca DNA degradasyonuna yol açan Ca^{++} bağımlı nükleazlar ve fosfolipazları da aktifleştirir. Fosfolipazların aktivasyonu ROS'nin oluşmasına yol açarak membran bütünlüğünün bozulmasına neden olur ve daha fazla Ca^{++} girişini veya hücre içi depolardan Ca^{++} serbestleşmesini kolaylaştırır¹²⁵⁻¹²⁷.

Mitokondri ve Hücre Hasarı

Mitokondri birçok hücrel fonksiyonun sürdürülmesinde esas olan organeldir. Nöronların ölümünde ve sağ kalımlarında önemli rol oynar. Mitokondri intermembran aralık ile ayrılmış iç ve dış mitokondriyal membrandan oluşan çift membran sistemi ile sarılmıştır. Hücrel enerji üretiminde yetkili organeldir. ATP sentetaz aracılığı ile mitokondri iç membranında yerleşmiş elektron transfer zinciri (ETC) reaksiyon ağı sonucunda ATP sentezler. ETC'deki kesintisiz elektron transportu sırasında, matrikstek protonlar iç mitokondriyal membrandan intermembran boşluğa mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) oluşturarak aktarılır. MMP matriksten Ca^{++} 'un mitokondriyal emilimi için kullanılır¹²³.

Mitokondrinin aksonal dejenerasyonda aktif rol oynadığı öne sürülmektedir⁵⁹. Birçok nörodejeneratif durum da mitokondriyal geçirgenliğin artışına yol açmaktadır.

Mitokondriyal Ca^{++} 'un fazla artışı, genellikle oksidatif strese eşlik eder. Mitokondriyal geçirgenlik geçiş porlarının (Non-spesifik mitokondriyal permeability transition pore: MPT) açılmasını, takiben mitokondriyal membran potansiyel kaybı, ATP azalması, ROS artışı, Ca^{++} serbestleşmesi ve

mitokondriyal şişme meydana gelir. MPT porlarının açılması sonucunda mitokondriyal matriksten Ca^{++} u da içeren maddelerin sitozole serbestleşmesi gerçekleşir. MPT porlarının açılması, oksidatif streste Ca^{++} seviyesini artırır. MPT por oluşumu sonucunda yalnızca Ca^{++} serbestleşmez, sitokrom c, Smac/DIABLO ve apoptoz indükleyici faktör (AİF) kaspaz kaskadının aktivasyonunu başlatan pro-apoptotik proteinler de serbestleşir. Sonuç olarak, intraaksonal Ca^{++} un fazla yüklenmesi ile Ca^{++} bağımlı proteazların aktivasyonuna bağlı aksoplazmada Ca^{++} bağımlı dejenerasyon meydana gelir^{59,123,128}.

Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Serbest radikaller dış yörüngelerinde bir veya daha fazla ortaklanmamış elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküllerdir. Serbest radikaller, radikal olmayan bir atom veya molekülden bir elektronun çıkmasıyla veya radikal olmayan bir atom veya moleküle bir elektronun ilavesiyle oluşurlar¹²⁹. Serbest radikaller arasında ROS oksijen kaynaklıdır ve oksijenin reaktif formlarını içerirler¹³⁰. Reaktif azot türleri ve reaktif sülfür türleri gibi serbest radikal türleri de mevcuttur. Bu türler ROS ile reaksiyon sonucunda oluşurlar veya ROS üretimini artırır. ROS ve reaktif azot türleri, bütün aerobik organizmalar tarafından metabolik süreçlerin sonucu olarak üretilen serbest radikal ürünleridir¹²⁹.

Lipidler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Serbest radikallerle hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitleri ile kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Lipid peroksidasyonu hücre membranının akışkanlığını değiştirir, konsantrasyon gradiyentinin dengesini bozar ve membran geçirgenliğini ve inflamasyonu artırır. Lipid peroksitler daha sonra malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksi nonenal gibi yıkım ürünlerine dönüşürler. Bu yıkım ürünleri de DNA veya proteinlerle reaksiyona girebilirler ve mutajeniktirler. Üç veya daha fazla çift bağa sahip yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu MDA oluşmaktadır. Bu da tiyobarbütirik asit reaktif maddeler olarak ölçülmektedir. MDA'da reperfüzyon sırasında ortaya çıkan peroksidatif reaksiyon nedeniyle reperfüzyon periyodunda iskemiyeye göre daha fazla artış olur^{112,113,131}.

MDA kanda ve idrarda ortaya çıkar. Yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü olmamakla beraber lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Bu nedenle biyolojik materyalde MDA ölçülmesi lipid peroksit seviyelerinin indikatörü olarak kullanılır. Non-enzimatik lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve ürettiği reaktif aldehitlerle indirekt olarak diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece doku hasarına ve birçok hastalığa neden olur. Bu yüzden lipid peroksidasyonunun kontrolü çok önemlidir. Bu amaçla da hem endojen hem de eksojen antioksidanlar kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda antioksidan suplementasyonunun plazma antioksidan düzeylerini önemli derecede arttırdığı vurgulanmaktadır^{112,113,131}.

Proteinler serbest radikallere karşı poliansatüre yağ asitlerinden daha az hassastırlar. ROS'leri yapısal proteinlerde oksidasyona neden olabilirler. Oksidasyon esnasında proteinlerdeki amino asit kaybı yapısal proteinlerde veya enzim fonksiyonlarında değişikliklere yol açar¹³²⁻¹³⁸.

Reaktif Oksijen Türlerinin Etkileri

ROS'leri özellikle inflamasyonda, fagositoz esnasında antijenlere etki ederek bağışıklık olaylarına katılırlar. Hücrel sinyallerde veya hücrelerin biyogenezinde önemli rol oynarlar. Hücre habercileri olarak etki ederler ve oksidasyon-redüksiyon (redoks) durumunu düzenlerler. Ayrıca enzim aktivasyonundan, ilaçların detoksifikasyonundan veya glikojen birikiminin kolaylaştırılmasından sorumludurlar. Aynı zamanda kas kasılmasında temel rol oynarlar. Bu fonksiyon önemlidir, çünkü ROS oluşumunun inhibisyonu kas liflerinin kasılma güçlerinin kaybolmasına neden olur. Aksine ROS artışı kasılma gücünü artırır. Ancak kas dokusunda fazla miktarda ROS bulunması kas yorgunluğuna neden olur¹³⁹⁻¹⁴⁶.

Oksidan moleküllerin belirli bir seviyenin üzerine kadar olan artışı vücutta bulunan doğal antioksidan moleküller tarafından engellenmektedir. Yani sağlıklı bir organizmada oksidan ve antioksidanlar belirli bir denge içindedir. Oksidanların artışı ve buna karşılık antioksidanların yetersiz olması durumunda oksidan moleküller organizmanın yapı elemanları olan protein, lipid, karbonhidrat ve nükleik asitler üzerinde zararlı etkilere neden olurlar. Süperoksit radikali ve hidroksil radikali sitoplazma, mitokondri, nükleus ve ER membranlarında lipid peroksidasyonunu başlatır. Membranlarda lipid peroksidasyonu meydana gelmesi sonucu membran permeabilitesi artar.

Serbest radikallerin etkisiyle proteinlerdeki amino asitler okside olarak yıkılır, nüklear ve mitokondriyal DNA okside olur. Hücrede reaktif oksijen türlerinin ve serbest radikallerin artışı hücre hasarının önemli bir nedenidir. ROS'lar birçok hastalıkta primer bozukluğa ikincil olarak oluşarak patogeneizde rol oynarlar^{112,113,131}.

Hücrede Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynağı

Normal şartlarda, eksojen (radyasyon, hava kirliliği, sigara, alkol) ve endojen (oksijen metabolizması) kaynaklardan devamlı olarak ROS üretimi yapılır. Hücrede normal metabolik yollardaki enzimatik reaksiyonlarda da ara ürünler olarak devamlı şekilde serbest radikaller oluşabilir. Bu serbest radikal ara ürünlerin moleküler oksijenle etkileşmesi sonucunda ROS oluşur^{112,113,131,147,148}. Hücrelerde serbest oksijen radikalının en büyük kaynağı mitokondriyal ETC'den sızıntıdır. Mitokondri iç zarında yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenlerinin indirgenmesiyle mitokondriyal süperoksit radikal üretimi artar. ER ve nüklear membranda serbest radikal üretimi, membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanır. Ksantin oksidaz gibi birçok enzimin katalitik döngüsü sırasında da serbest radikaller ortaya çıkar. Ksantin oksidaz hasarlanmamış dokularda bulunan bir dehidrojenazdır. Pürinlerin yıkılım yolunda hipoksantinden ksantin ve ksantinden ürik asit oluşumu basamaklarında elektron alıcısı olarak moleküler oksijenden daha çok NAD⁺ kullanılır. Oksijensizliğe bağlı olarak ADP'nin ATP'ye fosforilasyonunun azaldığı durumlarda (iskemi durumlarında) ADP yıkılır ve pürin ksantin oksidaz ile hipoksantine dönüştürülür. Ksantin oksidazın oksidaz olarak aktivasyon göstermesi durumunda, hipoksantin ksantine ve ksantin ürik aside dönüşürken moleküler oksijen kullanılır ve moleküler oksijen hidrojen peroksit indirgenir. İskemi durumlarında oksijen seviyesi düşük olduğundan önemli hasar oluşmaz. Ancak oksijen seviyesi reperfüzyon sırasında normale dönünce iskemi bölgesinde ksantin oksidaz etkisiyle fazla miktarda hidrojen peroksit ve süperoksit radikali oluşur ve bunların etkisiyle de İR hasarı denen durum ortaya çıkar. Peroksizomlar çok önemli hücre içi hidrojen peroksit kaynağıdır. Peroksizomlardaki D-amino asit oksidaz, urat oksidaz, L-hidroksil asit oksidaz ve yağ asidi açıl-CoA oksidaz gibi oksidazlar süperoksit üretmeden bol miktarda hidrojen peroksit üretimine neden olurlar. Peroksizomlarda, hidrojen peroksidin suya ayrışmasını katalizleyen yüksek katalaz (KAT) enzimi aktivitesi bulunmaktadır. Bu nedenle peroksizomlardan sitozole ne kadar hidrojen

peroksit geçtiği bilinmemektedir^{112,113,131,147,148}. ROS'lar normal oksijen metabolizması sırasında da az miktarda oluşan süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalidir^{112,113,131}.

1. Süperoksit

Süperoksit radikali moleküler oksijenin indirgenmesinde ara basamaktır ve oluştuğu yerden fazla uzağa diffüze olamaz. Bu radikalın moleküler düzeyde önemli özelliği, sekonder olarak ürettiği radikallerdir. Doğal oksijen molekülünün başka bir molekülden elektron almış halidir.

Süperoksit, bir serbest radikal olmakla birlikte, direkt olarak hasara yol açmadığı halde hidrojen peroksit kaynağı ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisidir. Süperoksit, nötrofillerin bakterisidal aktivitesi, apoptozis, inflamasyon ve vasküler fonksiyonların regülasyonu gibi yararlı etkilere sahiptir. Azalmış süperoksit düzeyleri, bakteriyal enfeksiyonlara artmış bir yatkınlığa yol açabilir. Artmış süperoksit düzeyleri ise süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile hidrojen peroksit ve oksijene dönüştürülerek azaltılır. Böylece hücrel süperoksit düzeyleri sıkı kontrol altındadır.

2. Hidrojen Peroksit

Doğal oksijen molekülünün başka bir molekülden iki elektron almasıyla peroksit oluşur. Peroksitin iki hidrojen molekülü ile birleşirse hidrojen peroksit oluşur. Hidrojen peroksit süperoksitin aksine membranları geçerek sitozole diffüze olabilen uzun ömürlü bir oksidandır. Bu nedenle membranla korunan yapılara kolaylıkla ulaşarak süperoksitle reaksiyona girebilir. Sonuçta en reaktif ve zarar verici radikal olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir.

3. Hidroksil Radikali

Tek atom halinde ve bir elektronu eksik olan oksijen ile H⁺'in birleşmesinden oluşur. Amino asitler, nükleik asitler, organik asitler gibi biyokimyasal maddelerin bir çoğuyla reaksiyona girebilir. Bilinen en reaktif radikaldir.

Oksidatif Stresin Değerlendirilmesinde Kullanılan Yöntemler

Oksidatif stres serbest radikallerin lipidler, proteinler ve DNA molekülleri üzerine neden olduğu hasarın, antioksidan enzimlerin aktivitelerinin veya konsantrasyonlarının ölçülmesi ile hesaplanabilir.

Enzimatik antioksidan aktivitesi

Enzimatik antioksidan aktivitesi (SOD, KAT ve glutatyon peroksidaz) istirahattaki antioksidan durumunu değerlendirmede kullanılabilir, özellikle fiziksel aktiviteden sonraki oksidatif stresin derecesini gosterebilir¹⁴⁹⁻¹⁵¹.

Serbest radikallerin direkt olarak tayini ROS üretiminin direkt metotlarla ölçülmesi ile belirlenebilir. Lipid peroksidasyonu ölçümünde ise temel yaklaşıım membran lipidlerindeki veya yağ asitlerindeki peroksidasyon hızının llmesidir^{140,152}.

Antioksidanlar

Hücre içinde serbest radikallerin üretimi oldukça fazladır ve bu nedenle hücrede bir koruma sisteminin varlığı gereklidir. Fizyolojik koşullarda, hücreler oluşan serbest radikal ürünleri ve peroksitler gibi moleküllerin neden olabileceği oksidatif hasara karşı antioksidan savunma sistemleri tarafından korunurlar. Antioksidanlar; aktif radikal oluşumunu veya serbest radikal zincir reaksiyonunun proteinler, lipidler, karbohidratlar ve DNA üzerinde yaptığı hasarı azaltarak oksidatif stresin şiddetini bastırmaya yardımcı olan maddelerdir¹⁵³.

Antioksidanların tedavi edici potansiyelleri değerlendirilirken emilim ve biyoyararlanım, etkin doz, güvenlik ve toksisite, hücrelere, dokulara ve ekstrasellüler sıvılara dağılımı, serbest radikalleri kovabilme yeteneği, metal bağlama aktivitesi, gen ekspresyonuna etkisi, hücresel antioksidanlarla ve antioksidan enzimlerle ilişkisi ve karsinogenik metabolitlerin detoksifikasyonu gibi özellikler göz önünde bulundurulmalıdır¹⁵⁴.

Antioksidanlar reaktif oksijen radikallerini tutulması veya daha zayıf bir moleküle çevrilmesi (toplayıcı etki), reaktif oksijen radikallerinin aktivitelerinin azaltılması veya inaktif şekile dönüşmesinin sağlanması (bastırıcı etki, vitaminler, flavanoidler), reaktif oksijen radikallerinin bağlanarak zincirlerinin kırılması ile fonksiyonlarının engellenmesi (zincir kırıcı etki) ve serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması (onarıcı etki) olmak üzere dört ayrı şekilde etki ederler¹³¹.

Enzimatik antioksidanlar

Enzimatik antioksidanlar SOD, KAT, selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon redüktazı (GR) içerir. Genel olarak enzimatik antioksidanlar hücre içinde, enzimatik olmayan antioksidanlar ise hücre dışında daha fazla etkilidir. Süperoksit radikallerinin yol

açtığı oksidatif hasara karşı antioksidan savunmada görev alan ilk enzim, SOD'dur. SOD, süperoksit radikallerini hidrojen peroksit ve oksijene dönüştürür. KAT ya da GPx ise hidrojen peroksiti zararsız yan ürünlere dönüştürür. Bu yüzden hücrel hasarın şiddetinde önemli rol oynarlar¹⁵⁵.

Süperoksit Dismutaz

Mitokondride lokalize Mn-SOD, sitozolde lokalize Cu-Zn SOD içeren ve plazmadaki süperoksit radikallerini metabolize eden vasküler endotele bağlı Cu-SOD olmak üzere 3 tür SOD vardır^{131,156}. Hücrede en fazla miktarda bulunan sitozolik Cu-Zn SOD'dır. Süperoksit dismutaz, süperoksit serbest radikalının hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir¹¹³. Oksidanları tutarak daha zayıf bir moleküle dönüştürmektedirler. SOD'ın fizyolojik fonksiyonu oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikalının lipid peroksidasyonu gibi zararlı etkilerine karşı korumaktır. SOD, fagosite edilmiş bakterilerin intrasellüler öldürülmesinde de rol oynar^{130,157}.

Katalaz

Katalaz esas olarak peroksizomlarda daha az olarak sitozolde ve mikrozomal fraksiyonda bulunur. Peroksizomlar toksik maddeleri detoksifiye etmek için oksijen kullanan ve sonuçta hidrojen peroksit üreten hücre yapılarıdır. KAT hidrojen peroksidazı su ve oksijene dönüştürür. SOD'ın oluşturduğu hidrojen peroksidazı katalaz peroksidazlarla beraber oksijen ve suya parçalar. Hücrede oluşan hidrojen peroksidi hidroksil serbest radikali oluşumunu önlemek için ortadan kaldırır^{113,158}.

KAT aktivitesi eritrosit, karaciğer ve böbrekte yoğundur. Tip 2 diyabetli hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada diyabetli hastaların artmış serum katalaz aktivitesine sahip oldukları vurgulanmaktadır. Ancak bu artışın organizmanın kendisini lipid peroksidasyonundan korumak için kompensatuvar bir mekanizma olabileceği vurgulanmaktadır. Ancak başka çalışmalarda da azalmış olduğu vurgulanmaktadır¹⁵⁷.

Glutasyon (GSH)

GSH çok önemli bir antioksidandır, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol alır. Ayrıca proteinlerdeki sülfhidril gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur, böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu

engeller. GSH yabancı bileşiklerin detoksifikasyonu ve aminoasitlerin membranlardan transportunu da sağlar. GSH eritrositleri, lökositleri ve göz lensini oksidatif strese karşı korumada hayati öneme sahiptir¹⁴⁷.

Glutasyon peroksidaz

GPx hücrede sitozol ve mitokondri içerisinde bulunur ve hidrojen peroksidazı suya dönüştürür, böylece membran lipidlerini ve hemoglobini oksidatif strese karşı korur. Membranı peroksidasyona karşı korur. Eritrositlerde en kuvvetli antioksidandır. Selenyum eksikliğinde GPx yetersizliği olabilir. Çünkü selenyum GPx'in integral parçasıdır¹⁵⁹.

Enzimatik olmayan antioksidanlar

C vitamini, E vitamini, A vitamini, flavonoidler, melatonin, ürik asit, albümin, haptoglobulin, sistein, seruloplazmin, transferin, laktoferrin, ferritin, oksipurinol, ubikinon (koenzim Q10), bilirubin, mannitol, lipoik asit ve hemopeksin enzimatik olmayan antioksidanlardır .

Antioksidan vitaminler

Antioksidan vitaminlerin (A, E ve C vitaminleri) plazmadaki miktarlarının değerlendirilmesi, antioksidan korumanın ve vitamin eksikliğinin tayininde en sık kullanılan yöntemdir. Antioksidan vitamin konsantrasyonları da oksidatif stresin varlığından etkilenir ve oksidatif stresin dolaylı belirteci olarak kullanılabilir.

Vitamin E

Hücre membran fosfolipidlerinde bulunan poliansatüre yağ asitlerini serbest radikal etkisinden korumakta ilk savunma hattını oluşturan Vitamin E (α -tokoferol) çok güçlü bir antioksidandır. En aktif formu α -tokoferoldür. Zincir kırıcı antioksidan olarak fonksiyon görür. E vitamininin moleküler yapısı lipid ortamda ROS inaktivasyonuna, özellikle de peroksit radikallerine karşı koruma için olanak sağlar^{160,161}.

Vitamin E peroksitlerin sentezini engellerken glutasyon peroksidaz oluşmuş peroksitleri ortadan kaldırır ve bu şekilde serbest radikallere karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler¹⁴⁷.

C Vitamini (Askorbik asit)

Askorbik asit; moleküler oksijen, nitrat, sitokrom a ve c gibi bileşiklerin indirgenmesine neden olan ve serbest radikallerle reaksiyona girebilme kabiliyetinde olan suda eriyen bir vitamindir. Plazmada oksidan ajanlara karşı ilk antioksidan defansı oluşturur. Ekstrasellüler sıvılarda etkili en önemli antioksidan olmasının yanısıra sitozolde de etkilidir¹⁶².

β-Karoten ve A vitamini

Görme, üreme, büyüme ve epitel dokusunun sağlamlığında etkilidir. Diyetteki retinolün oksidasyonu sonucu oluşan retinoik asit, retinoidlerin diğer etkilerinin çoğuna aracılık eder. α-tokoferolle karşılaştırıldığında oldukça zayıf bir antioksidandır. A vitamini pek çok lipid özellikte maddede bulunan ve yağda çözünen bir vitamindir. β-karoten hücre membranlarında bulunur ve vücudun ihtiyacına göre A vitaminine dönüştürülür. β-karotenin ROS'ları inaktive ettiği ve lipid peroksidasyonunu azalttığı ileri sürülmüştür. Bununla birlikte, β-karotenin ve A vitamininin ROS'lara karşı etkinliği E ve C vitaminine kıyasla daha azdır^{163,164}.

Melatonin

Melatonin bilinen en güçlü antioksidan olarak kabul edilmektedir. Hidroksil serbest radikalini ortadan kaldırır. Melatoninin lipofilik özellikte olması nedeniyle, hücre organellerine ve hücre çekirdeğine ulaşarak çok geniş bir dağılımda antioksidan aktivite gösterir¹¹³.

Flavonoidler

Flavonoidler, bitkilerdeki fenilalanin, tirozin ve malonat amino asitlerinden meydana gelen fenolik maddelerdir. İn vitro çalışmalarda, flavonoidlerin antioksidan etkisini prooksidan enzimlerin inhibisyonu ile veya Fe⁺², Fe⁺³ veya bakır gibi prooksidan iyonlarla kompleksler oluşturarak gösterdiği iddia edilmiştir. Flavonoidlerin hidrojen atomu vererek bazı ROS'lar üzerine direkt yakalayıcı etkisi vardır¹⁵⁶.

Thioller

Thioller sülfür içeren sistein ve metionin amino asitlerinden sentezlenirler. Protein sentezi, redoks, hücre biyogenezi ve immunité gibi çok sayıda fonksiyona katılırlar. Ayrıca antioksidan savunmada da rol oynarlar. GSH, organizmada bulunan temel thioldür. GSH, ROS'ları direkt olarak detoksifiye edebilir ve E ve C vitamininin fonksiyonel antioksidan kapasitesini artırır. GSH konsantrasyonunun düşük olması hücrel hasara ve bağışıklık sisteminin zayıflamasına yol açabilir. Ancak bu durumun E ve C vitamini takviyesi ile kompanse edilebilmesi, bu antioksidanların aynı hedefler üzerine etki ettiğini ve ROS'lara karşı beraber çalıştığını göstermektedir.

Koenzim Q10

ATP sentezi için gerekli olan endojen bir moleküldür ve özellikle mitokondiyal membranda bulunur. Koenzim Q10'un antioksidan etkisi peroksid

radikalleri üzerine doğrudan olabilir veya E ve C vitaminleri aracılığı ile dolaylı bir şekilde de olabilir.

Ferritin

Ferritin vücuttaki demir dengesinin düzenlenmesinde etkilidir. Demiri bağlayarak serbest radikal oluşumunu en aza indirir ve serbest radikallerin neden olduğu hasara karşı koruyucudur.

Albümin, bilirübin ve serüloplazmin

Albümin, bilirübin ve serüloplazmin serbest radikallere elektron vererek özgün olmayan zincir kırıcı antioksidan olarak etki ederler . Bununla birlikte, bu proteinler sınırlı antioksidan etkiye sahiptir, çünkü etkileri dolaylıdır ve kan gibi vücut sıvılarında etkilidirler^{143,165}.

Proantosiyanidinler

PA'ler, flavonoidler'in spesifik bir grubudur. PA'ler düşük molekül ağırlıklı olup, su ve etanolde çözünürler. Barsaklardan emilerek tüm dokulara ve plazmaya dağılırlar ve 7-10 gün güçlü antioksidan etki gösterirler. PA'ler; kuruyemişler, tohumlar, sebzeler, meyveler ve ağaç kabuğunda doğal olarak bulunurlar. Üzüm çekirdeği, özellikle PA'ler için zengin bir kaynaktır¹⁵⁶.

Proantosiyanidinlerin Antioksidan ve Diğer Özellikleri

PA'lerin oksidatif stresle karakterize hastalıklardaki tedavi edici etkinliği gösterilmiştir. Farelerde yapılan çalışmalarda oligomerik proantosiyanidinlerin kimyasal olarak indüklenmiş lipid peroksidasyonunu ve beyin ve karaciğerde oksidatif hasara bağlı apoptozisi inhibe ettiği gösterilmiştir^{166,167}.

PA'ler serbest radikal toplayıcı ve antioksidan etkinliklerini; vazodilatatör, antikarsinojenik, antiallerjik, antiinflamatuvar, antibakteriyel, kardioprotektif, immünoestimülan, antiviral, östrojenik etki ve siklooksijenaz, fosfolipaz A2 ile lipooksijenaz inhibisyonu yaparak gösterirler^{168,169}. Yapılan in vitro çalışmalarda platelet agregasyonunu inhibe ettiği bulunmuştur.

İn vitro deneylerde serbest radikaltoplama açısından PA ile vitamin C ve E çeşitli konsantrasyonlarda karşılaştırılmıştır. PA ile vitamin E karşılaştırıldığında PA'in süperoksit anyonu için %84, hidroksil iyonu için %98 oranında daha fazla serbest radikal süpürme etkinliğinin olduğu saptanmıştır. PA ile vitamin C karşılaştırıldığında; PA'in süperoksit anyonu için %439, hidroksil iyonu için %575 oranında daha fazla serbest radikal süpürme etkinliğinin olduğu saptanmıştır¹⁷⁰⁻¹⁷².

Proantosiyanidinlerin Farmakolojik Özellikleri

Oral alınabilen flavonoidler ve PA barsak hücrelerinde glukronid ile bağlanıp serumda karaciğere kadar albümin ile taşınır. Oligoproantosiyanidinler, polimerlere göre vücutta glikolizasyonu daha fazla olduğu için 7-10 gün plazmada kalabilir. Diğer suda çözünen antioksidan vitaminlere göre de bu belirgin bir avantajdır. Proantosiyanidinler karaciğerde metilasyon, dehidroksilasyon, oksidasyon, glukronik asitle veya sülfatla konjügasyon gibi biyotransformasyon reaksiyonları ile metabolitlerine ayrılırlar. Maksimum konsantrasyona ulaşma süresi 45 dakikadır ve yarılanma ömrü 5 saattir. Doz aralığı geniş ve güvenlidir. Metabolitler temel olarak idrar ve feçes ile az oranda karbondioksit ile elimine edilirler. PA bileşikleri tek doz oral uygulama sonrasında hızlı şekilde plazmada görülürler. Oral uygulamadan sonra; uygulanan dozun %70'i ilk 24 saat içinde idrar ve %45'i feçes ile atılır. Temel idrar metabolitleri; hippürik asit, etikkatekol ve m-hidroksifenilpropionik asittir. Gayta metaboliti, etikkatekol'dür¹⁷⁰⁻¹⁷².

Flavonoidler hidroksil ve peroksil radikallerinin güçlü kovucusudur, bununla birlikte süperoksit radikalini kovucu etkileri net değildir. Serbest radikal oluşumunu azaltması, LDL oksidasyonunda alfa-tokoferolün korunması, okside alfa-tokoferolün rejenerasyonu ve metal iyon şelatörü olması flavonoidlerin koruyucu etki mekanizmalarıdır.

PA'lerin kanser oluşumunu; apoptozu düzenleyici, antioksidan ve antimitojenik aktivite gibi farklı mekanizmalar yoluyla önlediği gösterilmiştir. PA'lerin etki mekanizmaları için ileri sürülen görüşlerden antioksidan veya ROS kovucu aktiviteleri daha belirgindir.

Son yıllarda pek çok kişi tarafından PA besin takviyesi olarak kullanılmaktadır. Bu ekstreinin sitotoksitesisi birçok kanser hücre kültürlerinde araştırılmıştır. MCF-7 meme kanseri, A-427 akciğer kanseri ve CRL-1739 gastrik adenokarsinoma hücreleri üzerine konsantrasyon ve zaman bağımlı sitotoksik etkisi gösterilmiştir. Bu sonuçların aksine, PA'in fare ve sıçanlarda kimyasalların neden olduğu meme tümörlerini önlemede etkili olmadığını iddia eden çalışmalar da vardır.

PA'in kimyasal maddelerin neden olduğu karaciğer ve böbrek toksisitesine karşı koruma sağladığı, karaciğer dokusunda bcl-xL ekspresyonunu artırdığı ve hem nekrotik hem de apoptotik karaciğer hücrelerinin ölümünü antagonize ettiği gösterilmiştir. PA'in koruyucu özelliğinin

DNA tamiri, lipid peroksidasyonu ve hücre içi Ca^{++} dengesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.

PA kemoterapötik ilaçların neden olduğu sitotoksiteye karşı sağlıklı insan karaciğerinde apoptotik düzenleyici genler olan bcl-2, c-myc ve p53'ü düzenlemek suretiyle, ilaç ve kimyasalların neden olduğu multiorgan toksisitesine karşı da önemli koruma sağlar.

Proantosiyanidinlerin Yan Etkileri ve Güvenilirliği

Bugüne kadar yapılan in vivo çalışmalarda PA'in herhangi bir yan etkisi bildirilmemiştir. Tavsiye edilen PA dozu günlük 100-300 mg arasında değişmektedir. Hamilelerin ve emziren annelerin PA kullanmaması önerilmektedir.

Uzun süreli (90 gün) toksikolojik çalışmalarda erkek sıçanlarda 1,4 g/kg, dişi sıçanlarda ise 1,5 g/kg oral PA takviyesi herhangi bir yan etkiye sebep olmamıştır. 90 gün boyunca dişi ve erkek sıçanlara diyetin %0,5, %1 ve %2 oranında karıştırılan PA'in vücut ağırlığı, besin tüketimi, hematolojik parametreler, organ ağırlığı veya histopatolojisi üzerine herhangi bir yan etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Erkek farelere bir yıl boyunca günlük 100 mg/kg, dişi farelere 6 ay boyunca 500 mg/kg PA takviyesinden sonra hayati organların histolojisinde ve serum biyokimyasında herhangi bir yan etki gözlenmemiştir¹⁷³⁻¹⁷⁶.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Deneysel Çalışma

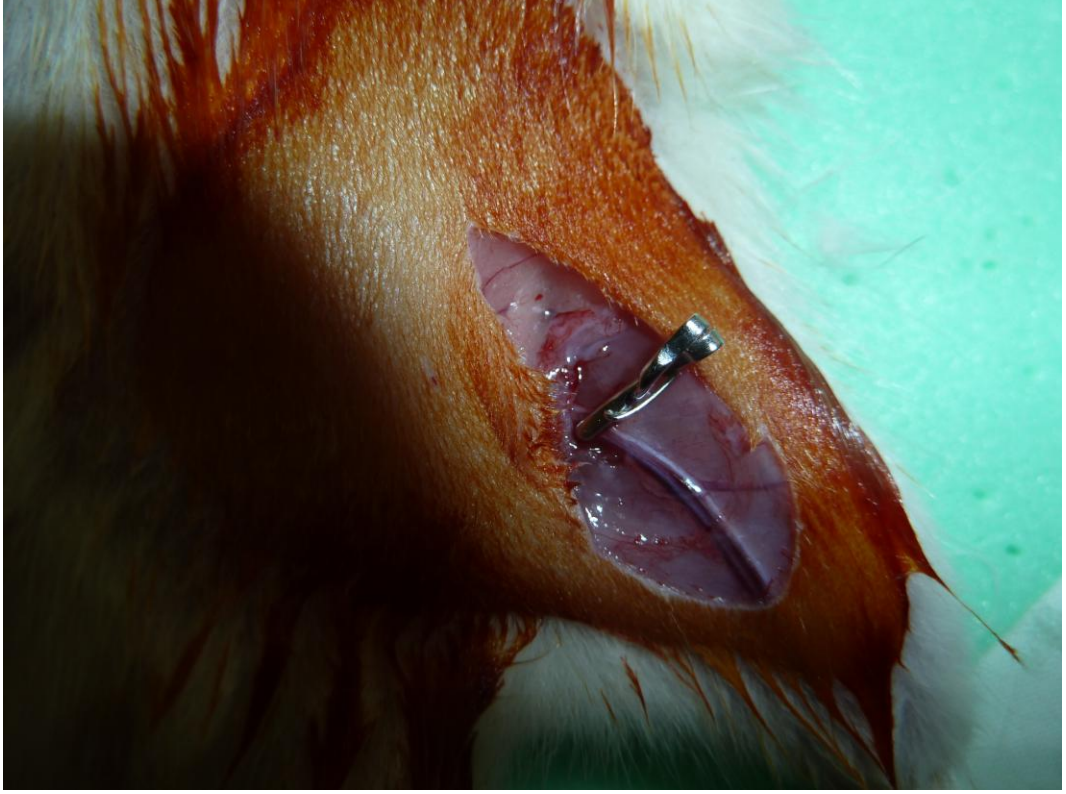
Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nin hayvan etik kurul izniyle, aynı merkezde gerçekleştirildi. Çalışma, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nce (BAP-TF TTB (OD) 2011-5 TU no lu proje) desteklendi.

Çalışmada Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim Biriminde üretilen toplam 63 adet Wistar albino dişi sıçan kullanıldı ve 28 sıçan diğerlerinden ayrı bir kafese konularak, 7 gün süreyle proantosiyanidin (GNC) oral yoldan (orogastrik gavajla) 100 mg/kg/gün dozunda verildi¹⁷⁷.

İskemi Reperfüzyon Oluşturma Modeli

Yapılan deneyde, anestezi için, 50 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar, Pfizer İlaç) ve 2 mg/kg xylazine hidroklorid (Rompun, Bayer İlaç) intraperitoneal olarak uygulandı. Steril şartlarda, sağ inguinal bölgelerindeki kıllar temizlendi. Daha sonra operasyon sahası povidon-iyot (Batticon, Adeka ilaç) ile temizlendi ve steril örtü ile kapatıldı. Operasyon mikroskobu eşliğinde uyluk iç yüzünden inguinal kıvrıma kadar uzanan bir insizyonla derinleştirilerek femoral arter, ven ve sinir bulundu. Femoral sinir yaklaşık 1 santimetrelilik bir bölümde arter ve venden disseke edildi. Daha sonra iskemi oluşturabilmek amacıyla femoral arter ve ven anevrizma mikroklipsi (Sugita, No:07-940-80, Straight 3.5 model) ile klempe edildi (Resim 3.2.1). Böylelikle siyatik sinir ve devamı (peroneal, tibial ve surral dalları) tama yakın iskemik hale getirilmiş oldu⁵⁴.

Bu şekilde 3 saat iskemide tutulan sinirin klipsler çıkarılarak deney protokolüne uygun sürelerde reperfüze olması sağlandı. Reperfüzyon sürelerinin tamamlanmasının ardından yeniden anestezi uygulanan sıçanların histopatolojik inceleme için sağ siyatik sinirlerinden doku örneği alındı. Ayrıca torakotomi ile kalplerine ulaşıldı ve biyokimyasal inceleme için steril enjektör ile direkt olarak girilerek intrakardiyak yolla kanları alındı. Daha sonra deney sakrifikasyonla sonlandırıldı.



Resim 1: Femoral arter ve ven femoral sinirden diseke edildikten sonra anevrizma mikroklipsi ile klempe edildi.

Çalışma Grupları

Grup I: Kontrol grubu

Grup II: İskemi grubu; 3 saat süreyle femoral arter ve ven oklüzyonu ile iskemi yapıldı. 3 saatlik iskemi sonrası kan ve doku örnekleri alındı.

Grup III: Proantosiyanidin+iskemi grubu; Sıçanlara 7 gün süreyle oral gavaj yolu ile %0,9 NaCl ile çözüldürülmüş 100 mg/kg proantosiyanidin uygulandı. 3 saatlik iskemi sonrası kan ve doku örnekleri alındı.

Grup IV: İskemi+4 saat reperfüzyon grubu; 3 saat iskemi takiben 4 saatlik reperfüzyon sonrası kan ve doku örnekleri alındı.

Grup V: Proantosiyanidin+iskemi+4 saat reperfüzyon grubu; Sıçanlara 7 gün süreyle oral gavaj yolu ile %0,9 NaCl ile çözüldürülmüş 100 mg/kg proantosiyanidin uygulandı. Daha sonra 3 saat iskemi takiben 4 saatlik reperfüzyonun ardından kan ve doku örnekleri alındı.

Grup VI: İskemi+7 gün reperfüzyon grubu; 3 saat iskemi takiben 7 gün reperfüzyon sonrası kan ve doku örnekleri alındı.

Grup VII: Proantosiyanidin+iskemi+7 gün reperfüzyon grubu; Sıçanlara 7 gün süreyle oral gavaj yolu ile %0,9 NaCl ile çözüldürülmüş 100 mg/kg

proantosiyanidin uygulandı. Daha sonra 3 saat iskemiye takiben 7 gün reperfüzyonun ardından kan ve doku örnekleri alındı.

Grup VIII: İskemi+21 gün reperfüzyon grubu; 3 saat iskemiye takiben 21 gün reperfüzyon sonrası kan ve doku örnekleri alındı.

Grup IX: Proantosiyanidin+iskemi+21 gün reperfüzyon grubu; Sıçanlara 7 gün süreyle oral gavaj yolu ile %0,9 NaCl ile çözündürülmüş 100 mg/kg proantosiyanidin uygulandı. Daha sonra 3 saat iskemiye takiben 21 gün reperfüzyonun ardından kan ve doku örnekleri alındı. Grupların dağılımı tablo 3.3.1'de görülmektedir.

Sıçanlar deney gruplarına göre sakrifiye edilecekleri günlerde, intraperitoneal ksilazin+ketamin anestezisi ile uyutularak sağ siyatik sinirleri çıkarıldı. Siyatik sinirler üç parçaya ayrıldı. İmmunfloresan işaretleme için kullanılacak dokular %4'lük paraformaldehite, elektron mikroskopik inceleme için kullanılacak dokular ise % 2,5'luk gluteraldehite konuldu. ELİSA yönteminde kullanılacak dokular -20 °C'de saklandı. Biyokimyasal analiz için alınan kan örneklerinden elde edilen serumlar -20 °C'de saklandı.

Tablo 1: Deney gruplarının dağılımı.

Gruplar	İskemi	Reperfüzyon	PA uygulanan	Reperfüzyon süresi
Grup I	-	-	-	-
Grup II	+	-	-	-
GrupIII	+	-	+	-
GrupIV	+	+	-	4 saat
Grup V	+	+	+	4 saat
Grup VI	+	+	-	7 gün
Grup VII	+	+	+	7gün
GrupVIII	+	+	-	21 gün
Grup IX	+	+	+	21 gün

İmmünfloresan işaretleme

Siyatik sinir kesitlerinde miyelin kılıflarını işaretlemek için S100 primer antikoru kullanılırken hücrelerde apoptozsisin belirlenmesi için ise aktif kaspaz 3 primer antikor kullanıldı.

Paraformaldehit çözeltisindeki dokular bir gece buzdolabında +4°C'de bekledikten sonra, 12 saat %20 sükröz, takiben %30'luk sükröz + %0,1'lik Na

azid solüsyonunda bekletildiler. Kesitler alınmadan yaklaşık 30 dk önce, dokular -20°C'ye konarak donmaları sağlandı. Dokulardan kriyostat ile (Leica CM1900, Avusturya- Viyana) 10 µm kalınlığında kesitler adheziv kaplı lamlara alındı. İşaretleme işlemi yapılmadan önce kesitler lamalar üzerinde pap-pen ile çevrildi.

1. Kesitler 1 dakika PBS ile yıkandı.
2. %0,1 Triton-X-100+PBS de 40 dakika bekletildi.
3. 3 kez 10'ar dakika PBS ile yıkandı.
4. 0,3 M glisin+PBS de 20 dakika bekletildi.
5. 3 kez 10'ar dakika PBS ile yıkandı.
6. PBS + %10 NGS (Normal Keçi Serum) ve %0,5 BSA (Bovin Serum Albumin) solüsyonunda 20 dakika bekletildi.
7. Birinci primer antikor olarak 1/100 dilüsyonda S-100 $\alpha\beta$ chain (B32.1) (Santa Cruz, sc-58839) kullanıldı ve +4 °C'de 1 gece bekletildi.
8. 3 kez 10'ar dakika PBS ile yıkandı.
9. S-100 için sekonder antikor olarak 1/400 dilüsyonda Goat polyclonal secondary antibody to Rabbit IgG-H&L (TRITC) (Abcam, ab-6786,England) uygulandı ve oda sıcaklığında 1 saat bekletildi.
10. 3 kez 10'ar dakika PBS ile yıkandı.
11. İkinci primer antikor olarak kesitlere 1/100 dilüsyonda Cleaved Caspase-3 (Asp175)(5A1E) Rabbit mAb (Cell Signaling, 9664) uygulandı ve +4 °C'de 1 gece bekletildi.
12. 3 kez 10'ar dakika PBS ile yıkandı.
13. Cleaved Caspase-3 için sekonder antikor olarak 1/400 dilüsyonda Goat polyclonal secondary antibody to Mouse IgG-H&L (TRITC) (Abcam, ab-6786,England) uygulandı ve oda sıcaklığında 1 saat bekletildi.
14. 3 kez 10'ar dakika PBS ile yıkandı.
15. Son yıkamadan sonra lamalar dikkatlice kurulandı ve çekirdeklerin boyanması için kesitler DAPI içerikli kapatma medyum (UltraCruz Mounting Medium, katalog no: sc-24941 Santa Cruz Biotechnology Inc. California U.S.A.) ile kapatıldı. Lamaların etrafı, kesitlerin hava almaması için tırnak cilası ile izole edildi. Hazırlanan preparatlar Olympus BX51 floresan mikroskop (Olympus GmbH, Germany) ile incelenerek fotoğraflandı.

ELISA Yöntemi

Siyatik sinir kesitlerinde aktif kaspaz 3 düzeylerini belirlemek için PathScan(R) Cleaved Caspase-3 (Asp175) Sandwich ELISA Kit 7190S kullanıldı.

1. -20 °C'de saklanan dokular sıvı azot ile dondurulduktan sonra havana alınarak ezildi.

2. RIPA buffer ve protease/phosphatase inhibitör cocktail ile hazırlanan cell lysis buffer dan 500 µl havadaki doku üzerine eklenerek doku homojenize edildi ve ependorf tüpe aktarıldı.

3. Homojenize edilen dokular vortekslendi ve Cleaved-Caspase 3(Asp175) Rabbit Detection Antibody kaplı kuyucuklara 100'er µl koyularak +4 °C'de bir gece bekletildi.

4. ELISA Wash Buffer distile su ile dilüe edilerek yıkama tamponu hazırlandı.

5. Kuyucuklar boşaltıldıktan sonra her kuyucuğa 200'er µl yıkama tamponu eklenerek yıkandı ve bu işlem üç defa tekrarlandı.

6. Her kuyucuğa 100 µl Biotinylated Caspase-3 Rabbit Detection Antibody koyulup üzeri kapatılarak 37 °C'de bir saat inkübe edildi.

7. Kuyucuklar boşaltıldıktan sonra her kuyucuğa 200'er µl yıkama tamponu eklenerek yıkandı ve bu işlem üç defa tekrarlandı.

8. Her kuyucuğa 100 µl HRP-Linked Streptavidin koyuldu ve 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi.

9. Kuyucuklar boşaltıldıktan sonra her kuyucuğa 200'er µl yıkama tamponu eklenerek yıkandı ve bu işlem üç defa tekrarlandı.

10. Her kuyucuğa 100 µl TMB substrat koyularak 37 °C'de 10 dakika inkübe edildi.

11. Kuyucuklar boşaltılmadan her kuyucuğa 100'er µl STOP solüsyonu eklendi ve birkaç saniye hafifçe karıştırıldıktan sonra Bio-Tek 987 ELISA okuyucuda 450 nm'de okuma yapıldı.

Elektron Mikroskopu Doku Hazırlama Yöntemi

Elektron mikroskopik inceleme için alınan siyatik sinir örnekleri 1 mm³lük parçalara bölündü ve 4-6 saat %2,5'luk gluteraldehit solüsyonunda bekletildi. Fosfat tamponlu tuz solüsyonu ile yıkandıktan sonra elektron mikroskopik incelemeler için doku takip işlemi Leica EM TP (Leica Microsystems GmbH,

Viyana, AVUSTURYA) cihazı kullanılarak aşağıda belirtildiği şekilde yapıldı ve rezin içine gömüldü.

%1' lik osmium tetraoksit 1 saat

Fosfat tamponlu tuz solüsyonu 15 dk

Fosfat tamponlu tuz solüsyonu 15 dk

Etil alkol (%50) 15 dk

Etil alkol (%60) 15 dk

Etil alkol (%70) 15 dk

Etil alkol (%80) 15 dk

Etil alkol (%90) 15 dk

Etil alkol (%100) 15 dk

Etil alkol (%100) 15 dk

Etil alkol (%100) 15 dk

Etil alkol (%100) 15 dk

Propilen oksit 15 dk

Propilen oksit 15 dk

Propilen oksit+rezin (2+1)

Propilen oksit+rezin (1+1)

Propilen oksit+rezin (1+2)

Saf rezin 12 saat

Rezin içine gömme işlemi

Etüvde (60 °C) polimerizasyon 24 saat

İlk 11 basamak +4 °C'de daha sonraki basamaklar oda ısısında gerçekleştirildi. Rezin (EMBed-812 Embedding Kit) içine gömülen dokulardan Leica Ultracut UCT 125 ultramikrotom (Leica Microsystems GmbH, Viyana, AVUSTURYA) ile 70 nm kalınlığında kesitler 300 gözenekli bakır gridler üzerine alındı. Uranil asetat ve kurşun sitratla kontrastlandı. Kontrastlama işlemi aşağıdaki şekilde yapıldı.

Kesitler uranil asetatla 5 dakika bekletildikten sonra distile su ile yıkandı

Kesitler kurşun sitratta 5 dakika bekletildikten sonra distile su ile yıkandı

Kurutma kağıdı ile kurutuldu

Daha sonra Jeol Jem-1011 transmision elektron mikroskobuna (Jeol Ltd. Tokyo JAPONYA) eklenmiş Megaview III dijital kamera (Olympus GmbH, Germany) ile fotoğraflanarak değerlendirildi.

Elektron Mikroskopik Değerlendirme

Elektron mikroskopik değerlendirme amacıyla her gruptan tüm denekleri kapsayacak şekilde randomize olarak toplam 150 adet miyelinli akson incelendi ve delaminasyon olan akson miyelin kılıfları değerlendirildi.

Biyokimyasal Analiz Yöntemleri

Serum lipid peroksidasyonunu belirlemek için malondialdehit düzeylerine, antioksidan düzeyini belirlemek için ise SOD aktivitelerine bakıldı.

SOD Enzim Aktivitesi Tayini:

Deneyin Prensibi; Oksidatif yolla enerji üretimi sırasında oluşan endojen ve eksojen kaynaklı toksik süperoksit radikallerinin suya ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandıran SOD enzim aktivitesinin ölçüm prensibi, ksantin varlığında ksantin oksidazın açığa çıkardığı süperoksit radikallerinin nitroblue tetrazolium (NBT) ile 560 nm'de absorblanan rengin ölçülmesine dayanır¹⁷⁸.

Kullanılan Reaktifler;

Sodyum Hidroksid Çözeltisi (0,1 N): 0,4 g NaOH bidistile suda çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.

Stok Ksantin Çözeltisi (3 mM): 4,6 mg ksantin tartılıp, 1 mL 0,1 N NaOH çözeltisinde hafif ısı uygulaması ile çözülerek bidistile su ile 10 mL'ye tamamlandı. Çözelti +4 °C'de bir hafta dayanıklıdır.

Ksantin Çözeltisi (0,3 mM): Stok ksantin çözeltisinden 1 mL alınarak bidistile su ile 10 mL'ye tamamlandı. Çözelti her deney günü taze olarak hazırlandı.

Etilendiamintetraasetik Asid Çözeltisi (0,6mM): 22,32 mg Na₂EDTA. 2H₂O bidistile suda çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.

Sodyum Karbonat Çözeltisi (400 mM): 4,24 g Na₂CO₃ bidistile suda çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.

BSA Çözeltisi (1 g/L): 10 mg BSA bidistile suda çözülerek 10 mL'ye tamamlandı.

Nitroblue Tetrazolium Klorür (NBT) Çözeltisi (0,15 mM): 1,226 mg NBT bidistile suda çözülerek 10 mL ye tamamlandı. Her deney günü taze olarak hazırlandı.

SOD Çalışma Reaktifi: 10 mL 0,3 mM ksantin, 5 mL 0,6 mM Na₂EDTA, 3 mL 400 mM Na₂CO₃, 1,5 mL 1 g/L BSA, 5 mL 0,15 mM NBT karıştırılarak her deney günü taze olarak hazırlandı.

Amonyum Sülfat Çözeltisi (2 M): 26,428 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bidistile suda çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.

Ksantin Oksidaz Çözeltisi (167 U/L): 2 mg ksantin oksidaz soğutulmuş $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çözeltisinde çözülerek 1 mL'ye tamamlandı.

Bakır Klorür Çözeltisi (0,8 mM): 13,64 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ bidistile suda çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı: 2,85 ml SOD reaktifi örnek ve kör tüpüne aktarıldı. Örnek tüpüne 100 µl süpernatant ilave edildi ve her iki tüpe de 50 µl ksantin oksidaz eklendi. Tüpler 25 °C'de 20 dakika inkübe edildikten sonra tüplere 100 µl CuCl_2 çözeltisi eklendi. En son aşama olarak da kör tüpüne 100 µl süpernatant eklenerek karıştırıldı. Kör ve örnek tüplerinin 560 nm'de absorbansları ayrı ayrı ölçülüp SOD aktivitesi tespit edildi. Spesifik aktivite U/ml protein cinsinden ifade edildi.

MDA Ölçümü:

Lipid peroksidasyon ürünlerinden en stabili olan MDA'nın tiobarbütirik asit ile reaksiyonu sonucu oluşan pembe kırmızı rengin absorbansı spektrofotometrik olarak değerlendirilmesi esasına dayanmaktadır¹⁷⁹.

Kullanılan Reaktifler;

Stok tetrametoksipropan çözeltisi: 0,92 gr tetrametoksipropan 1 mL'de çözülür.

Günlük tetrametoksipropan çözeltisi: 10 mL'lik stok çözelti 100 mL'ye distile su ile tamamlanır. Çalışma sırasında günlük çözelti tekrar 1/10 oranında seyreltilir.

DS çözeltisi: 8,1 gr SDS tartılıp 100 mL'ye distile su ile tamamlanır ve çözülür.

Asetik Asit çözeltisi: 20 mL asetik asit distile su ile 100 mL'ye tamamlanır ve pH'sı 3,5'e ayarlanır.

TBA çözeltisi: 0,8 gr TBA tartılıp, 100 mL'ye distile su ile tamamlanır ve ısıtılarak çözülür.

n-bütanol-piridin çözeltisi (15:1): Stok piridinin 1 mL'si 15 mL n-bütanol ile karıştırılır.

Tüpler 95 °C'de 30 dakika süre ile inkübe edilir. Musluk suyunda soğutulur. 500 µL distile su eklenir. 2,5 mL n-bütanol-piridin karışımı eklenip tüpün kapağı kapatılarak karışımlar beyazlaşınca kadar vortekslenir. 4000

rpm'de 15 dakika santrifüjlenir. Süpernatant fazdan 1 mL alınıp 532 nm'de köre karşı spektrofotometrik olarak ölçülür.

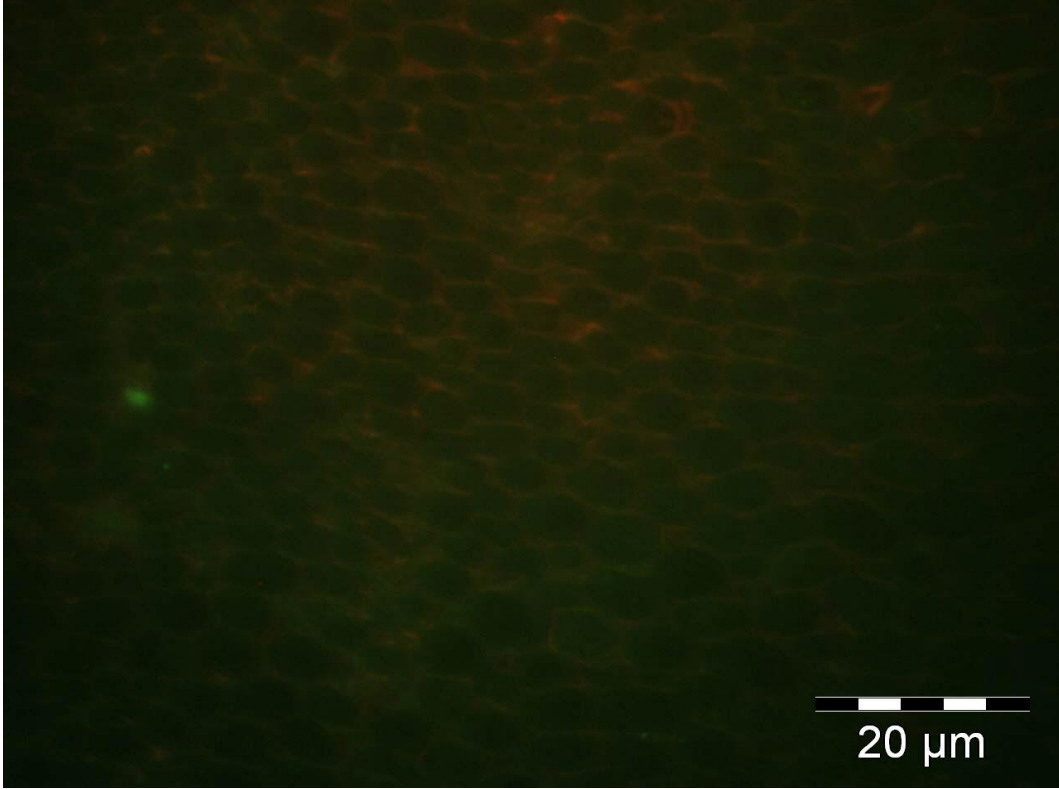
İstatistiksel Analiz

Sürekli değişkenlere ait ölçümler ortalama±standart sapma cinsinden özetlenmiştir. MDA, SOD ve ELISA ölçümleri bakımından gruplar arasında fark olup olmadığı genel doğrusal modeller ile analiz edilmiş, farklılık saptanan değişkenler için farklılığın hangi gruplardan kaynaklı olduğunu saptamak amacıyla öncelikle kontrol grubu ile diğer grupların karşılaştırıldığı Dunnett testi, grupların birbiri ile karşılaştırıldığı Dunn testi uygulanmıştır. Normal miyelin ve bozulmuş miyelin olma oranları bakımından grup karşılaştırılmasında ki-kare testinden yararlanılmıştır. Farklılığın hangi gruplardan kaynaklandığını tespit etmek adına iki oran karşılaştırılması yapılmıştır. $p<0,05$ istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edilmiştir.

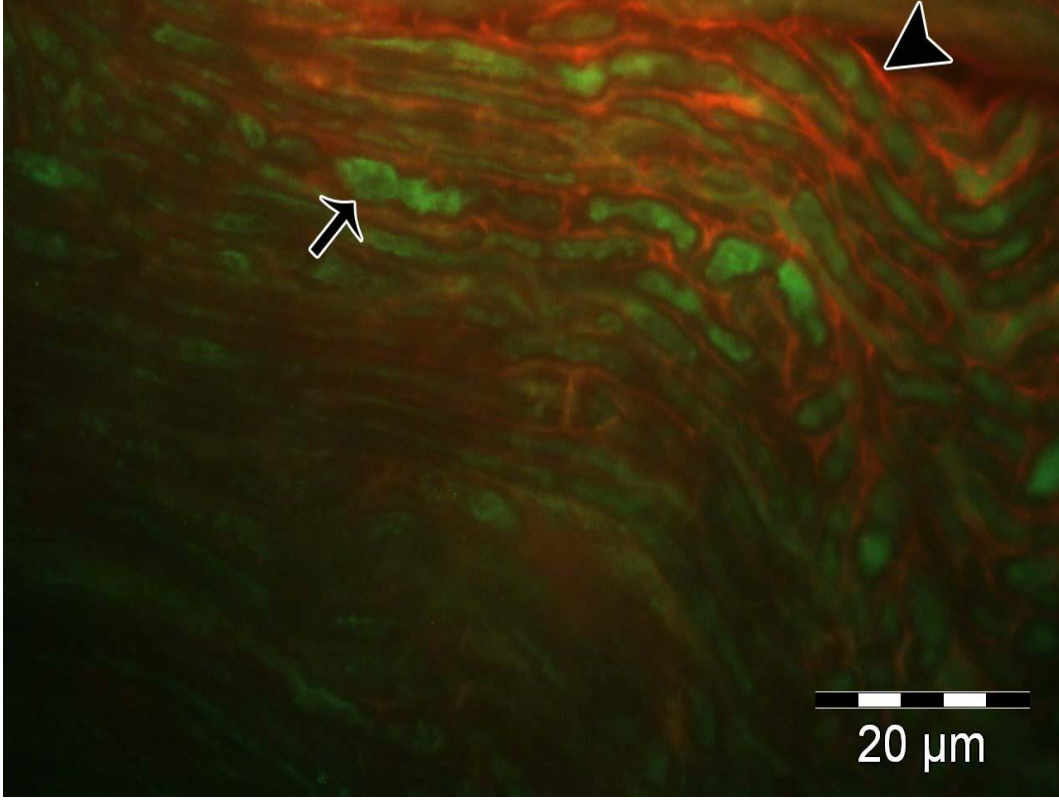
BULGULAR

İmmünofloresan İşaretleme Bulguları

Deney yapılan tüm gruplarda aktif kaspaz 3 için işaretlenme olup olmamasına göre değerlendirme yapıldı. Primer antikoru içermeyen negatif kontrol amacıyla kullanılan kesitlerde S-100 ve aktif kaspaz 3 için işaretlenme gözlenmemiştir. (Resim 2) Kontrol grubuna ait siyatik sinir kesitlerinde bazı aksonlarda zayıf aktif kaspaz 3 işaretlenmesi izlendi. (Resim 3)



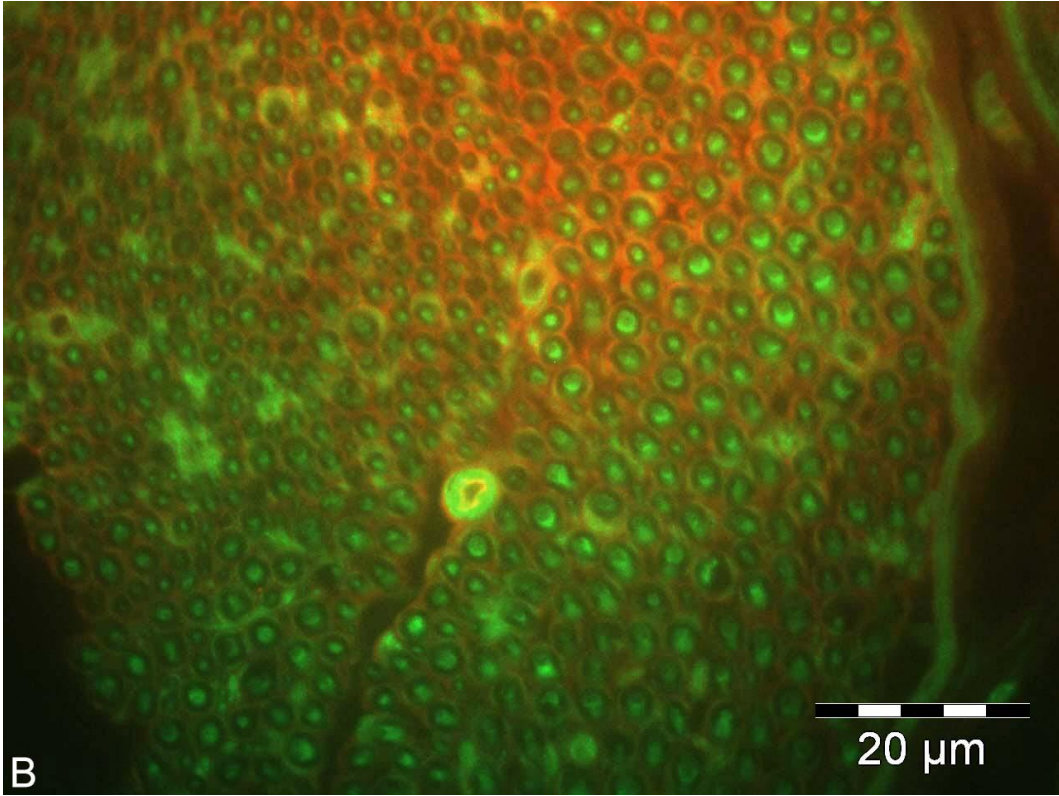
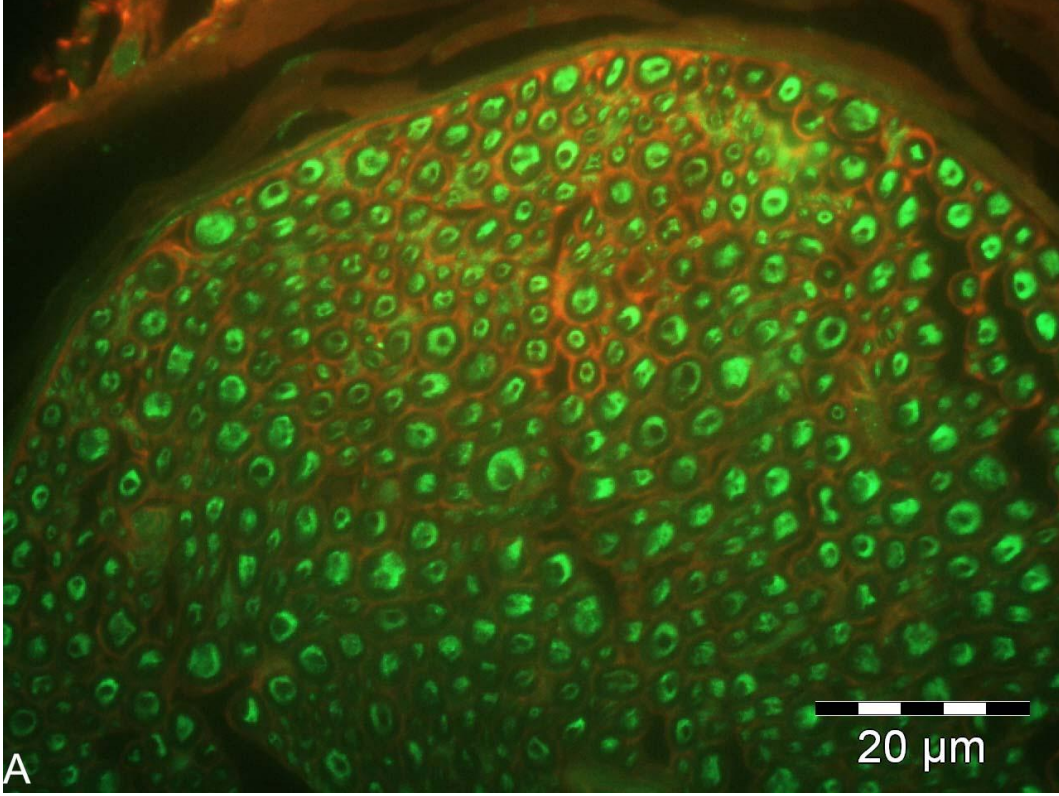
Resim 2: Negatif kontrolX1200.



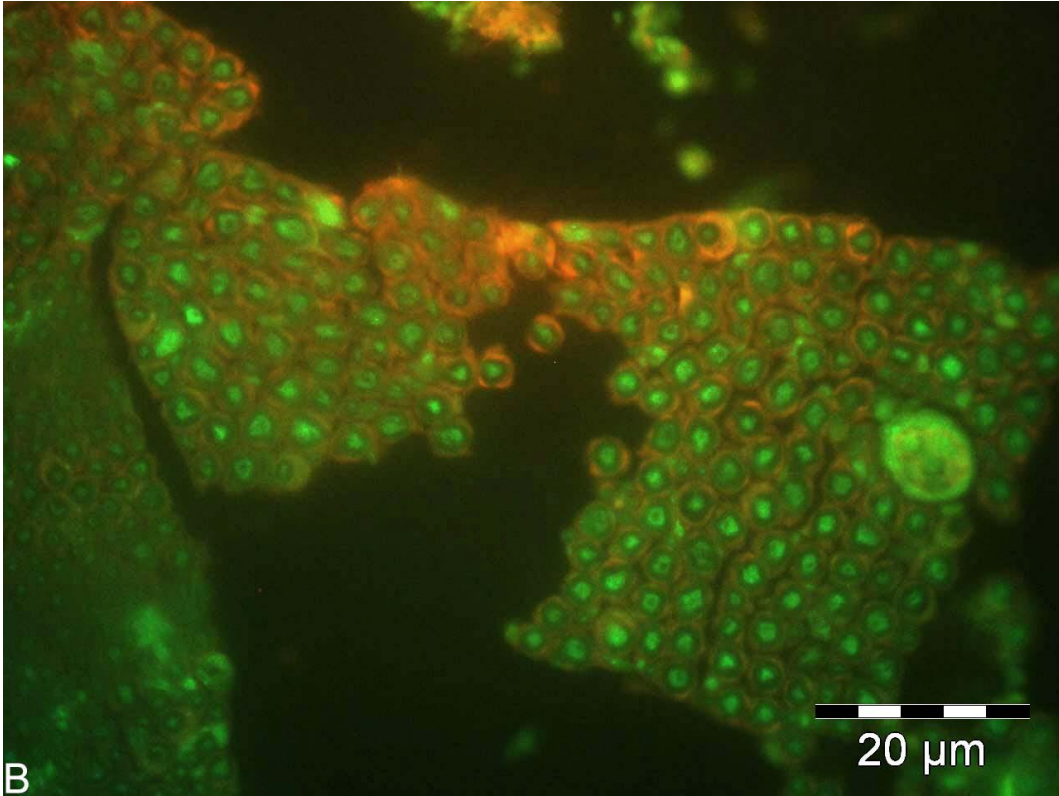
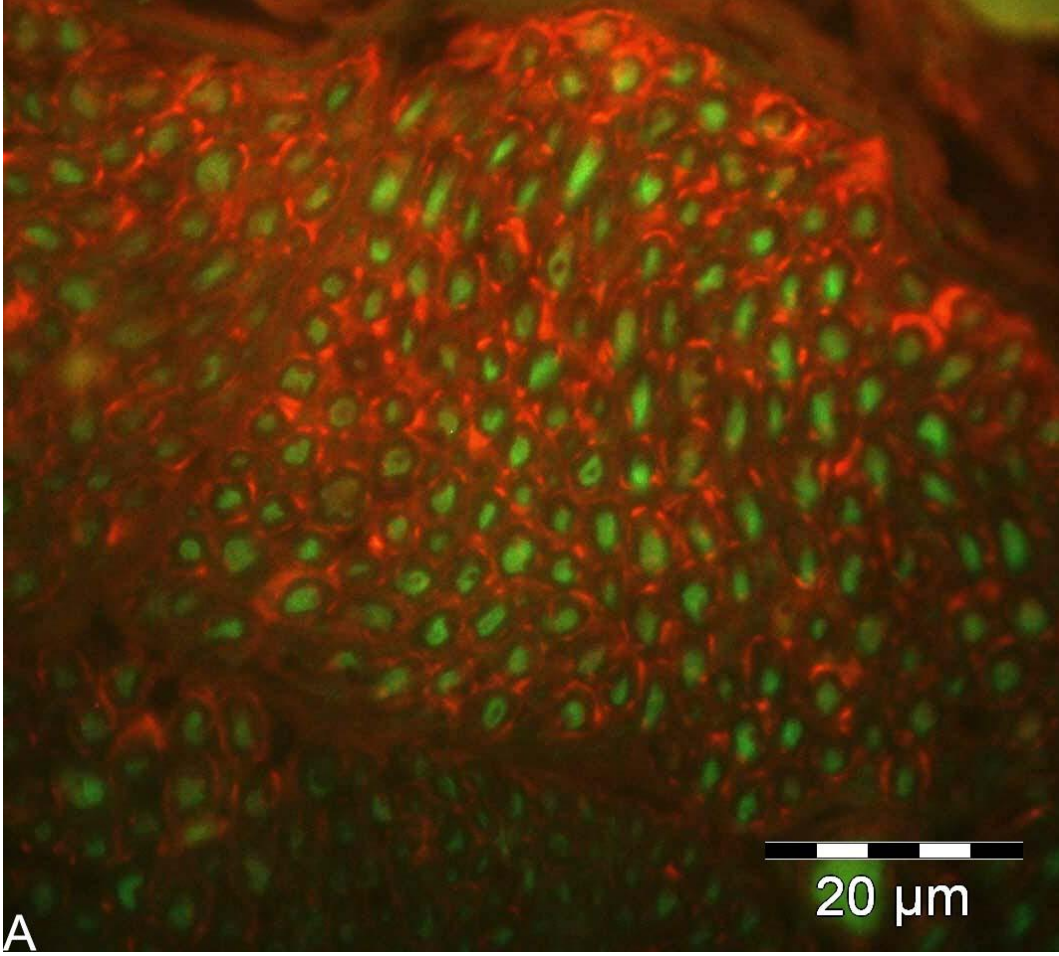
Resim 3: Kontrol grubu; S-100 (ok başı, kırmızı), aktif kaspaz 3 (ok, yeşil) işaretlenmesi X1200.

Kontrol grubu ile diğer tüm gruplar aktif kaspaz 3 için immunofloresan işaretlenme bakımından karşılaştırıldığında iskemi (Resim 4A) ve iskemi+4 saat reperfüzyon (Resim 5A), iskemi+7 gün reperfüzyon (Resim 6A) ve iskemi+21 gün reperfüzyon (Resim 7A) gruplarında aktif kaspaz 3 işaretlenmesinde artma tespit edilmiştir. Bu artışın iskemi grubunda diğer gruplara göre daha belirgin olduğu gözlemlendi.

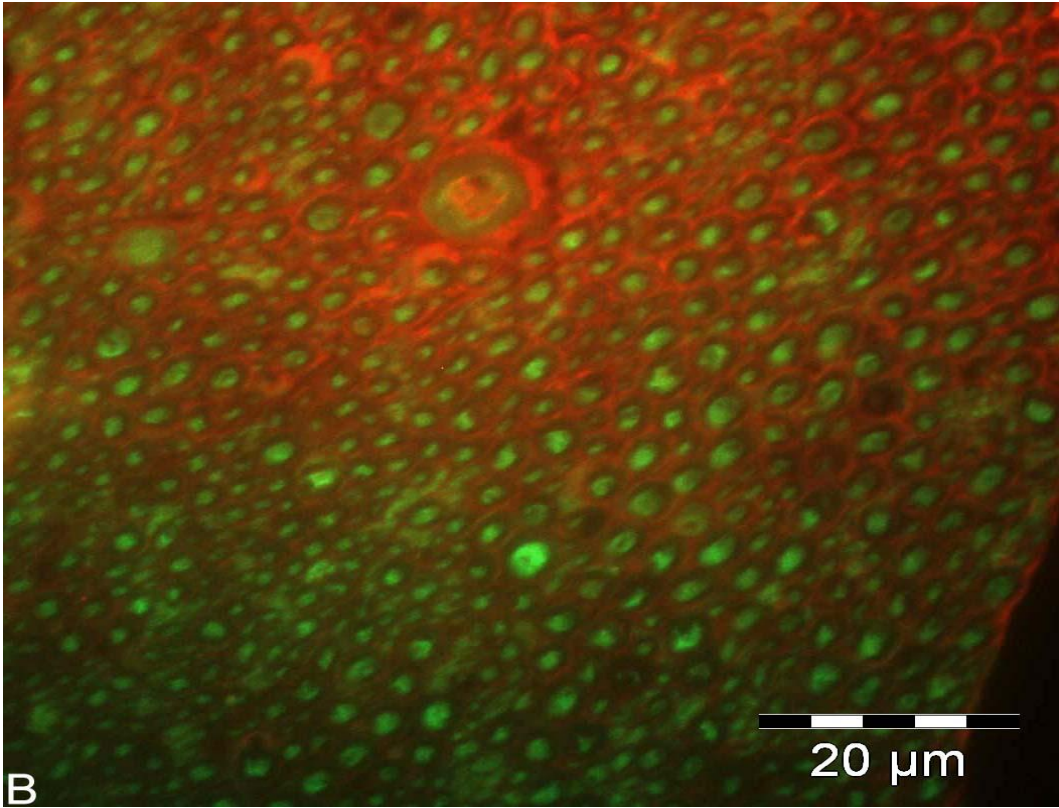
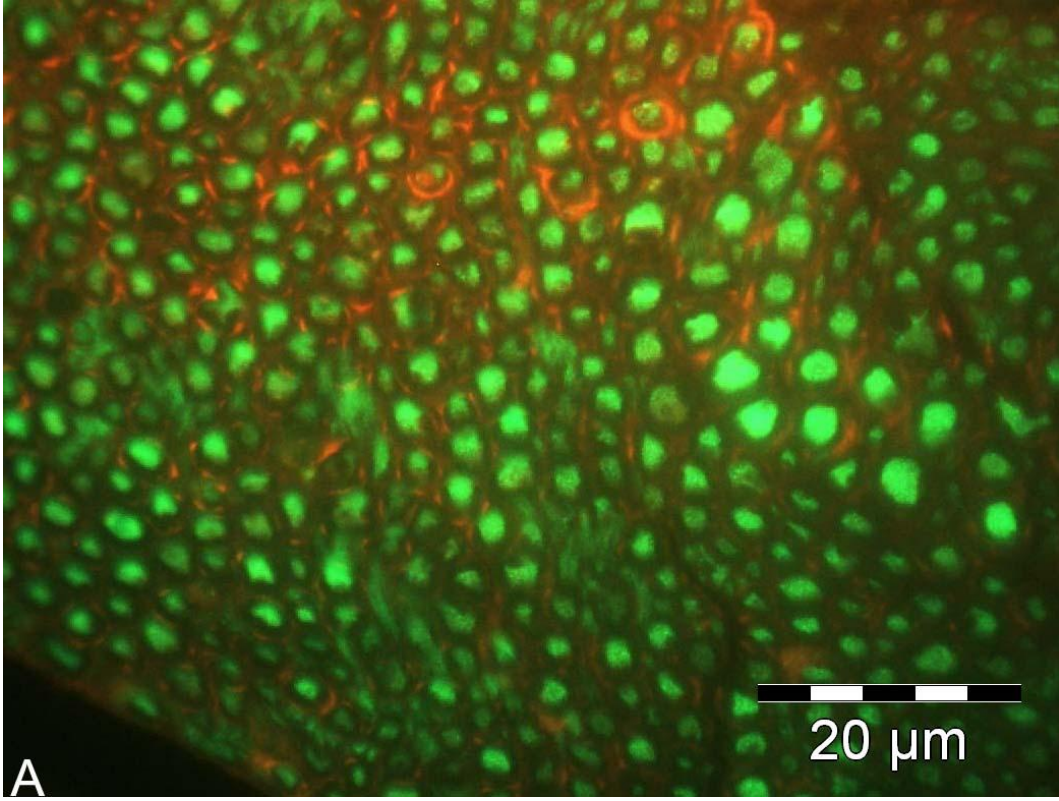
PA verilen iskemi (Resim 4B), iskemi+7 gün reperfüzyon (Resim 6B) ve iskemi+21 gün reperfüzyon (Resim 7B) uygulanan gruplarda aktif kaspaz 3 işaretlenmesinde azalma saptanmıştır. Ancak PA verilen iskemi+ 4 saat reperfüzyon (Resim 5B) uygulanan grupta ise bu azalma olmamıştır.



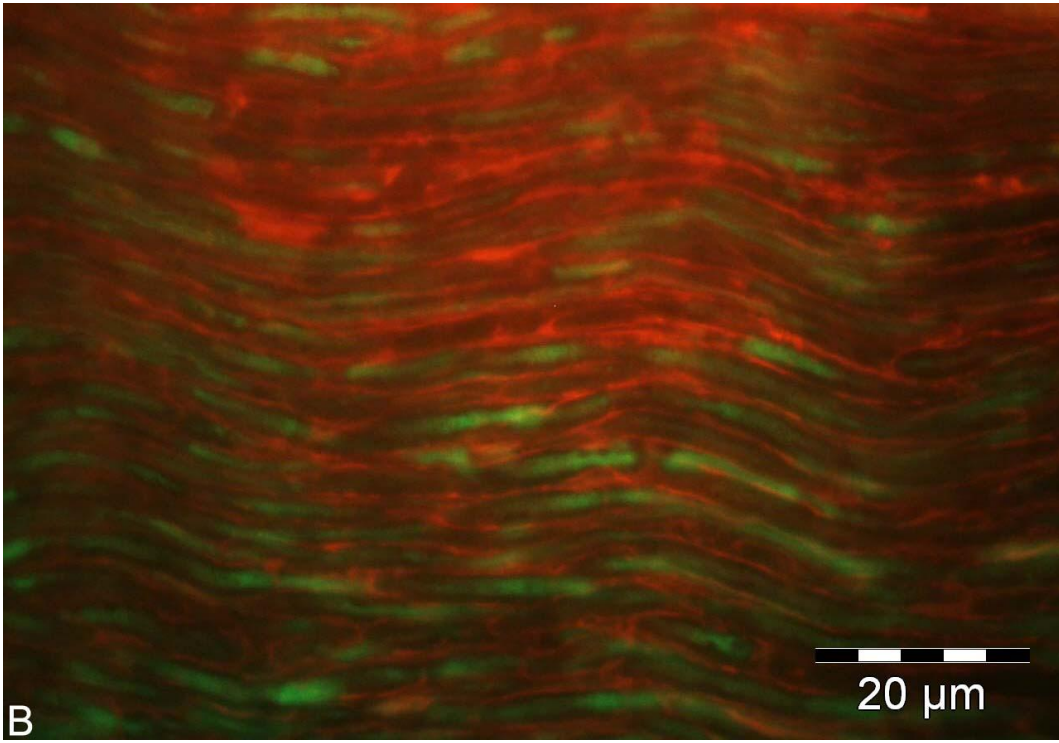
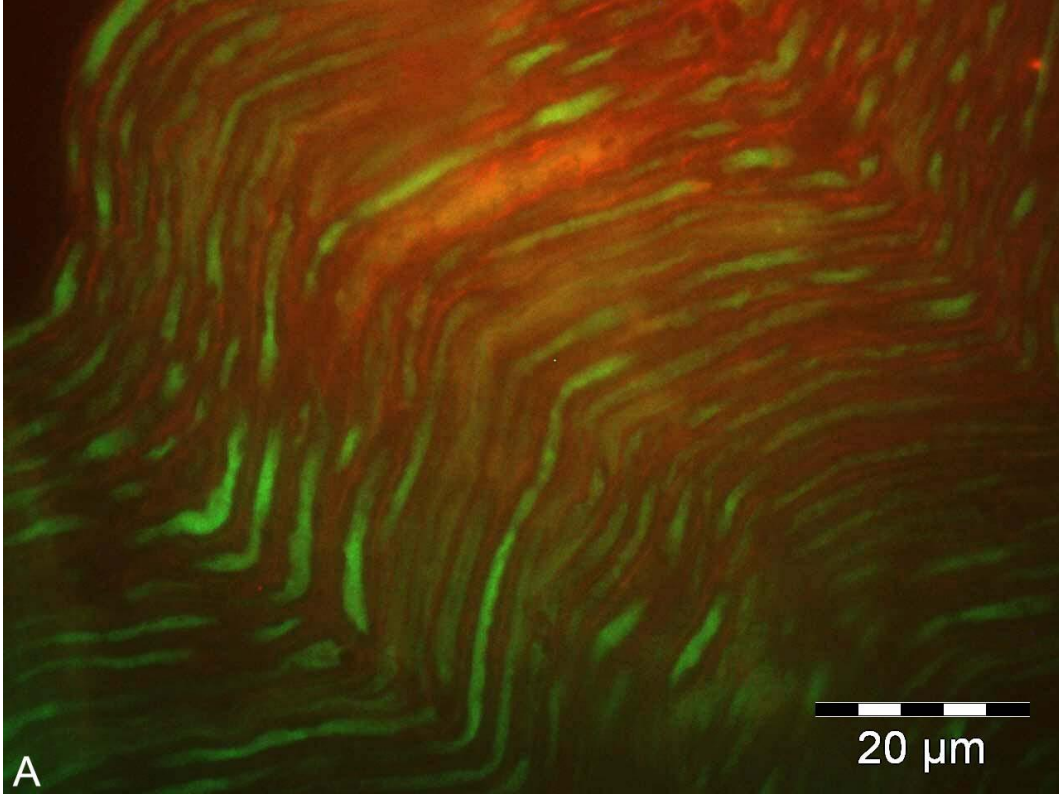
Resim 4 A: İskemi grubu; **B:** Proantosiyanidin+iskemi grubu; S-100 (kırmızı), aktif kaspaz 3(yeşil) işaretlenmesi X1200.



Resim 5A: iskemi+4 saat reperfüzyon grubu; **B:** Proantosiyanidin+iskemi +4 saat reperfüzyon grubu; S-100 (kırmızı), aktif kaspaz 3(yeşil) İşaretlenmesi X1200.



Resim 6A:İskemi+7 gün reperfüzyon grubu; **B:** Proantosiyanidin+iskemi+7 gün reperfüzyon grubu; S-100 (kırmızı), aktif kaspaz 3(yeşil) işaretlenmesi X1200.



Resim 7A: İskemi+21 gün reperfüzyon grubu; **B:** Proantosiyanidin+iskemi +21 gün reperfüzyon grubu; S-100 (kırmızı), aktif kaspaz 3 (yeşil) işaretlenmesi X1200.

ELISA Bulguları

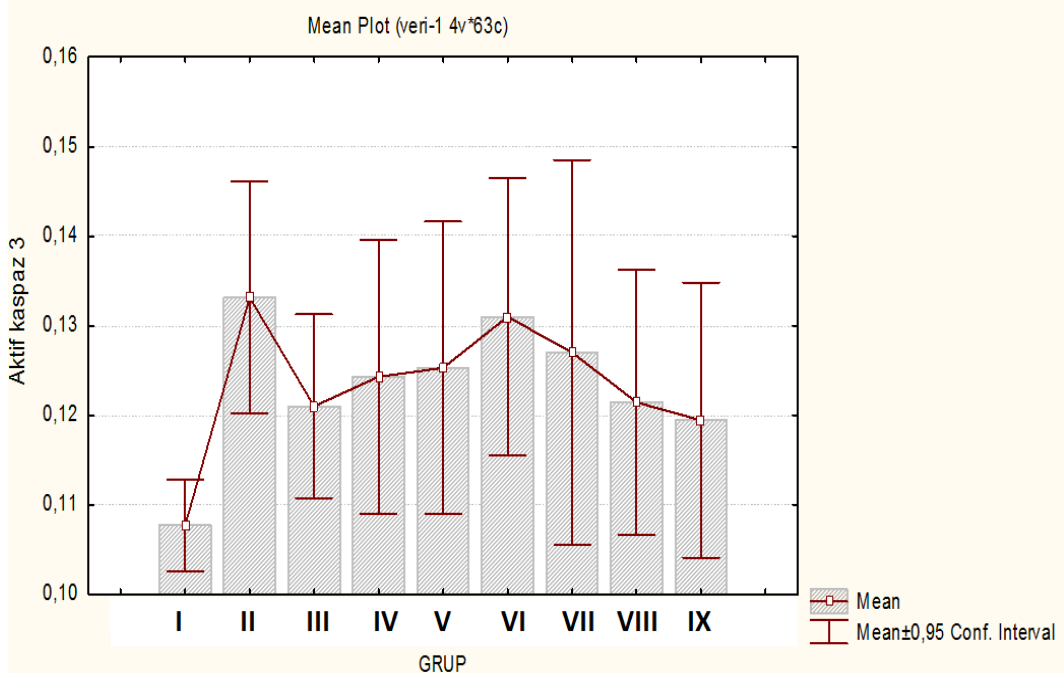
Siyatik sinir dokusunda ELISA yöntemi ile yapılan aktif kaspaz 3 ölçümlerinde kontrol grubu ile diğer gruplar karşılaştırıldığında tüm gruplarda yüksek bulunmuş ancak bu fark sadece iskemi grubunda istatistiksel olarak anlamlı olarak tespit edilmiştir. ($p=0,027$) PA verilen gruplarda iskemi ve iskemi sonrası 7 gün reperfüzyon uygulanan gruplarda aktif kaspaz 3 değerlerinde düşme saptanmıştır. PA verilen iskemi sonrası 4 saat reperfüzyon uygulanan grupta ise aktif kaspaz 3 değerlerinde azalma olmamıştır (Şekil 4.2.1).

İskemi sonrası 4 saat reperfüzyon uygulanan grupta gerek aktif kaspaz 3 için gerek immünofloresan işaretlenme bakımından gerekse ELISA yöntemi ile yapılan aktif kaspaz 3 ölçümlerinde PA verilmesinin aktif kaspaz 3 düzeylerinde azalmaya yol açmadığı görülmüştür.

ELISA yöntemiyle ölçülen aktif kaspaz 3 değerleri Tablo 4.2.1'de verilmiştir.

Tablo 2: Siyatik sinir dokusunda aktif kaspaz 3 değerlerinin ELISA yöntemi ile ölçüm sonuçları. (* kontrol grubu ile istatistiksel anlamlı fark)

Gruplar	Ort±Std. Sapma	p değeri
Grup I	0,11±0,01	
Grup II	0,13±0,01	*0,027
Grup III	0,12±0,01	0,505
Grup IV	0,12±0,02	0,273
Grup V	0,12±0,02	0,220
Grup VI	0,13±0,02	0,052
Grup VII	0,13±0,02	0,148
Grup VIII	0,12±0,02	0,470
Grup IX	0,12±0,02	0,638



Şekil 1: Siyatik sinir dokusunda aktif kaspaz 3 değerlerinin gruplar arasında karşılaştırılma grafiği.

Elektron mikroskopik bulgular

Elektron mikroskopik değerlendirmede aksonları saran miyelin kılıfları değerlendirilmiştir. Her gruptan randomize olarak 150 akson miyelin kılıfı değerlendirmeye alınarak normal ve delaminasyon gösteren miyelin kılıflar sayılmıştır. Kontrol grubunda tüm miyelin kılıfları normal olarak tespit edilmiştir. (Resim 8) Ayrıca miyelinsiz sinir lifleri ve hücreler arası ödem bulgularıda değerlendirilmiştir.

İskemi grubu (Resim 9, 10, 11), iskemi+4 saat reperfüzyon grubu (Resim 14, 15), iskemi+ 7 gün reperfüzyon grubu (Resim 17,18) ve iskemi+ 21 gün reperfüzyon grubunda (Resim 20) miyelin kılıflarında delaminasyon tespit edilen aksonların sayısı sırasıyla 117 (%78), 108 (%72), 108 (%72) ve 90 (%60) olarak saptanmıştır. (Şekil 2)

PA+ iskemi (Resim 12, 13), PA+ iskemi 4 saat reperfüzyon (Resim 16), PA+ iskemi+ 7 gün reperfüzyon (Resim 19) gruplarında aksonların miyelin kılıflarında oluşan delaminasyonda önemli ölçüde azalma görülürken, PA+ iskemi+ 21 gün reperfüzyon grubunda azalma olmadığı tespit edilmiştir (Resim 21). İskemi+ 4 saat reperfüzyon grubunda 108 (%72) olarak tespit edilen delaminasyon gösteren myelin kılıfı sayısı PA+ iskemi+ 4 saat reperfüzyon

grubunda 69 (%46) olarak tespit edilmiş ve her iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (p=0,001)

İskemi+ 7 gün reperfüzyon grubu ve iskemi+ 21 gün reperfüzyon grubunda miyelin kılıfta delaminasyon saptanırken ileri derecede miyelin hasarına rastlanmamıştır.

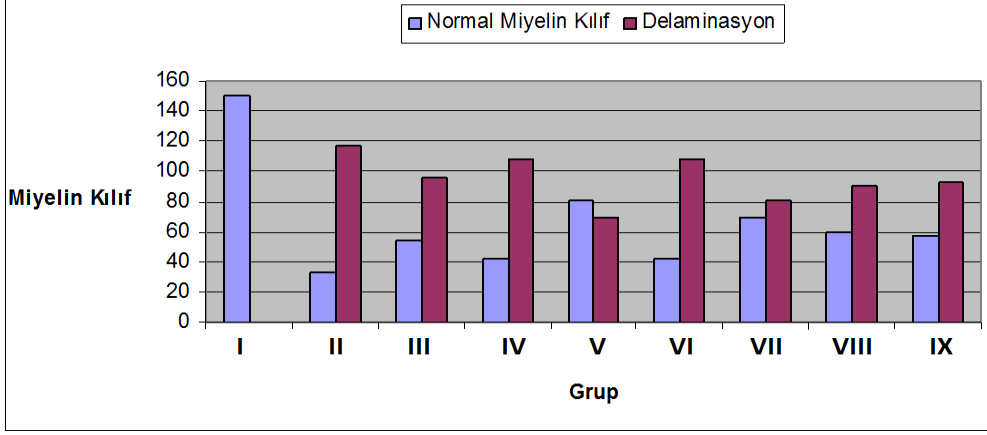
İskemi grubu (Resim 9, 11) ve iskemi+ 4 saat reperfüzyon grubunda (Resim 14) bazı aksonlarda ileri derecede miyelin hasarına bağlı bal peteği görünümü tespit edilirken, PA + iskemi grubu (Resim 12, 13) ve PA+ iskemi+ 4 saat reperfüzyon grubunda (Resim 16) ise ileri derecede miyelin kılıf hasarına rastlanmamıştır.

Miyelin kılıfların değerlendirilmesi ile ilgili sonuçlar Tablo 3’de verilmiştir.

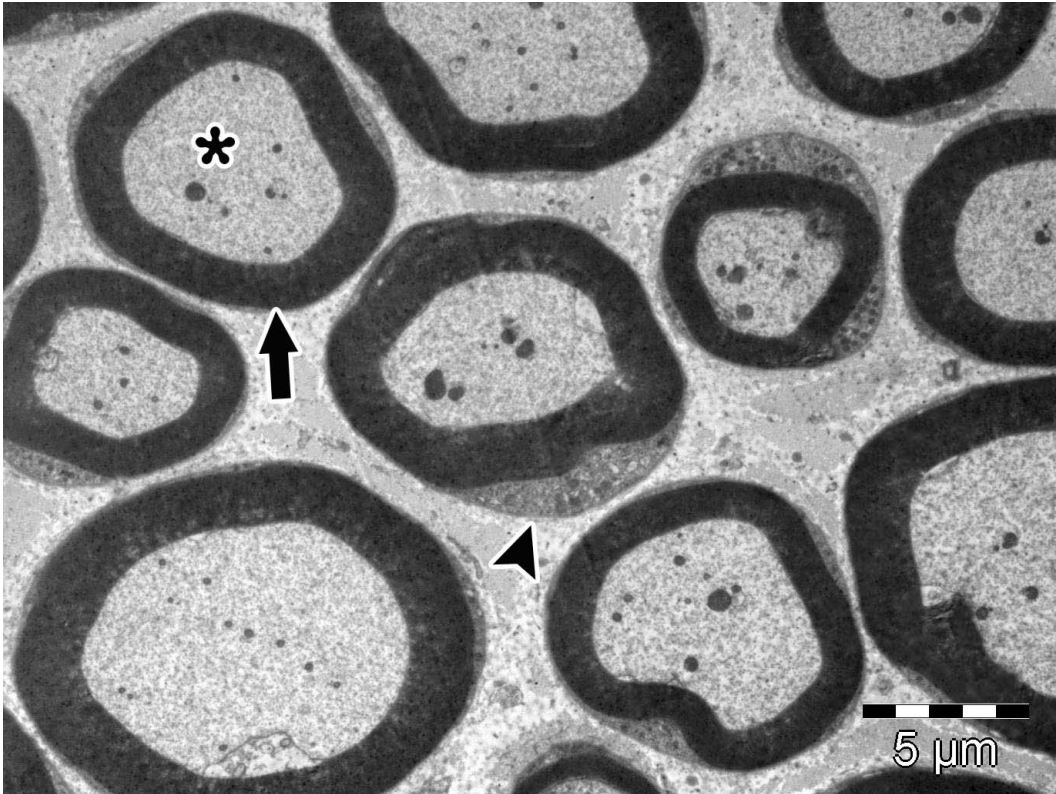
Miyelinsiz sinir liflerinin tamamında normal morfolojik görünüm tespit edilmiştir. İskemi ve İR’un yol açtığı hücreler arası ödemin PA verilmesi ile azalmadığı tespit edilmiştir.

Tablo 3: Normal ve delaminasyon gösteren miyelin kılıf dağılımının gruplar arası dağılımı

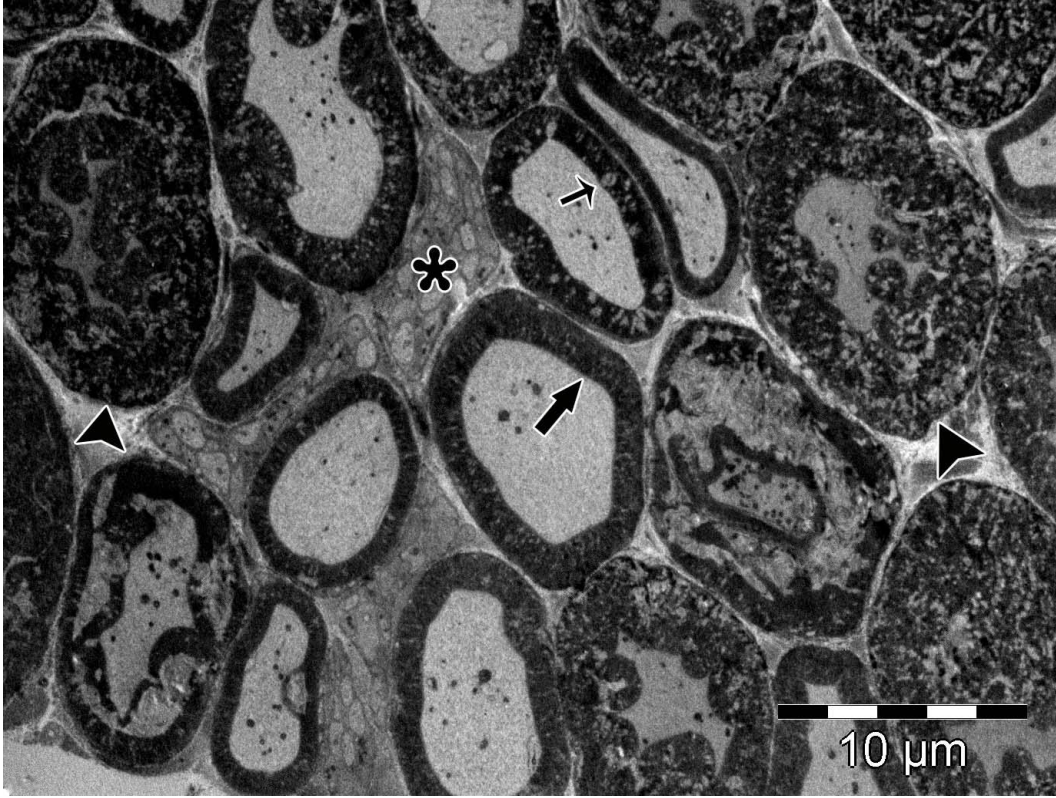
Gruplar	Normal miyelin kılıf	Delaminasyon gösteren miyelin kılıf
Grup I	150	0 (%0)
Grup II	33	117 (%78)
Grup III	54	96 (%64)
Grup IV	42	108 (%72)
Grup V	81	69 (%46)
Grup VI	42	108 (%72)
Grup VII	69	81 (%54)
Grup VIII	60	90 (%60)
Grup IX	57	93 (%62)



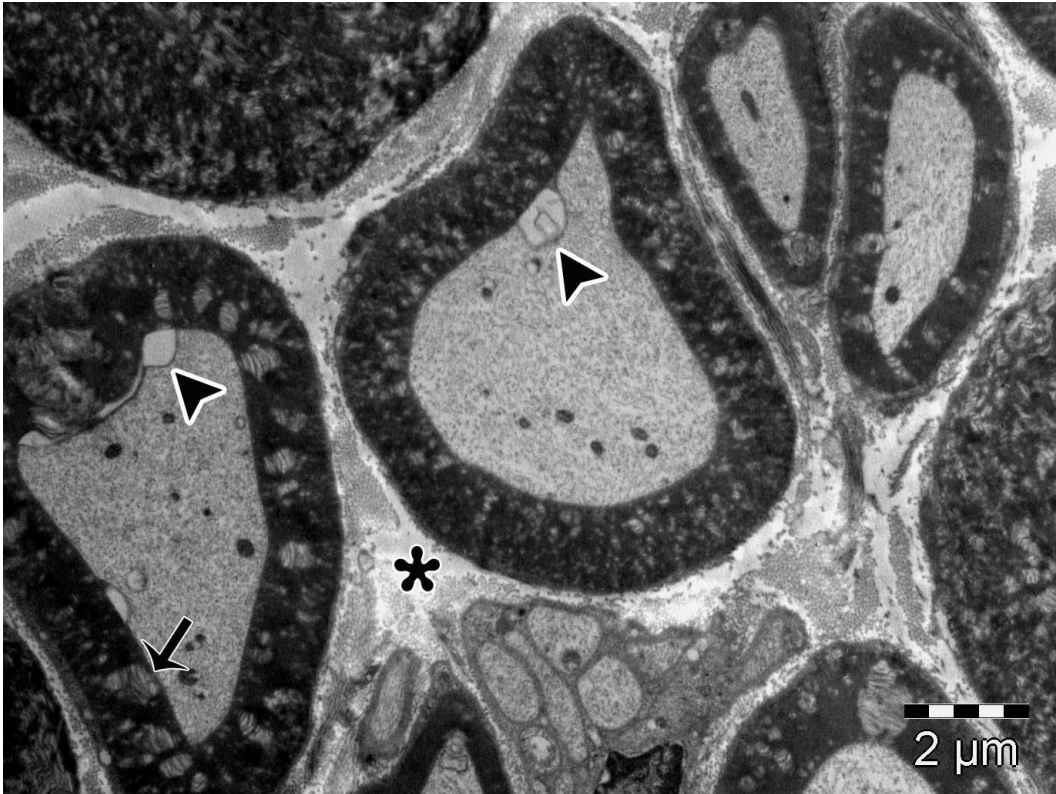
Şekil 2: Normal ve delaminasyon gösteren miyelin kılıf dağılımının gruplar arası karşılaştırılması.



Resim 8: Kontrol grubu, normal miyelin kılıf (ok), Schwann hücresi(ok başı), akson(yıldız) X4000.



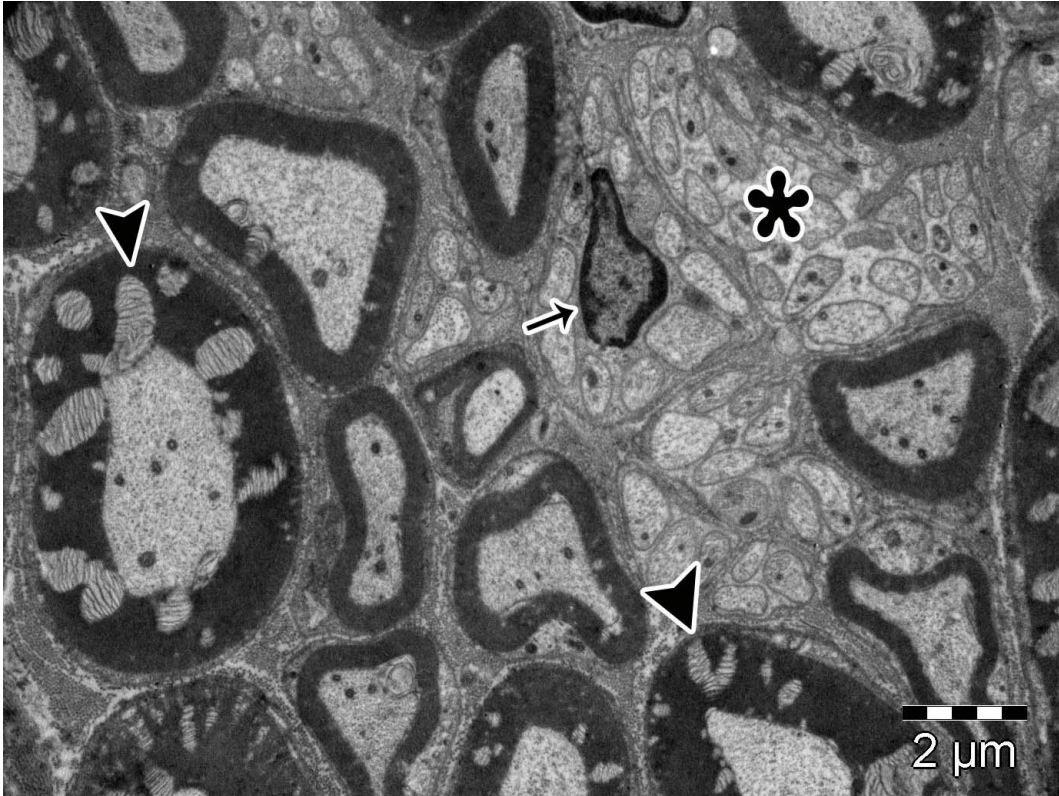
Resim 9: İskemi grubu, normal miyelin kılıf (kalın ok), miyelin kılıfta delaminasyon(ince ok), ileri derecede hasarlı miyelin kılıf (ok başı), miyelinsiz sinir lifleri (yıldız) X3000.



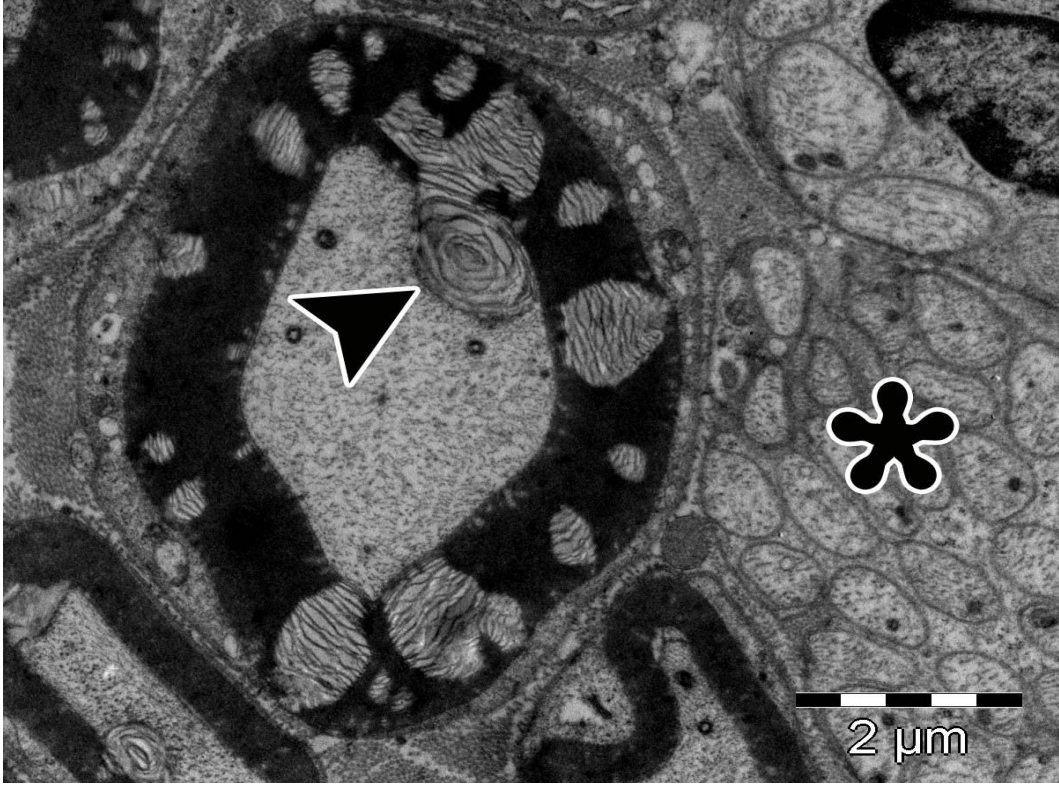
Resim 10: İskemi grubu, miyelin kılıfta delaminasyon (ok), aksonda çekilme (ok başı), hücreler arası ödem (yıldız) X7500.



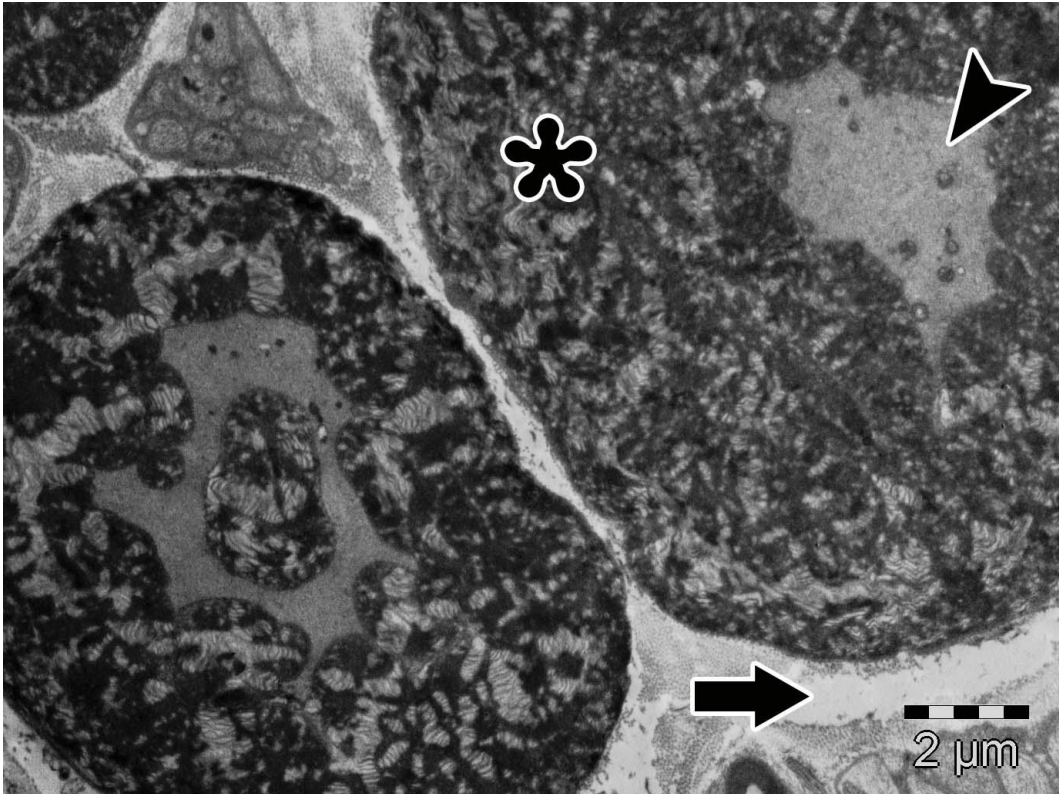
Resim 11: İskemi grubu, ileri derecede hasarlı miyelin kılıf(kalın ok), delaminasyon(ok başı), miyelinsiz aksonlar (ince ok), hücreler arası ödem (yıldız) X7500.



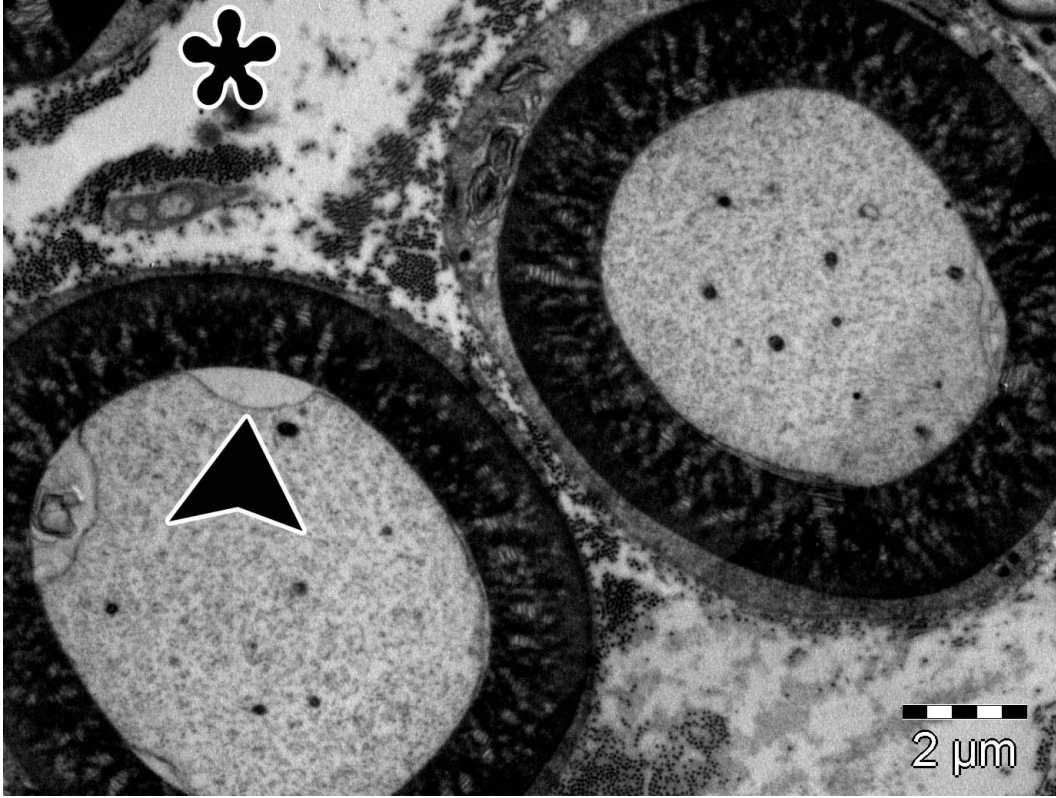
Resim 12: Proantosiyanidin+iskemi grubu, delaminasyon (ok başı), Schwann hücre çekirdeği (ok), miyelinsiz aksonlar (yıldız) X7500.



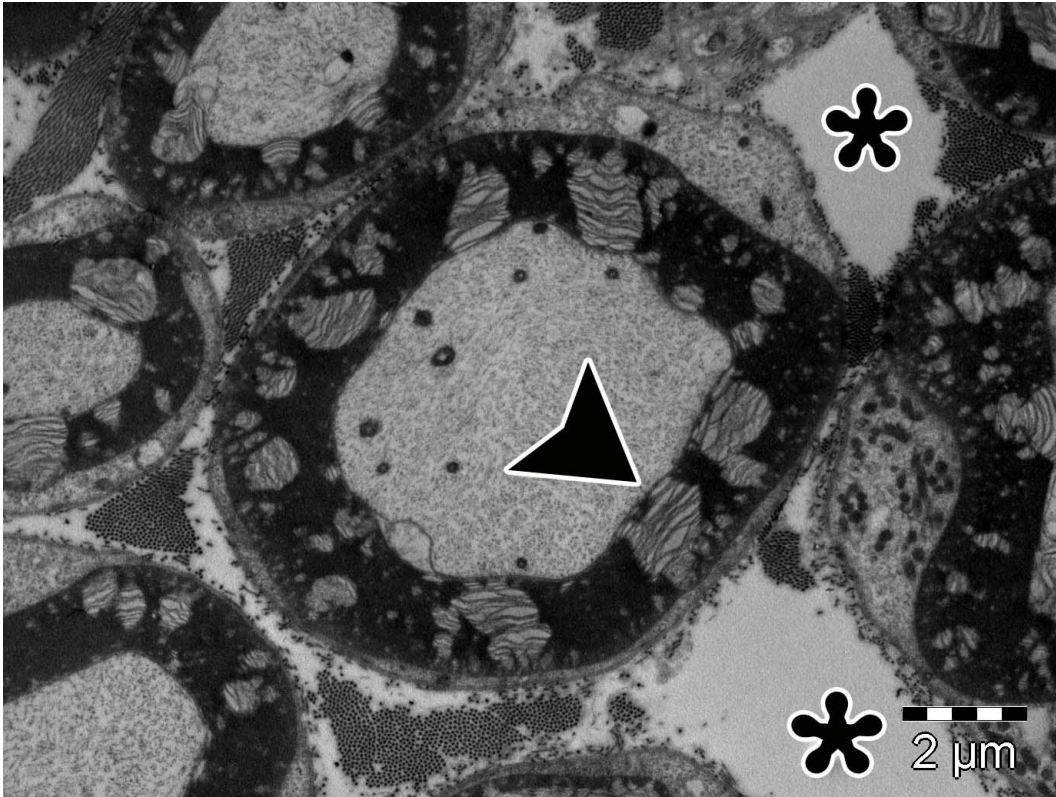
Resim 13: Proantosiyanidin+iskemi grubu, delaminasyon (ok başı), miyelinsiz aksonlar (yıldız)X12000.



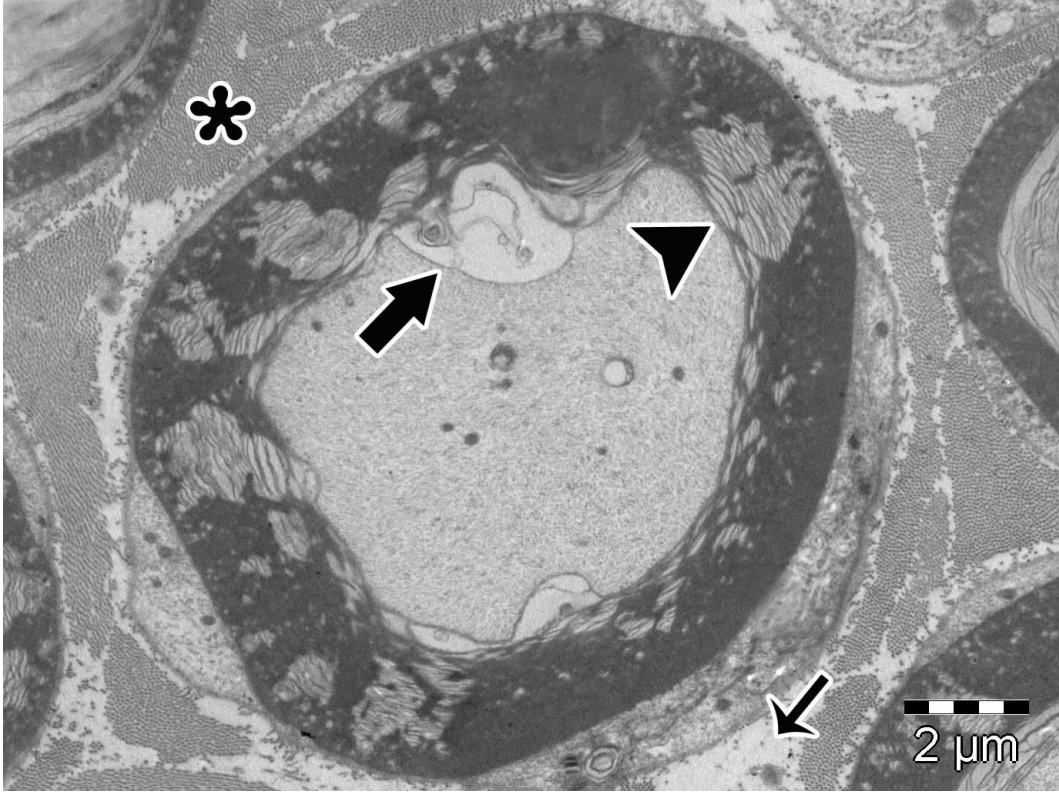
Resim 14: İskemi+4 saat reperfüzyon grubu, ileri derecede hasarlı miyelın kılıf (yıldız), akson (ok başı), hücreler arası ödem (ok) X7500.



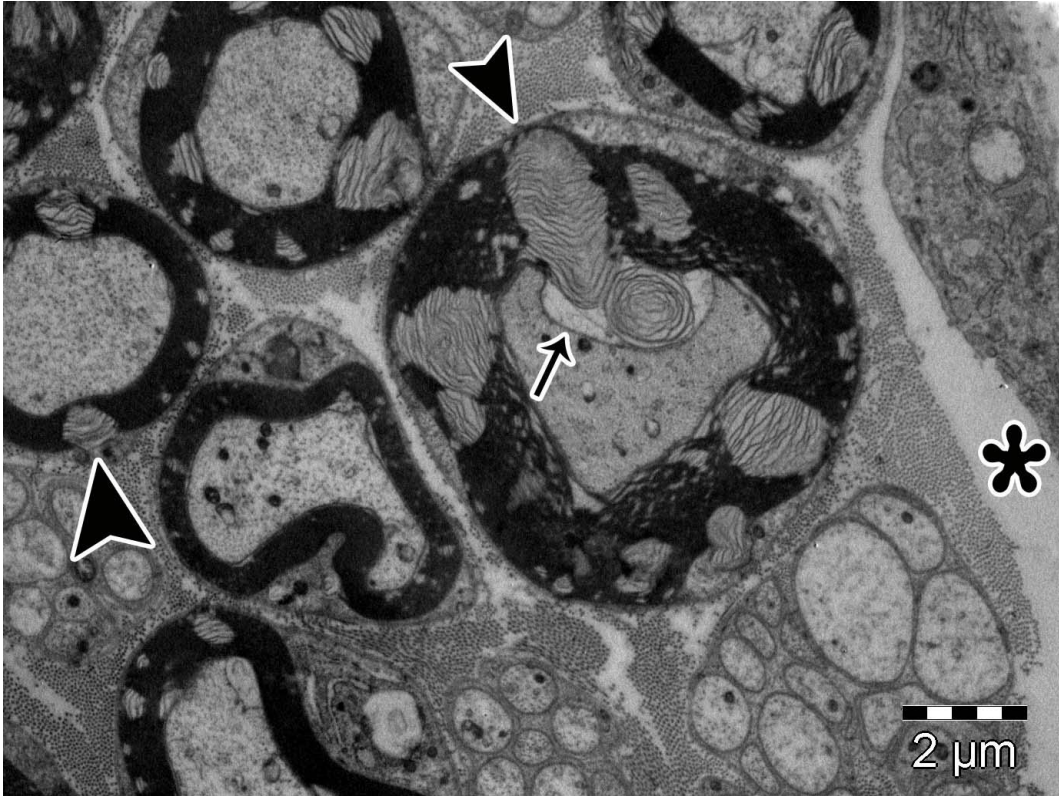
Resim 15: Proantosiyanidin+iskemi+4 saat reperfüzyon grubu, aksonda çekilme (ok başı), hücreler arası ödem(yıldız)X7500K.



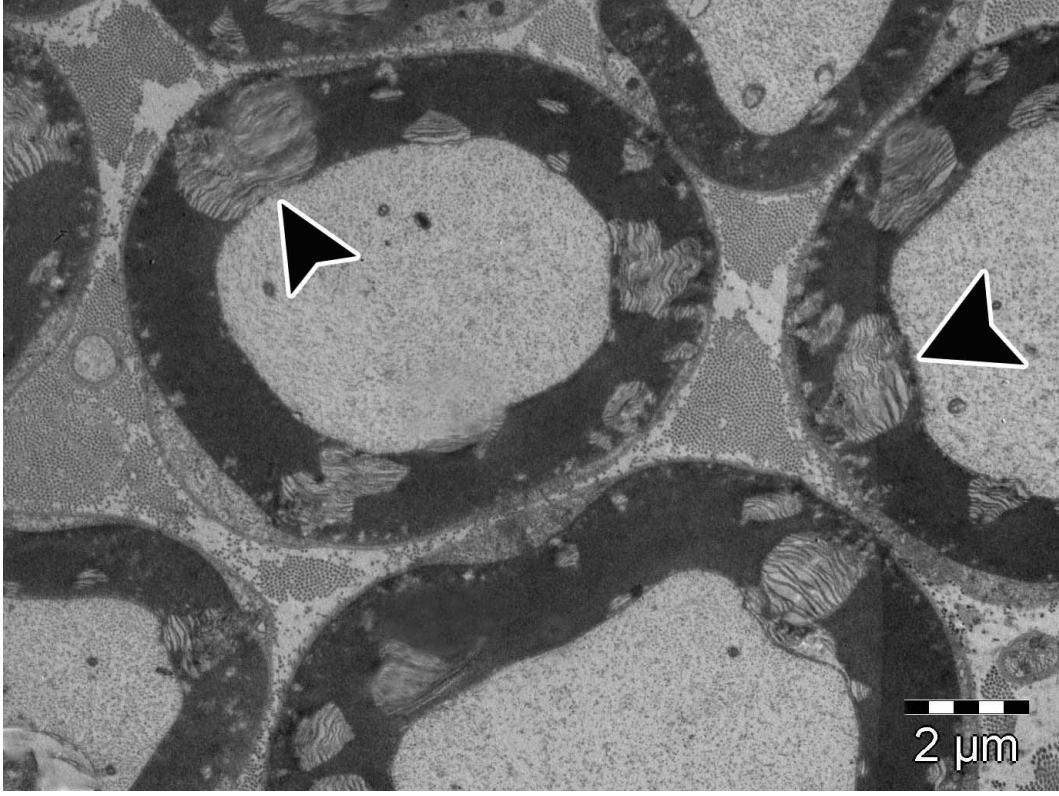
Resim 16: Proantosiyanidin+iskemi+4 saat reperfüzyon grubu, delaminasyon (ok başı), hücrelerarası ödem (yıldız)X7500.



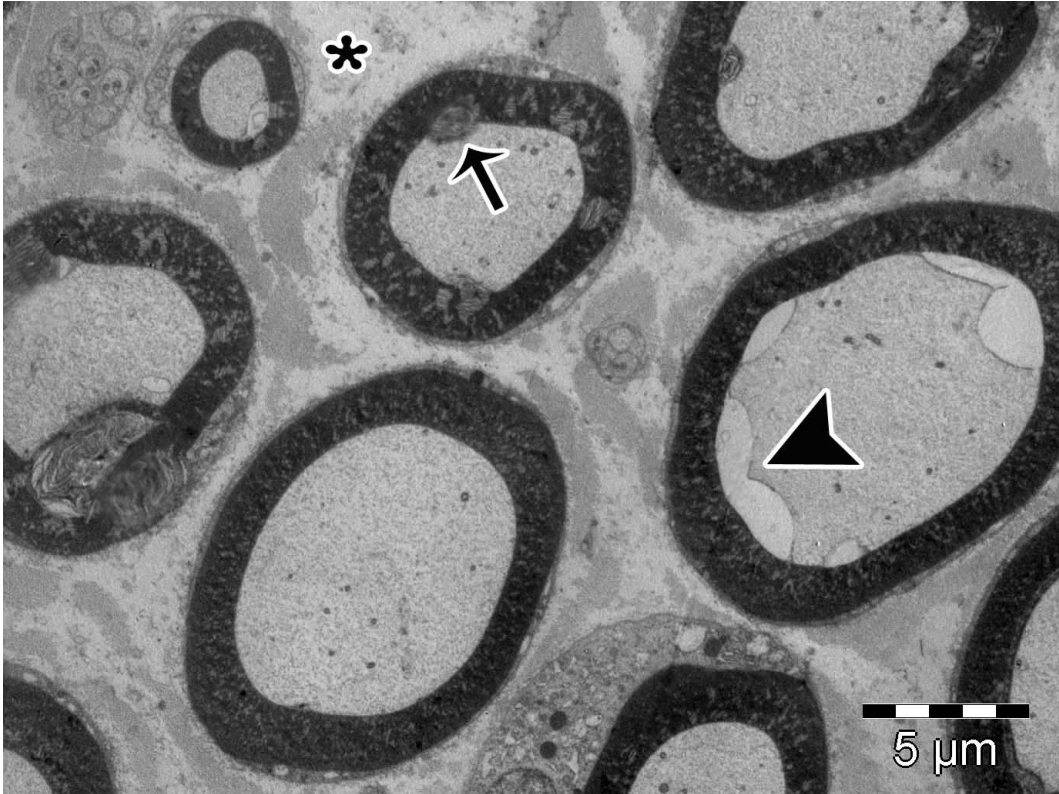
Resim 17: İskemi+7 gün reperfüzyon grubu, aksonda çekilme (kalın ok), delaminasyon (ok başı), hücreler arası ödem (ince ok), bağ dokusu lifleri (yıldız) X7500.



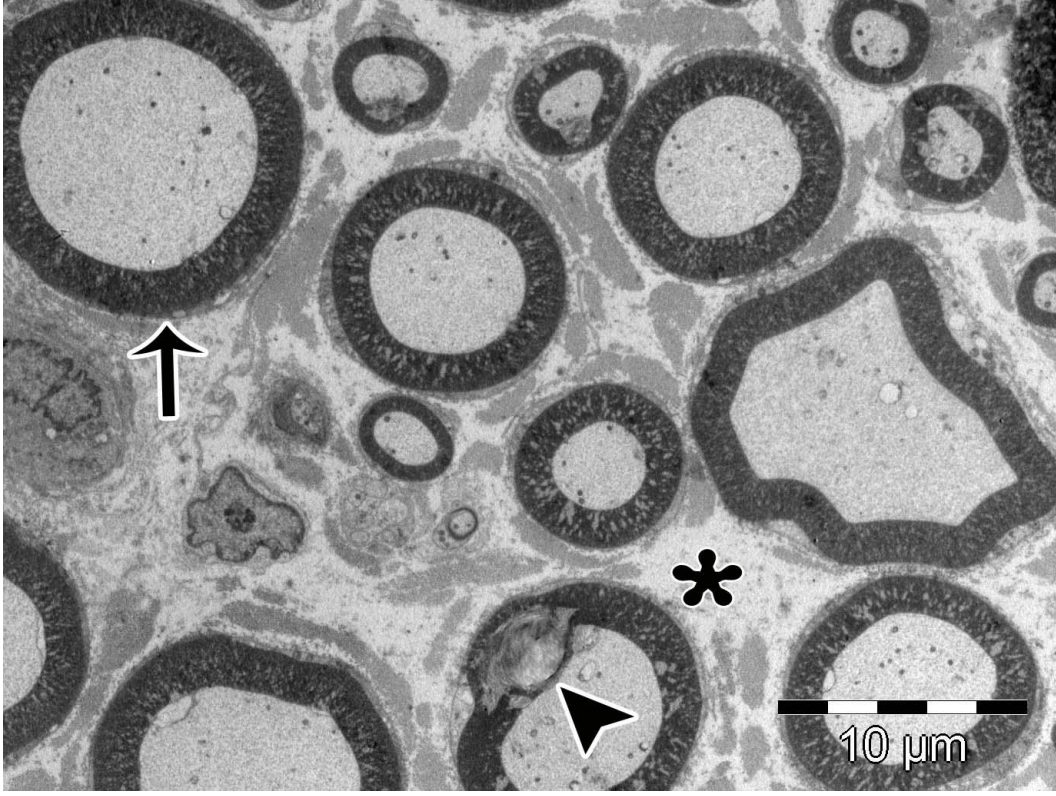
Resim 18: İskemi+7 gün reperfüzyon grubu, aksonda çekilme (ok), delaminasyon (ok başı), hücreler arası ödem (yıldız) X7500.



Resim 19: Proantosiyanidin+İskemi+7 gün reperfüzyon grubu, delaminasyon (ok başı)X7500



Resim 20: İskemi+21 gün reperfüzyon grubu, delaminasyon (ok), aksonda çekilme (ok başı), hücreler arası ödem (yıldız) X4000.



Resim 21: Proantosiyanidin+iskemi+21 gün reperfüzyon grubu, miyelin kılıf (ok), delaminasyon (ok başı), hücreler arası ödem (yıldız) X3000.

Biyokimyasal Analiz Bulguları

Serum oksidatif hasarın neden olduğu lipit peroksidasyonunun şiddetini belirlemek için MDA, antioksidan enzim aktivitesinin etkinliğinin tespiti için SOD ölçümleri kullanılmıştır. Tüm deneklerde yapılan ölçümler Tablo 4, 5, 6'da görülmektedir.

Tablo 4: Kontrol grubundaki deneklerin serum MDA ve SOD değerleri

Grup	Denek No	MDA (nmol/ml)	SOD (U/ml)
Grup I	1	0,22905	8,335944
	2	0,47846	5,61994
	3	0,11198	6,584909
	4	0,82967	5,084473
	5	0,23414	8,859708
	6	0,5599	8,467005
	7	0,26468	4,859534

Tablo 5: İskemi ve İR grubundaki deneklerin serum MDA ve SOD değerleri

Grup	Denek No	MDA(nmol/ml)	SOD (U/ml)
Grup II	1	0,78386	5,411819
	2	0,88566	1,034523
	3	1,22669	5,203789
	4	0,88057	4,507527
	5	0,73296	1,541956
	6	3,29832	3,88443
	7	0,70751	3,125445
Grup IV	1	0,36648	1,210598
	2	0,4581	3,4846
	3	0,509	4,499431
	4	0,6108	1,843218
	5	0,93147	3,499543
	6	1,21651	1,246204
	7	1,07908	2,140401
Grup VI	1	0,19342	4,096851
	2	0,90093	5,629891
	3	0,27995	3,104303
	4	0,73805	4,383411
	5	0,54972	3,798147
	6	0,48355	2,748994
	7	0,67697	3,208931
Grup VIII	1	0,46828	3,837015
	2	1,36412	2,499098
	3	1,56772	0,607889
	4	0,39193	0,925783
	5	1,35903	0,520548
	6	0,7635	1,586146
	7	0,7635	0,773975

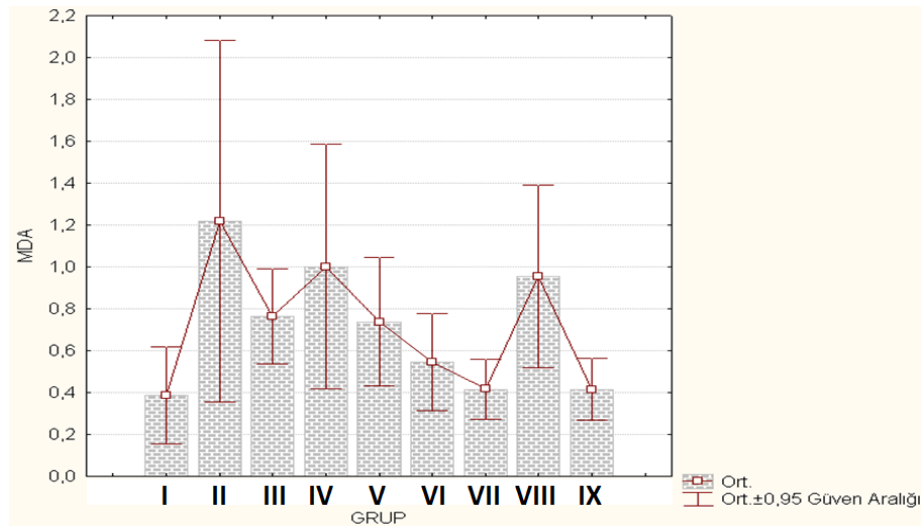
Tablo 6: PA verilen İskemi ve İR grubundaki deneklerin serum MDA ve SOD değerleri

Grup	Denek No	MDA (nmol/ml)	SOD (U/ml)
Grup III	1	0,73805	5,093472
	2	0,29522	5,104303
	3	1,06381	4,907758
	4	0,63116	4,294852
	5	0,89075	5,281745
	6	0,8653	0,393064
	7	0,8653	1,540631
Grup V	1	2,35667	2,672811
	2	0,96201	2,344909
	3	1,05872	2,997859
	4	0,5599	1,507358
	5	0,87548	1,658768
	6	0,66679	2,51474
	7	0,53445	0,41627
Grup VII	1	0,22905	6,72363
	2	0,58026	4,641969
	3	0,59553	5,517241
	4	0,22905	3,634625
	5	0,42247	3,702359
	6	0,34103	2,244025
	7	0,51409	3,393065
Grup IX	1	0,22396	10,57423
	2	0,41738	5,578762
	3	0,40211	4,99419
	4	0,36648	6,507469
	5	0,40328	6,42419
	6	0,6617	5,532679
	7	0,41738	5,122564

MDA değerleri iskemi yapılan grupta kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur. ($p=0,008$) İskemi sonrası 4 saat ve 21 gün reperfüzyon uygulanan her iki grupta yine MDA seviyelerinde kontrol grubuna göre ciddi boyutlarda bir artış tespit edilmiştir. PA verilen grupların hepsinde MDA değerleri, iskemi ve İR yapılan ve PA verilmeyen gruplara göre daha düşük değerlerde bulunmuştur. (Tablo 7) PA uygulanan iskemi sonrası 7 gün ve 21 gün reperfüzyon yapılan gruplarda MDA değerleri kontrol grubunda tespit edilen MDA değerlerine yakın bulunmuştur (şekil 3).

Tablo 7: Gruplardaki ortalama serum MDA değerleri. (* kontrol grubu ile istatistiksel anlamlı fark)

Gruplar	Ort±Std. Sapma	P değeri
Grup I	0,39±0,25	
Grup II	1,22±0,93	*0,008
Grup III	0,76±0,25	0,513
Grup IV	1,00±0,63	0,084
Grup V	0,74±0,33	0,588
Grup VI	0,55±0,25	0,988
Grup VII	0,41±0,15	1,000
Grup VIII	0,95±0,47	0,129
Grup IX	0,41±0,14	1,000

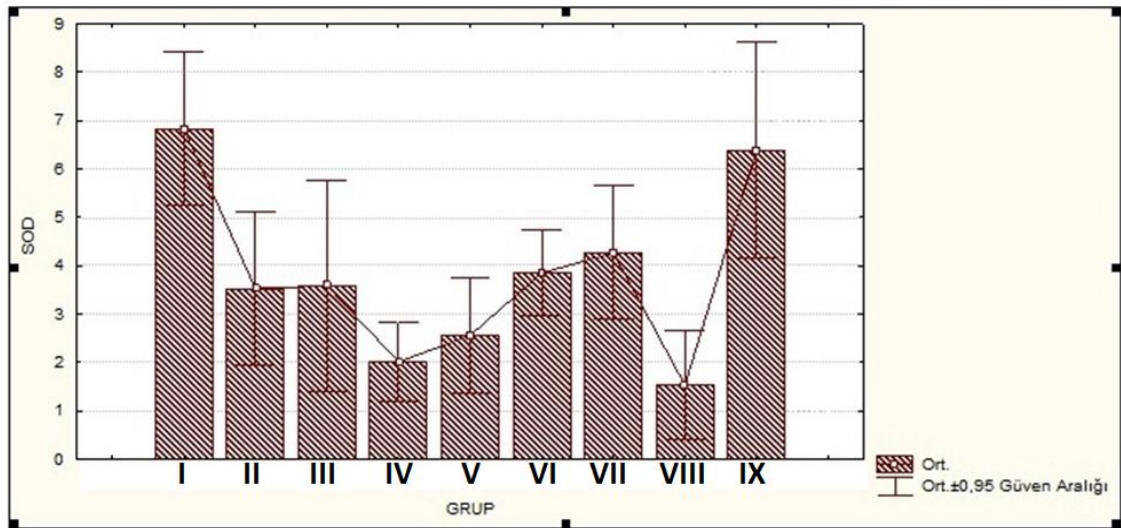


şekil 3: Serum MDA değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması

İskemi ve İR yapılan tüm gruplarda SOD değerlerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmiştir (Şekil 4). İskemi uygulaması ile azalma gösteren SOD değerleri, 4 saatlik reperfüzyon uygulaması sonrasında azalmaya devam etmiştir. PA verilen tüm gruplarda SOD değerlerinde bir artış olmuş ancak sadece iskemi sonrası 21 gün reperfüzyon uygulanan grupta bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (p:0,002, Tablo 8)

Tablo 8: Serum SOD değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması. (*kontrol grubu ile istatistiksel anlamlı fark)

Gruplar	Ort±Std. Sapma	P değeri
Grup I	6,83±1,71	
Grup II	3,53±1,72	*0,001
Grup III	3,58±2,09	*0,003
Grup IV	2,02±0,88	*0,000
Grup V	2,56±1,27	*0,000
Grup VI	3,85±0,97	*0,004
Grup VII	4,26±1,49	*0,019
Grup VIII	1,53±1,23	*0,000
Grup IX	6,38±2,12	0,997



Şekil 4: Serum SOD değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması.

TARTIŞMA

İR hasarına bağlı olarak kan-sinir bariyerinin bozulması ile birlikte oksidatif stres oluşmakta ve buna bağlı olarak lipid peroksidasyonu meydana gelmekte ve neticede birçok biyokimyasal ve patolojik değişiklik ortaya çıkmaktadır. İR sonucunda oluşan serbest radikaller yüksek reaktiviteleri nedeniyle hücre membranının yapısında bulunan lipidlerde, lipid peroksidasyonunu başlatmaktadırlar.

PA'in geniş biyolojik ve farmakolojik özelliklerinden dolayı son yıllarda bu konuda çok sayıda çalışma yapılmaktadır¹⁶⁶⁻¹⁷⁰. Ancak PA'in, İR hasarının neden olduğu oksidatif stres ve periferik sinirde yaratmış olduğu hasar üzerine etkilerini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tezin amacı İR hasarı yapılan sıçanlarda PA takviyesinin çeşitli oksidatif stres ve antioksidan savunma sistemleri ile periferik sinir üzerine etkilerini ortaya koymaktır.

Periferik sinirde iskemi ve sonrasında oluşan reperfüzyon hasarının etkilerinin gösterilebilmesi için tama yakın ve geri dönüşümü olan iskemi oluşturabilecek model arayışları hala sürmektedir^{180,181}. Korthals kedilerde meydana getirdiğı İR modelinde, aynı anda aorta ve femoral arter ligasyonu ile siyatik sinir distali ile tibial ve peroneal sinirlerin alt kısımlarında aksoplazmik yavaşlama, organellerin birikimi ve santral fasiküler nekroz gibi iskemik değişiklikler ortaya çıktığını bildirmiştir¹⁸¹. Hess ise, tavşanlarda oluşturduğu modelde, internal ve eksternal iliak arterlerin ayrı ayrı ya da birlikte ligasyonunun siyatik sinir ve dallarında iskemik lezyonlar oluşturduğunu ortaya koymuştur⁵⁰. Schmelzer ve arkadaşlarının geliştirdiğı modelde önce kollateral arterler bağlanmakta ve sonrasında hem abdominal aortanın hem de her iki iliak arterlerin geçici oklüzyonu ile sinir kan akımı kesilerek tam iskemi oluşturulmaktadır. Bu model kullanılarak yaratılan 1 saatlik iskemi 30 dakika içinde iskemik iletim bozukluğu oluşturmakta, ancak reperfüzyonla impuls iletimi hemen geri dönmektedir. 3 saatlik iskemi sonrasında ise kalıcı iletim bozukluğu ve iletim bloğu ortaya çıkmaktadır. Reperfüzyon yetmezliğı 1 saatlik iskemiden sonra belirmekte ve 3 saatlik iskemi sonrasında belirginleşmektedir¹⁸².

Periferik sinirde iskemi ve reperfüzyon hasarlarını araştırmak amacıyla sıçanlarda yapılan çalışmalarda standart bir model ortaya konulamamıştır^{50,181,183,184}. Bu nedenle, deneysel çalışmanın amaçlarından biri de kolay uygulanabilir ve amacına uygun bir periferik sinir iskemi-reperfüzyon modelinin ortaya konulmasıydı. Bağdatoğlu ve arkadaşları serebral damar

anevrizma klipsleri kullanılarak femoral arter ve venin kan akımını 3 saat süreyle engellemişlerdir. Daha önce yapılmış olan çalışmalarda sıçan siyatik sinirinde patolojik değişikliklerin ortaya çıkmaya başladığı kritik iskemi sınırının 3 saat olduğu rapor edilmiştir⁵⁴. Bu nedenle çalışmamızda iskemi süresi 3 saat olarak belirlenmiş ve İR modeli olarak da Bağdatoğlu ve arkadaşlarının literatürde bildirmiş oldukları İR modeli kullanılmıştır.

Periferik sinirler çeşitli klinik durumlarda, travmatik, iatrojenik veya medikal nedenlerle değişen sürelerde iskemi altında kalmakta; anatomik ve fonksiyonel yapının korunması koşuluyla, daha sonra reperfüze olmaktadır. İR süreleri kritik değeri aşınca ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri öncelikle hücre membranlarını hedef seçerek, intranöral mikrosirkülasyonun yapı ve bütünlüğünü bozmaktadırlar⁹. Çalışmamızda 3 saat süreyle total iskemi uygulanan ve iskemi sonrası değişen sürelerde reperfüzyona maruz bırakılan periferik sinirlerde oksidatif stresin etkisi incelenmiştir.

İR hasarının oluşmasında başlıca rolü indirgenme reaksiyonları sonucunda oluşan serbest oksijen radikalleri oynar. Serbest oksijen radikalleri (süperoksit radikali, hidrojen peroksit, hidroksil radikali) kimyasal olarak reaktif moleküllerdir. Hidroksil radikali canlı hücrelerde bulunan hemen hemen tüm moleküllerle (proteinler, polisakkaritler, aminoasitler, DNA bazları, uzun zincirli doymamış yağ asitleri ve organik asitler) reaksiyona girebilir^{185,186}. Lipid peroksidasyonu lipid hidroperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklerine dönüşmesi ile sona ermektedir. Lipid peroksidasyonu membranın iyon geçirgenliğini arttırmakta ve ayrıca membran proteinlerinde de hasara neden olmaktadır¹⁸⁷.

İskemi yapılan grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında kan MDA seviyeleri iskemi grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur (p=0,008). Ayrıca iskemi sonrasında 4 saat ve 21 gün reperfüzyon uygulanan gruplarda da MDA seviyelerinde kontrol grubuna göre artış tespit edilmiş ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. PA verilen grupların (grup III, grup V, grup VII, grup IX) MDA değerleri, PA verilmeyen gruplar (Grup II, Grup IV, Grup VI ve Grup VIII) ile karşılaştırıldığında daha düşük değerlerde bulunmuştur. PA+iskemi+7 gün reperfüzyon grubu (Grup VII) ile PA+ iskemi+21 gün reperfüzyon grubunda (Grup IX) ölçülen MDA değerleri, kontrol grubunda ölçülen MDA değerlerine yakın bulunmuştur. Çalışmamızda PA verilen gruplardaki MDA sonuçları, PA'in antioksidan sistem üzerine olumlu

etkisi olduğunu desteklemektedir. Bağdatoğlu ve arkadaşları sıçan siyatik sinir iskemi reperfüzyon modelinde trapidilin etkisini araştırdıkları çalışmalarında MDA değerlerinin İR uygulanan grupta, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığını göstermişlerdir⁵⁴. Kerman ve arkadaşları deneysel olarak kafa travması oluşturulmuş tavşanlarda kuvvetli bir antioksidan olan melatoninin serbest radikal ve antioksidan sistemler üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında travmanın MDA değerlerinde artmaya neden olduğunu ve verilen melatonin sonucunda MDA değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalmanın olduğunu tespit etmişlerdir¹⁸⁸. Feng ve arkadaşları yedi günlük sıçan yavrularında hipoksi oluşturulmadan 5 dakika önce ve hipoksi sonrası 4., 18. ve 26. saatte intraperitoneal olarak uygulanan 50 mg/kg PA'in hipoksinin neden olduğu iskemik beyin hasarını ve beyin dokusundaki lipid peroksidasyonunu azalttığını bildirmişlerdir¹⁸⁹. Devi ve arkadaşları erkek albino Wistar sıçanlara 9 hafta boyunca oral olarak 25, 50 ve 75 mg/kg dozlarında PA uygulamışlar ve 25 ila 50 mg/kg PA uygulanan gruplarda beyin dokusunda lipid peroksidasyonu ve MDA değerlerinde sınırlı bir değişim tespit ederken, 75 mg/kg PA uygulanan grupta ise beyin dokusundaki MDA seviyelerinde %70 oranında azalma belirlemişlerdir¹⁹⁰.

X ışınlarına maruz bırakılan sıçanlarda günlük 50 mg/kg PA takviyesinin yükselen lenfosit MDA seviyelerini azalttığı ve GSH, retinol ve beta-karoten seviyelerini yükselttiği gösterilmiştir^{191,192}.

PA'in miyokard İR hasarına karşı koruyucu etkisinin araştırıldığı çalışmada 3 hafta boyunca 50 ve 100 mg/kg oral PA verilen sıçanlarda MDA oluşumunun PA verilmeyen sıçanlarla kıyaslandığında önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca PA'in kalp iskemisi sonucu oluşan hidrosil ve peroksil radikallerini kovmada etkili olduğu gösterilmiştir¹⁷⁰.

PA'in kanıtlanmış en önemli özellikleri antilipoperoksidatif, antiapoptojenik ve antinekrojenik potansiyele sahip olmasıdır. PA'in süperoksit ve hidrosil radikali oluşumunu engellediği ve oksidatif strese karşı antioksidan kapasiteyi arttırıcı özelliklere sahip olduğu daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir. Bizim alışmamızda da serbest oksijen radikalleri ile indüklenmiş lipid peroksidasyonunun belirlenmesinde MDA düzeyleri ile yapılan değerlendirmede PA uygulanan tüm gruplarda MDA düzeylerinin anlamlı derecede azaldığı bulunmuştur. Bu sonuçlarımız literatür bilgileri ile paralellik göstermektedir^{7,54,188,190}.

İskemi ve İR yapılan tüm gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında SOD değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. İskemi uygulaması ile azalma gösteren SOD değerleri 4 saat reperfüzyon sonrası da azalmaya devam etmiştir. PA verilen tüm gruplarda SOD değerlerinde bir artış olmuş ancak sadece iskemi+21 gün reperfüzyon uygulanan grupta bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p:0,002). Sayan ve arkadaşları sıçan siyatik sinir iskemi reperfüzyon modelinde melatoninin faydalı etkisini araştırdıkları çalışmalarında, reperfüzyon öncesi uygulanan melatoninin SOD enzim seviyelerinde azalmaya engel olduğunu bildirmişlerdir. İR yapılan gruptaki azalmış SOD düzeylerinin, melatonin uygulaması ile yükseldiğini tespit etmişlerdir⁷. Potansiyel bir antioksidan olan melatoninin özellikle reperfüze dokuda SOD seviyesini arttırdığına yönelik literatürde birçok çalışma bulunmaktadır. Kotler ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında melatonin uygulamasının sıçan serebral korteksinde SOD değerlerinde artmaya neden olduğunu tespit etmişlerdir¹⁹³. Devi ve arkadaşları deneysel olarak sıçanlara oral yolla verilen 25, 50 ve 75 mg/kg dozlarında PA'in lipid peroksidasyonu ve antioksidan sistem üzerine etkisini araştırmışlardır. 25 ve 50 mg/kg PA uygulanan gruplarda beyin dokusunda SOD aktivitesinde sınırlı bir değişim tespit ederken, 75 mg/kg PA uygulanan grupta ise beyin dokusundaki SOD aktivitesinde %70 oranında artma bildirmişlerdir¹⁹⁰.

Çalışmamızda iskemi ve İR uygulanan tüm gruplarda SOD değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmiş ve PA uygulanması ile tüm gruplarda SOD düzeylerinde artış olduğu belirlenmiştir. SOD ile ilgili bu sonuçlarımız literatür bilgileri ile uygunluk göstermektedir^{7,190}.

Elektron mikroskopik değerlendirmede aksonları saran miyelin kılıfları değerlendirilmiştir. Her grupta rastgele seçilen 150 aksonun miyelin kılıfları elektron mikroskopik olarak değerlendirilmiştir. Kontrol grubunda incelenen tüm miyelin kılıflarının normal morfolojik özelliklere sahip olduğu gözlenmiştir. İskemi ve iskemi sonrası 4 saat, 7 gün ve 21 gün reperfüzyon uygulanan gruplarda ise miyelin kılıflarında delaminasyon tespit edilen aksonların sayısı sırasıyla 117 (%78), 108 (%72), 108 (%72) ve 90 (%60) olarak saptanmıştır. PA+iskemi+ 21 gün reperfüzyon grubu hariç, PA verilen tüm gruplarda, miyelin kılıflarda gözlenen delaminasyonda önemli ölçüde azalma tespit edilmiştir. İskemi sonrası 4 saat reperfüzyon uygulanan grupta 108 (%72) olarak tespit edilen delaminasyon gösteren miyelin kılıfı sayısı, PA uygulanan ve iskemi

sonrası 4 saat reperfüzyon yapılan grupta 69 (%46) olarak tespit edilmiş olup, her iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,001$). Sayan ve arkadaşları İR uygulanan sıçanlarda normal miyelin kılıf yapısında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit etmişler ve melatonin uygulanmasının ardından delaminasyon gösteren miyelin kılıf sayısında anlamlı bir azalma meydana geldiğini bildirmişlerdir⁷. Bağdatoğlu ve arkadaşları sıçan siyatik sinir iskemi reperfüzyon modelinde iskemi ve İR hasarı sonrasında miyelin kılıflarında delaminasyon, akson yapısındaki mitokondriyonlarda şişme ve krista kaybı ile endonöryumda ödem tespit etmişlerdir. Trapidil uygulanan sıçanlarda ise elektron mikroskopik olarak hücreler arası ödemde azalma ve delaminasyon gösteren miyelin kılıf sayısında azalma olduğunu bildirmişlerdir⁵⁴. Türkoğlu ve arkadaşları, iskemi ve İR oluşturulan sıçanlarda miyelin kılıflarda önemli ölçüde delaminasyon saptamışlardır⁹⁴.

Kaspaz aktivasyonunun aksonal yaralanma ve dejenerasyonda önemli rol oynadığını akla getiren kanıtlar vardır. Travmatik beyin yaralanmasına sahip hayvan modellerinde sitokrom c serbestleşmesi ve kaspaz aktivasyonunun aksonal hasara katkıda bulunduğu gösterilmiştir¹⁹⁵. Çalışmamızda tüm gruplara ait dokularda aktif kaspaz 3 için işaretlenme olup olmamasına göre değerlendirme yapılmıştır. Kontrol grubu ile diğer tüm gruplar aktif kaspaz 3 için immunfloresan işaretlenme yönünden karşılaştırıldığında iskemi ve reperfüzyon yapılan tüm gruplarda aktif kaspaz 3 işaretlenmesinde artış tespit edilmiştir. Bu artışın iskemi grubunda diğer gruplara göre daha belirgin olduğu gözlenmiştir. PA verilen gruplarda iskemi, iskemi sonrası 7 gün ve 21 gün reperfüzyon uygulanan gruplarda aktif kaspaz 3 işaretlenmesinde azalma saptanmıştır. Ancak PA verilen iskemi sonrası 4 saat reperfüzyon uygulanan grupta ise bu azalma gözlenmemiştir.

Siyatik sinir dokusunda ELISA yöntemi kullanılarak ölçülen aktif kaspaz 3 değerleri tüm gruplarda kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Ancak bu fark sadece iskemi grubunda istatistiksel açıdan anlamlı olarak saptanmıştır ($p=0,027$). PA verilen gruplardan iskemi ve iskemi sonrası 7 gün reperfüzyon uygulananlarda aktif kaspaz 3 değerlerinde düşme tespit edilmiştir. PA verilen iskemi sonrası 4 saat reperfüzyon uygulanan grupta ise aktif kaspaz 3 değerlerinde azalma olmamıştır.

Temel olarak iskemi sonrası reperfüze edilen organlarda hücresel bütünlüğün bozulması sonucu ödem ve fonksiyon bozukluğu ile karakterize

inflatuar ve metabolik hasar görülür. İR şiddetine bağlı olarak hiçbir morfolojik değişikliğin olmadığı durumdan belirgin makroskobik hasarın olduğu düzeye kadar değişik derecelerde hasar olabilir. İR herhangi bir organ ya da dokuda geliştikten sonra iskeminin süresi, şiddeti ve organın büyüklüğüne bağlı olarak hem o organda hem de uzak organlarda hasar gelişebilir¹⁹⁶.

Hidrojen peroksit apoptozise neden olan pro-oksidan bir moleküldür. Pro-oksidan stresin neden olduğu mitokondri hasarı mitokondriden serbestleşen proapoptotik faktörler aracılığıyla apoptozis yolağının aktivasyonuna neden olur. Kaspaz, ROS'nin neden olduğu apoptotik yolda esas uygulayıcıdır. ROS mitokondri aracılı intrinsik apoptozise neden olur. Bu yolda M-kalpain kaspaz 3 aktivasyonuna neden olmaktadır. Kalsiyum bağımlı kalpain aktivasyonunun neden olduğu kaspaz 3 aktivasyonu neonatal hipoksi-iskemi modelinde gösterilmiştir⁸⁵. Hipoksi sonucunda geri dönüşümsüz değişikliklerin gelişmesi için geçen süre değişkendir. İskelet kasları saatlerce hipoksiyi tolere edebilmesine karşın nöral yapılar için bu süre çok kısadır. Sonuç olarak iskemi hücreleri ciddi hasara uğratar. Bundan dolayı iskemi durumunda kan akımı en kısa zamanda tekrar sağlanmalıdır. Ancak dokularda oksijenizasyonun tekrar sağlanması hasarlı bölgede ROS'nin artmasına ve geçici olarak hasarın ağırlaşmasına neden olabilmektedir^{7,54}. Çalışmamızda iskemi sonrası 4 saat reperfüzyon uygulanan grupta hem immunfloresan işaretlenme ile hem de ELISA yöntemi ile yapılan aktif kaspaz 3 ölçümlerinde PA verilmesinin aktif kaspaz 3 düzeylerinde azalmaya yol açmadığı görülmüştür. Ancak iskemi sonrası 7 gün ve 21 gün reperfüzyon uygulanan gruplarda aktif kaspaz 3 değerlerinde belirgin azalma tespit edilmiştir. Bu sonuç, hasarın özellikle reperfüzyonun ilk saatlerinde devam ettiğinin bir göstergesidir.

Çalışmamızda elektron mikroskobik, biyokimyasal, ELISA ve immünfloresan değerlendirme sonuçlarımız arasındaki korelasyon gözden geçirildiğinde iskemi ve iskemi sonrası reperfüzyonun erken dönemlerinde harabiyetin ileri derecede olduğu tespit edilmiştir. İskemi sonrası 4 saatlik reperfüzyon süresince lipid peroksidasyonunu değerlendirdiğimiz MDA düzeyleri yüksek seyretmeye, antioksidan sistemi değerlendirdiğimiz SOD düzeyleri ise daha da düşmeye devam etmiştir. Lipid peroksidasyonunda tüm gruplarda ciddi azalmalar olurken 7 ve 21 gün reperfüzyon uygulanan gruplardaki MDA değerleri kontrol grubundaki değerlerine yaklaşmıştır. Aynı şekilde SOD değerleri de 21 gün reperfüzyon grubunda kontrol grubu

değerlerine yaklaşmıştır. Elektron mikroskopik olarak 21 gün reperfüzyon grubu hariç tüm gruplarda aksonların miyelin kılıflarında tespit edilen delaminasyonda önemli ölçüde azalma tespit edilmiştir. Aktif kaspaz 3 için immunfloresan işaretlenme ve ELISA yöntemi ile yapılan ölçümlerde ise iskemi sonrası 4 saat reperfüzyon uygulanan grupta PA verilmesinin aktif kaspaz 3 düzeylerini azaltmadığı görülmüştür. Bu sonucun özellikle reperfüzyonun ilk dönemlerinde hasarın artmasına bağlı olarak oluşan ROS etkisiyle oluşan mitokondri aracılı intrinsik apoptozise bağlı olduğu düşünülmüştür.

Sonuç olarak; PA'in, periferik sinir İR hasarında endotel hücrelerinde oluşan oksidatif hasar ve sonrasında meydana gelen endonöral ödem ile sinir lifi dejenerasyonuna karşı serbest radikallerin zararlı etkilerini engellediği ve antioksidan savunma sistemlerini desteklediği düşünülmüştür. Özellikle periferik sinire yönelik cerrahi girişimlerden önce kullanıldığında, oluşabilecek oksidatif sinir doku hasarını azaltılabileceği ve nöral fonksiyonun ileri derecede bozulmasına engel olabileceği kanısına varılmıştır.

SONUÇ ve ÖNERİLER

1. İR hasarı oluşturulan sıçan siyatik sinir dokusunda tüm gruplarda aktif kaspaz 3 immünfloresan işaretlemesi yapıldı. İskemi ve iskemi reperfüzyon yapılan tüm gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında özellikle iskemi grubunda olmak üzere, aktif kaspaz 3 işaretlenmesinde artma olduğu tesbit edildi.

2. PA verilen iskemi grubu, iskemi+7 gün reperfüzyon grubu, iskemi+21 gün reperfüzyon grubunda aktif kaspaz 3 işaretlenmesinde azalma saptanırken, iskemi+4 saat reperfüzyon grubunda bu azalmanın olmadığı görülmüştür.

3. ELISA yöntemi ile tespit edilen aktif kaspaz 3'ün iskemi ve iskemi reperfüzyon yapılan tüm gruplarda kontrol grubuna göre yüksek olduğu ancak bu yüksekliğin yalnızca iskemi grubunda istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı. ELISA ve immünfloresan işaretleme sonuçları, iskeminin sinir dokusunda reperfüzyona göre daha fazla kaspaz 3 aktivasyonuna neden olduğunu göstermektedir. ELISA yöntemi ile yapılan ölçümlerde, PA+iskemi ve PA+iskemi+7 gün reperfüzyon gruplarında aktif kaspaz 3 düzeylerinde düşme olduğu saptanmıştır. PA verilmesinin iskemi sonrası 4 saat reperfüzyon grubu ve iskemi+21 gün reperfüzyon grubunda gerek immünfloresan işaretlemede gerekse ELISA yöntemi ile yapılan ölçümlerde aktif kaspaz 3 düzeylerinde azalmaya yol açmadığı görülmüştür.

4. Elektron mikroskopik incelemede kontrol grubunda tüm miyelinli sinir liflerinin normal morfolojik özelliklere sahip olduğu gözlenmiştir. İskemi ve İR'un ise tüm gruplarda miyelin kılıfta delaminasyona neden olduğu tesbit edilmiştir. PA verilen iskemi ve iskemi reperfüzyon gruplarında delaminasyon gösteren miyelin kılıf sayısında azalma olmuştur. PA+iskemi+4 saat reperfüzyon grubu ile iskemi+4 saat reperfüzyon grubu arasındaki delaminasyon gösteren miyelin kılıf sayısı arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. İskemi ve iskemi+4 saat reperfüzyon yapılan gruplarda miyelin kılıflarda delaminasyon ile birlikte bazı aksonlarda ileri derecede miyelin hasarına bağlı bal peteği görünümü tespit edilmiştir.

5. Biyokimyasal analiz sonucunda iskemi grubuna ait serum MDA değerlerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış tespit edilmiştir. İskemi+4 saat reperfüzyon ve iskemi+21 gün reperfüzyon gruplarında da bu değerlerin kontrol grubuna göre yüksek olduğu gözlenmiş ancak sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir. PA verilen

gruaplarda MDA değerleri verilmeyen gruplara göre daha düşük bulunmuştur. PA verilen iskemi+7 gün reperfüzyon ve iskemi+21 gün reperfüzyon gruplarında ise MDA değerleri kontrol grubu MDA değerlerine yakın değerlerde bulunmuştur.

6. İskemi ve iskemi reperfüzyon yapılan tüm gruplarda SOD seviyelerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. İskeminin neden olduğu SOD seviyelerindeki azalma 4 saatlik reperfüzyon sonrasında da azalmaya devam etmiştir. PA verilen tüm gruplarda SOD değerlerinde, verilmeyen gruplara göre artış olduğu ancak sadece iskemi sonrası 21 gün reperfüzyon uygulanan grupta bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir.

7. Sonuç olarak; PA'in periferik sinir iskemi reperfüzyon hasarında oluşan oksidatif hasara karşı serbest radikallerin zararlı etkilerini engelleyerek antioksidan savunma sistemlerini desteklediği kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Eşrefoğlu M. Genel histoloji. 1. Baskı. Malatya: Medipress Matbaacılık Yayıncılık Ltd. 2009.
2. Pehlivan F. Biyofizik. 2. Baskı. Ankara: Hacettepe Taş Kitapçılık 1997: 69-76.
3. Junqueira LC, Carneiro J. Basic Histology: Text & Atlas. 10th Edition. New York, McGraw-Hill. 2003.
4. Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: A review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery*, 2004; 24: 468-475.
5. Grace PA. Ischemia-reperfusion injury. *Br J Surg*, 1994; 81: 637- 637.
6. Angel MF, Ramasastry SS, Swartz WM, Basford RE, Futrell JW. Free radicals: Basic concepts concerning their chemistr pathophysiology, and relevance to plastic surgery. *Plast Reconstr Surg*, 1987; 79 (6): 990-997.
7. Sayan H, Ozacmak VH, Ozen OA, et al. Beneficial effects of melatonin on reperfusion injury in rat sciatic nevre. *J. Pineal Res*, 2004; 37 :143-148.
8. Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*, 2000; 5: 415-418.
9. Nukada H, Mcmorran PD. Perivascular demyelination and intramyelinic oedema in reperfusion nerve injury. *J. Anat*, 1994; 185: 259-266.
10. Bagdatoglu OT, Polat G, Bagdatoglu C, Atık U. Roles of nitric oxide, malondialdehyde and fibronectin in an experimental peripheral nevre ischemia-reperfusion model. *Microsurgery*, 2006; 26:207-211.
11. Lida H, Schmelzer JD, Schmeichel AM, Wang Y, Low PA. Peripheral nerve ischemia: reperfusion injury and fiber regeneration. *Experimental Neurology*, 2003; 184: 997-1002.
12. Blake DR, Allen RE, Lunec J. Free radicals in biological systems a review orientated to inflammatory process. *British Medical Bullet*, 1987; 43(2): 371-385.
13. Seçer Hİ, Daneyemez KM. Periferik sinir yaralanmaları ve cerrahisi. Korfalı E, Zileli M (eds). *Temel Nöroşirürji*. Ankara: Buluş Tasarım, 2010: 1763-1789.
14. Ross MH, Pawlina W, Kaye Gl. *Histology A Text and Atlas*. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.

15. Lariviere RC, Julien JP. Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease. *J Neurobiology*, 2003; 58: 131-148.
16. Cairns NJ, Lee VM, Trojanowski JQ. The cytoskeleton in neurodegenerative Diseases. *J Pathol*, 2004; 204: 438-449.
17. Kierszenbaum AL. *Histology and cell biology*. Second edition. New York: Wiley-Liss. 2006.
18. Kline DG, Hudson AR. *Basic Considerations "Nerve Injuries"*. Philadelphia: W.B.Saunders Company 1995: 1-27.
19. Hunt CG. Peripheral nevre biomechanics: Application to neuromobilization Approaches. *Phys Ther*, 2002; 7: 111-121.
20. Atalay FÖ, Üstün H. Periferik sinir sisteminde nöronal dejenerasyon, rejenerasyon ve nörodejeneratif hastalıklarda yeni tedavi modaliteleri. *Fiziksel Tıp*, 2004; 7(3): 157-162.
21. Landers M, Altenburger P. Peripheral Nerve Injury. *Advances in Physiotheraphy*, 2003; 5: 67-82.
22. Burnstock G, Milner P. *Nervous System*. 38th Edition. Newyork: Churchill Livingstone 1995: 902-1327.
23. Lawrence R, Robinson LR. Traumatic injury to peripheral nerves. *Muscle Nerve*, 2000; 23: 863-873.
24. Mills SE. *Histology For Pathologists*. 3rd Edition. Lippincott Williams &Wilkins, 2007: 244-246.
25. Jessen KR. Glial cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2004; 36: 1861-1867.
26. Mathey E, Armat PJ. Introduction to the Schwann cell. In: Armati P (ed). *The Biology of Schwann Cells: Development, Differentiation and Immunomodulation*. Edinburgh: Cambridge University Press, 2007: 1-12.
27. Altıntaş A, Benbir G. Miyelinizasyon, demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon mekanizmaları. *Türk Nöroloji Dergisi*, 2005; 12: 32-39.
28. Simons M, Trotter J. Wrapping. The cell biology of myelination. *Current opinion Neurobiology*, 2007; 17(5): 533-40.
29. Stanfield CL, Germann WJ. *Principles of Human Physiology*. 3rd Edition. Benjamin Cummings, 2008: 191.
30. Terzis JK, Smith KL. Repair and grafing of the peripheral nerve. In. McCarty JG (Ed). *Plastic Surgery*, vol I. Philadelphia: W.B. Saunders, 1997: 644-659.

- 31.** Lundborg G, Rydevik B. Nerve compressions and paresthetic hands. The biological background]. *Lakartidningen*, 1981; 78(40):3478-82.
- 32.** Lundborg G. Intra-neural microvascular pathophysiology as related to ischemia and nerve injury. In: Daniel RK and Terzis JK (Eds). *Reconstructive Microsurgery*, Bostyn: Little, Brown&Company, 1977:334.
- 33.** Lundborg G. The nerve trunk: Microvascular system. In: Lundborg G. (Ed). *Nerve Injury and Repair*. Edinburg: Churchill and Livingstone, 1988: 42-63.
- 34.** Kline DG, Hudson AR. Acute injuries of peripheral nerves. In: Youmans JR (Ed). *Neurological Surgery*, Vol IV, 3 Ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1990:2423-2511.
- 35.** Yormuk E. Elin periferik sinir yaralanmaları. *Plast Rekonstr Cer Der IV-V*, 106: 1982-1983.
- 36.** Lundborg G. The intrinsic vascularization of human peripheral nerves: structural and functional aspects. *J Hand Surg*, 1979; 4(1):34-41.
- 37.** Best TJ, Mackinnon SE. Intra-neural vascular investigative techniques. *J Reconstr Microsurg*, 1991; 7(3):245-248.
- 38.** Low PA, Tuck RR. Effects of changes of blood pressure, respiratory acidosis and hypoxia on blood flow in the sciatic nerve of the rat. *J Physiol*, 1984; 347:513-524.
- 39.** Thomas PK, Landon DN, King RHM. Disease of peripheral nerves. In: Adams JH, Corsellis JAN, Duchen LW (Eds). *Greenfield's Neuropathology*, 4 Ed. London: EDWARD Arnold, 1984; 807-921.
- 40.** Smith DR, Kobrine AI, Rizzoli HV. Blood flow in peripheral nerves. *J Neurol Sci*, 1977; 33: 341-346.
- 41.** Lundborg G, Branemark PI. Microvascular structure and fuction of peripheral nerves: Vital microscopic studies of the tibial nerve in the rabbit. *Adv Microcirc*, 1968; 1: 66-68.
- 42.** Greene EG. *The anatomy of rat*. New York. Hafner Publications, 1968.
- 43.** Bell MA, Weddell AGM. A descriptive study of the blood vessels of the sciatic nerve in the rat, man and other mammals. *Brain*, 1984; 107: 871-898.
- 44.** Bell MA, Weddell AGM. A morphometric study of intrafascicular vessels of mammalian nerve. *Muscle and Nerve*, 1986; 9: 212-215.
- 45.** Miyamoto Y, Watari S, Tsuge K. Experimental studies on the effects of tension on intra-neural microcirculation in sutured peripheral nerves. *Plast Reconstr Surg*, 1979; 63: 398-403.

- 46.** Okada E. Experimentaelle untersuchungen uber die vasculature trophik des peripheran nerven. *Arb Neurol Inst*, 1905; 12: 59-85.
- 47.** Adams W. The blood supply of nerves, II. The effect of exclusion of its regional sources of supply on the sciatic nerve of the rabbit. *J Anat*, 1943; 77: 243-250.
- 48.** Durward A. Blood supply of nerves. *Postgrad Med J*, 1948; 24: 11-14.
- 49.** Blunt M. Ischemic degeneration of nerve fibers. *Arch Neurol*, 1960; 2: 528-536.
- 50.** Hess K, Eames RA, Darveniza P, Gilliatt RW. Acute ischemic neuropathy in the rabbit. *J Neurol Sci*, 1979; 44: 19-43.
- 51.** Myers RR, Heckmann HM, Galbraith JA, Powell HC. Subperineurial demyelination associated with reduced nerve blood flow and oxygen tension following epineurial vascular stripping. *Lab Invest*, 1991; 65: 41-50.
- 52.** Nukada H, Powell HC, Myers RR. Spatial distribution of nerve injury after occlusion of individual major vessels in rat sciatic nerves. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1993; 52(5): 452-459.
- 53.** Muthuramana A, Rameshb M, Soda S. Development of animal model for vasculatic neuropathy: Induction by ischemic-reperfusion in the rat femoral artery *Journal of Neuroscience*, 2010; 186: 215-221.
- 54.** Bagdatoglu C, Saray A, H. Surucu S, Ozturk H, Tamer L. Effect of trapidil in ischemia/reperfusion injury of peripheral nerves. *Neurosurgery*, 2002; 51: 212-220.
- 55.** Rinker B, Fink BF, Barry NG, et al. The effect of cigarette smoking on functional recovery following peripheral nerve ischemia/reperfusion injury. *Microsurgery*, 2011; 31:59-65.
- 56.** Finn JT, Weil M, Archer F, Siman R, Srinivasan A, Raff MC. Evidence that wallerian degeneration and localized axon degeneration induced by local neurotrophin deprivation do not involve caspases. *The Journal of Neuroscience*, 2000; 20(4):1333-1341.
- 57.** Misgeld T. Death of an axon: studying axon loss in development and disease. *Histochem Cell Biol*, 2005; 124: 189-196.
- 58.** Wang JT, Medress ZA, Barres BA. Axon degeneration: Molecular mechanisms of a self-destruction pathway. *J. Cell Biol*, 2012; 196 (1): 17-18.

- 59.** Barrientos SA, Martinez NW, Yoo S, et al. Axonal degeneration is mediated by the mitochondrial permeability transition pore. *J Neurosci*, 2011; 31(3): 966-978.
- 60.** Cavanagh JB. The significance of the "dying back" process in experimental and human neurological disease. *Int Rev Exp Pathol*, 1964;3: 219.
- 61.** Luo L and O'Leary DD. Axon retraction and degeneration in development and disease. *Annu Rev Neurosci*, 2005; 28: 127.
- 62.** Schoenmann Z, Assa-Kunik E, Tiomny S, Minis A, Haklai-Topper A, Arama E Yaron A. Axonal degeneration is regulated by the apoptotic machinery or a NAD⁺-sensitive pathway in insects and mammals. *The Journal of Neuroscience*, 2010; 30(18): 6375-6386.
- 63.** George EB, Glass JD, and Griffin JW. Axotomy-induced axonal degeneration is mediated by calcium influx through ion-specific channels. *The Journal of Neuroscience*, 1995; 15(10): 6445-6452.
- 64.** Figueroa RA, Ramberg V, Gatsinzi T, et al. Anchored FRET sensors detect local caspase activation prior to neuronal degeneration. *Molecular Neurodegeneration*, 2011; 6: 35.
- 65.** Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, et al. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron*, 1995; 15: 96.
- 66.** Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972;26: 239-245.
- 67.** Willingham MC. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1999; 47(9): 1101-1109.
- 68.** Cohen JJ. Apoptosis: The physiological pathway of cell death. *Hosp Pract*, 1993; 15: 35-43.
- 69.** Thompson EB. The many roles of c-Myc in apoptosis. *Annual Review of Physiology*, 1998; 60: 575-600.
- 70.** Budihardjo I, Oliver HLM. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 1999; 15: 269-90.
- 71.** Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 2007; 35(4): 495-516.

- 72.** Miraglia M, Brera C and Colatosti M. Application of biomarkers to assessment of risk to human health from exposure to mycotoxins. *Microchem J*, 1996; 54: 472.
- 73.** Balls M, Walum E. Towards the acceptance of in vitro neurotoxicology tests. In Pentreath V.W. ed. *Neurotoxicology in vitro*. Philadelphia: Taylor and Francis Inc, 1999: 269.
- 74.** Launay S, Hermine O, Fontenay M, Kroemer G, Solary E, Garrido C. Vital functions for lethal caspases. *Oncogene*, 2005; 24: 5148.
- 75.** Wang J, Chun HJ, Wong W, Spencer DM, Lenardo MJ. Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proceedings of The National Academy of Science of The United States of America (PNAS)*, 2001; 98: 13884-8.
- 76.** Johnson DE. Programmed cell death regulation: basic mechanisms and therapeutic opportunities. *Leukemia*, 2000; 14: 1340-1344.
- 77.** Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 1997; 91: 479.
- 78.** Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*, 1999;399, 483.
- 79.** Wang ZB, Liu YQ, Cui YF. Pathways to caspase activation. *Cell Biol Int*, 2005; 29: 489.
- 80.** Melli G, Keswani SC, Fischer A, Chen W, Hoke A. Spatially distinct and functionally independent mechanisms of axonal degeneration in a model of HIV-associated sensory neuropathy. *Brain*, 2006;129: 1330.
- 81.** Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. The calpain system. *Physiol Rev*, 2003; 83:731-736.
- 82.** Wood DE, Thomas A, Devi LA, et al. Bax cleavage is mediated by calpain during druginduced apoptosis. *Oncogene*, 1998; 17: 1069.
- 83.** Chua BT, Guo K, Li P. Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases. *J Biol Chem* , 2000; 275: 5131-1535.
- 84.** Nakagawa T, Yuan J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol*, 2000; 150: 887-894.

- 85.** Blomgren K, Zhu C, Wang X, et al. Synergistic activation of caspase-3 by calpain after neonatal hypoxia-ischemia: a mechanism of "pathological apoptosis"? *J Biol Chem*, 2001; 276: 10191-10198.
- 86.** Cheng EH, Kirsch DG, Clem RJ, et al. Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science*, 1997; 278: 1966-1968.
- 87.** Clem RJ, Cheng EH, Karp CL, et al. Modulation of cell death by Bcl-xL through caspase interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998; 95: 554-559.
- 88.** Wang KK, Posmantur R, Nadimpalli R, et al. Caspase-mediated fragmentation of calpain inhibitor protein calpastatin during apoptosis. *Arch Biochem Biophys*, 1998; 356: 187-196.
- 89.** Wang KK, Posmantur R, Nath R, et al. Simultaneous degradation of α - and β -spectrin by caspase 3 (CPP32) in apoptotic cells. *J Biol Chem*, 1998; 273: 22490.
- 90.** Bizat N, Hermel JM, Humbert S, et al. In vivo calpain/caspase cross-talk during 3-nitropropionic acid-induced striatal degeneration: implication of a calpain-mediated cleavage of active caspase-3. *J Biol Chem*, 2003; 278: 43245.
- 91.** Shi Y, Melnikov VY, Schrier RW, Edelstein CL. Downregulation of the calpain inhibitor protein calpastatin by caspases during renal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2000; 279: F509.
- 92.** Araujo Couto L, Sampaio Narciso M, Hokoc JN, Blanco Martinez AM. Calpain Inhibitor 2 prevents axonal degeneration of opossum optic nerve fibers. *Journal of Neuroscience Research*, 2004; 77: 410-419.
- 93.** Glaser T, Kosower NS. Calpain-calpastatin and fusion. Fusibility of erythrocytes is determined by a protease-protease inhibitor [calpain/calpastatin] balance. *FEBS Lett*, 1986; 206: 115.
- 94.** Song DK, Malmstrom T, Kater SB, Mykles DL. Calpain inhibitors block Ca^{2+} -induced suppression of neurite outgrowth in isolated hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci Res*, 1994; 39: 474.
- 95.** Shea TB, Cressman CM, Spencer MJ, Beermann ML, Nixon RA. Enhancement of neurite outgrowth following calpain inhibition is mediated by protein kinase C. *J Neurochem*, 1995; 65: 517.
- 96.** Dosemeci A, Reese TS. Effect of calpain on the composition and structure of postsynaptic densities. *Synapse*, 1995; 20: 91.

- 97.** Lee KS, Frank S, Vanderklish P, Arai A, Lynch G. Inhibition of proteolysis protects hippocampal neurons from ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; 88: 7233.
- 98.** Glass JD, Culver DG, Levey AI, Nash NR. Very early activation of m-calpain in peripheral nerve during Wallerian degeneration. *J Neurol Sci*, 2002;196:9.
- 99.** Banik NL, Hogan EL, Powers LJ. Degradation of cytoskeletal proteins in spinal cord injury. *Neurochem Res*, 1982; 7: 1465-1475.
- 100.** Ray SK, Matzella DD, Wilford EL. Increased calpain expression is associated with apoptosis in rat spinal cord injury: calpain inhibitor provides neuroprotection. *Neurochem Res*, 2000;25: 1191-1198.
- 101.** Suzuki K, Sorimachi H, Yoshizawa T. Calpain: Novel family members, activation, and physiologic function. *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, 1995;376:523-529.
- 102.** Swapan KR, Edward LH, Naren LB. Calpain in the pathophysiology of spinal cord injury: neuroprotection with calpain inhibitors. *Brain Res. Reviews*, 2003; 42: 169-185.
- 103.** Wolman L. The disturbance of circulation in traumatic paraplegia in acute and late stages: a pathological study. *Paraplegia*, 1965;2: 213-226.
- 104.** Woods BT. Mirror movements after childhood hemiparesis. *Neurology*, 1978; 28: 1152-1158.
- 105.** Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2005; 37(11): 719–727.
- 106.** Güleş Ö, Eren Ü. Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2008; 2: 73-78.
- 107.** Overbeeke R, Steffens-Nakken H, Vermes I, Reutelingsperger C, Hanen C. Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. *Apoptosis*, 1998; 3: 115.
- 108.** Taatjes DJ, Sobel BE, Budd RC. Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis. *Histochem Cell Biol*, 2008; 129: 33-43.
- 109.** Önal A, Astarçioğlu H, Örmən M, Atila K, Sarıoğlu S. Sıçandaki renaliskemi reperfüzyon hasarında L-karnitinin koruyucu etkisi. *Ulus Travma Derg*, 2004; 10(3) :161.
- 110.** Chamoun F, Burne M, O' Donnell M., Rabb H: Pathophysiologic role of selectins and their ligands in ischemia reperfusion injury. *Front. Biosci.*, 2000;(5): 103-109.

- 111.** Furuichi K, Wada K, Iwata Y, et al. CCR2 Signaling contributes to ischemia-reperfusion injury in kidney. *JAm Soc Nephrol*, 2003; 14:2503-2515.
- 112.** Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Hastalıkların patogenez ve tedavisinde reaktif oksijen partikülleri ve antioksidanlar. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi/Office Journal of the Turkish Association*, 1997; 3-4: 96-101.
- 113.** Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik etkileri. 1. Baskı Konya: Mimoza Yayınları, 1995:3-95.
- 114.** Maxwell SRJ, Lip GYH. Reperfusion injury: a review of the pathophysiology clinical manifestations and therapeutic options. *J.Jardiol*, 1997; 58(2):95-117.
- 115.** Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Temel Patoloji. 2. baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi 1995: 4-8.
- 116.** Kumar V, Cotran R, Robbins SL. Temel patoloji. 6. baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi 2000: 30-36.
- 117.** LoPachin RM. and Lehning EJ. Acrylamide-induced distal axon degeneration: a proposed mechanism of action. *Neurotoxicology*, 1994;15: 247.
- 118.** Jortner BS, Hancock SK, Hinckley J, et al. Neuropathological studies of rats following multiple exposure to tri-ortho-tolyl phosphate, chlorpyrifos and stres. *Toxicol Pathol*, 2005; 33: 378.
- 119.** Sima AA, Bouchier M, Christensen H. Axonal atrophy in sensory nerves of the diabetic BB-Wistar rat: a possible early correlate of human diabetic neuropathy. *Ann Neurol*, 1983;13: 264.
- 120.** Waller K. Experiments on the section of glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog and observations of the alternatives produced thereby in the structure of their primitive fibrers. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 1850;140: 423.
- 121.** Leist M, Ferrando-May E, Castoldi A, Nicotera P. Endpoints and mechanisms. In: Pentreath VW ed. *Neurotoxicology in vitro*, Philadelphia: Taylor and Francis Inc, 1999: 105.
- 122.** Meldolesi J, Pozzan T. The endoplasmic reticulum Ca²⁺ store: a view from the lumen. *Trends Biochem Sci*, 1998; 23: 10-14.
- 123.** Jacobson J, Duchen MR. Interplay between mitochondria and cellular calcium signalling. *Mol Cell Biochem*, 2004; 256-257(1-2): 209-18.

- 124.** White RJ, Reynolds IJ. Mitochondria and Na⁺/Ca²⁺ exchange buffer glutamate-induced calcium loads in cultured cortical neurons. *J Neurosci*, 1995; 15: 1318.
- 125.** Carafoli E, Molinari M. Calpain: a protease in search of a function? *Biochem Biophys Res Commun*, 1998; 247: 193-203.
- 126.** Pörn-Ares MI, Ares MPS, Orrenius S. Calcium signalling and the regulation of apoptosis. *Toxicol In Vitro*, 1998; 12: 539-543.
- 127.** Goldman R, Moshonov S, Chen X, Berchansky A, Furstenberger G, Zor U. Crosstalk between elevation of [Ca²⁺]_i, reactive oxygen species generation and phospholipase A2 stimulation in a human keratinocyte cell line. *Adv Exp Med Biol*, 1997; 433: 41-45.
- 128.** Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis inducing factor. *Nature*, 1999; 397: 441-447.
- 129.** Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press New York, 2000;534-537.
- 130.** Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med.*, 2006;36: 327-358.
- 131.** Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. *J Biochem*,1984; 222:1-15.
- 132.** Radák Z, Pucsek J, Mecseki S, Csont T, Ferdinandy P. Muscle soreness-induced reduction in force generation is accompanied by increased nitric oxide content and DNA damage in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med*. 1999; 26: 1059-1063.
- 133.** Packer L. Oxidants, antioxidant nutrients and the athlete. *J Sports Sci.*, 1997;15:353-63.
- 134.** Iwasita Y, Kawaguchi S, Murata M: Restoration of function by replacement of spinal cord segments in the rat. *Nature*, 1994; 367: 167-173.
- 135.** Jacobson M: *Developmental Neurobiology*, 2nd edition, New York, Plenum Publishing, 1978.
- 136.** Nakano R. Apoptosis: Gene directed cell death. *Horm Res*, 1997;48: 2-4.
- 137.** Schwartzman RA, Cidloski JA. Apoptosis; the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Reviews*, 1993;14: 133-144,.
- 138.** Zurita M, Vaquero J: Presence and significance of CD-95 (Fas/APO1) expression after spinal cord injury. *J Neurosurg. (Spine)*, 2001; 94: 257-264.

- 139.** Jenkins RR. Free radical chemistry. Relationship to exercise. *Sports Med*, 1988;5: 156-70.
- 140.** Rimbach G, Höhler D, Fischer A, Roy S, Virgili F, Pallauf J, Packer L. Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. *Arch Tierernahr*, 1999;52: 203-222.
- 141.** Fehrenbach E, Northoff H. Free radicals, exercise, apoptosis, and heat shock proteins. *Exerc Immunol Rev*, 2001;7: 66-89.
- 142.** Malm C. Exercise-induced muscle damage and inflammation: fact or fiction? *Acta Physiol Scand.*,2001;171:233-239.
- 143.** Sen CK, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J*, 1996;10: 709-720.
- 144.** Reid MB. Invited Review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol*, 2001; 90: 724-31.
- 145.** Andrade FH, Reid MB, Allen DG, Westerblad H. Effect of hydrogen peroxide and dithiothreitol on contractile function of single skeletal muscle fibres from the mouse. *J Physiol*, 1998; 509: 565-575.
- 146.** Coombes JS, Powers SK, Rowell B, et al. Effectsof vitamin E and alpha-lipoic acid on skeletal muscle contractile properties. *J Appl Physiol*, 2001;90: 1424-1430.
- 147.** Wall J. Antioxidants In Prevention Of Reperfusion Damage Of Vascular Endothelium. *TSMJ May*, 2000;1: 67-70.
- 148.** Hamulu AR, Buket S, Alayunt A, Mutaf I, Durmaz İ,Özbaran M. Allopurinol ve deferoksaminin kardiyopulmoner bypass sırasında oksijen serbest radikali oluşumu üzerine etkileri. *Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi*, 1994; 2: 95-100.
- 149.** Duthie GG. Determination of activity of antioxidants in human subjects. *Proc Nutr Soc*, 1999; 58:1015-1024.
- 150.** Clarkson PM, Thompson HS. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr*, 2000;72:637-646.
- 151.** Jenkins RR. Exercise and oxidative stress methodology: a critique. *Am J Clin Nutr*, 2000; 72: 670-674.
- 152.** Ashton T, Rowlands CC, Jones E, et al. Electron spin resonance spectroscopic detection of oxygen-centred radicals in human serum following exhaustive exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 1998; 77: 498-502.

- 153.** Dekkers JC, van Doornen LJ, Kemper HC. The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. *Sports Med.* 1996;21: 213-238.
- 154.** Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, et al. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*, 2000;148:187-197.
- 155.** Şentürk H, Kolankaya D, Şahin Y. Renal iskemi-reperfüzyonu sırasında sıçan böbreğinde oluşan oksidatif stres hasarına silimarin etkisi. *Cankaya University Journal of Science and Engineering*, 2010; 7: 59-74.
- 156.** Fine MA. Oligomeric Proanthocyanidin Complexes: History, Structure, and Phytopharmaceutical Applications. *Altern Med Rev*, 2000;5(2):144-151.
- 157.** Memişoğulları R. Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 2005; 3: 30-39.
- 158.** Antunes F, Han D, Cadenas E. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in in vivo conditions. *Free Radic Biol Med.* 2002;33: 1260-1267.
- 159.** Clarkson PM. Antioxidants and physical performance. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1995;35: 131-141.
- 160.** Liebler DC, Kling DS, Reed DJ. Antioxidant protection of phospholipid bilayers by alpha-tocopherol. Control of alpha-tocopherol status and lipid peroxidation by ascorbic acid and glutathione. *J Biol Chem*, 1986;261:12114-12119.
- 161.** Mastaloudis A, Leonard SW, Traber MG. Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. *Free Radic Biol Med.*, 2001;31:911-922.
- 162.** Palmer FM, Nieman DC, Henson DA, et al. Influence of vitamin C supplementation on oxidative and salivary IgA changes following an ultramarathon. *Eur J Appl Physiol*, 2003; 89: 100-107.
- 163.** Ozhogina OA, Kasaikina OT. Beta-carotene as an interceptor of free radicals. *Free Radic Biol Med*, 1995;19: 575-581.
- 164.** Ray DE. Toxic cell damage, In: *Neurotoxicology in vitro*. Pentreath V.W., ed., Philadelphia, Taylor and Francis Inc., 1999: 77.
- 165.** Arosio P, Levi S. Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage. *Free Radic Biol Med.* 2002;33: 457-463.

- 166.** Bagchi D, Garg A, Krohn RL. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract in vitro. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 1997;95: 179-189.
- 167.** Bagchi D, Garg A, Krohn RL. Protective effects of grape seed proanthocyanidins and selected antioxidants against TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation, and peritoneal macrophage activation in mice. *Gen Pharmacol*, 1998;30: 771-776.
- 168.** Putter M, Grottemeyer KH, Wurthwein G et al. Inhibition of smoking-induced platelet aggregation by aspirin and pycnogenol. *Thromb Res*, 1999;95: 155-161.
- 169.** Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganda G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad Biol Med*, 1996; 20: 933-956.
- 170.** Sato M, Maulik G, Ray PS, Bagshi D, Das DK. Cardioprotective effects of grape seed proanthocyanidin against ischemic reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*, 1999; 31: 1289-1297.
- 171.** Chang WC, Hsu FL. Inhibition of platelet aggregation and arachidonate metabolism in platelets by procyanidins. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 1989; 38: 181-188.
- 172.** Nijveldt RJ. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr*, 2001;74:418-425.
- 173.** Kar P, Laight D, Shaw KM, Cummings MH. Flavonoid-rich grape seed extracts: A new approach in high cardiovascular risk patients? *Int J Clin Pract*. 2006; 60: 1484-1492.
- 174.** NYamakoshi J, Saito M, Kataoka S, Kikuchi M. Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *Food Chem Toxicol*. 2002;40: 599-607.
- 175.** Wren AF, Cleary M, Frantz C, Melton S, Norris L. 90-day oral toxicity study of a grape seed extract (IH636) in rats. *J Agric Food Chem*. 2002; 50: 2180-2192.
- 176.** Ray SD, Bagchi D, Lim PM, et al. Acute and long-term safety evaluation of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 2001;109:165-97.

- 177.** Sizlan A, Güven A, Uysal B, et al. Proanthocyanidin Protects intestine and remote organs against mesenteric ischemia/reperfusion injury. *World J Surg.* 2009; 33: 1384-1391.
- 178.** Spitz DR, Oberley LW. An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. *Anal Biochem*, 1989;179:8-18.
- 179.** Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzimol*, 1990;186:421-431.
- 180.** Kerrigan CL, Stotland MA. Ischemia reperfusion injury- a review. *Microsurgery*, 1993; 14: 165-175.
- 181.** Korthals JK, Wisniewski HM. Peripheral nerve ischemia. Part I. Experimental model. *J Neurol Sci*, 1975; 24: 65-76.
- 182.** Schmelzer JD, Zochodne DW, Low PA. Ischemic and reperfusion injury of rat peripheral nerve. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; 86(5):1639-1642.
- 183.** Lundborg G, Rydevik B. Nerve entrapments and hands with paresthesia the biological background. *Lakartidningen*, 1981;78: 3478-3482.
- 184.** McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New Eng J Med*, 1985; 312 (3): 159-163.
- 185.** Moslen MT. Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis. In. Armstrong D (Ed). *Free radicals diagnostic medicine*, New York: Plenum Pres, 1994.
- 186.** Li Y, Bickel KD, Im MJ, et al. Effects of desferoxamine on ischemia/reperfusion injury after paripheral nerve compression. *Ann Plast Surg*, 1996; 36: 365-369.
- 187.** Tamer L, Polat G, Eskandari G, Ercan B, Atik U. Serbest radikaller. *Mersin Üniv Tıp Fak Der*, 2000; 1(1): 52-58.
- 188.** Kerman M, Cirak B, Ozguner MF, et al. Does melatonin protect or treat brain damage from traumatic oxidative stress? *Exp Brain Res*, 2005;163(3): 406-410.
- 189.** Feng Y, Liu YM, Fratkins JD, LeBlanc MH. Grape seed extract suppresses lipid peroxidation and reduces hypoxic ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Res Bull.* 2005;66: 120-127.
- 190.** Devi A, Jolitha AB, Ishii N. Grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) and antioxidant defense in the brain of adult rats. *Med Sci Monit.* 2006;12: 124-129.

- 191.** Bravo L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev.* 1998;56: 317-333.
- 192.** Serafini M, Ghiselli A, Ferro-Luzzi A. Red wine, tea, and antioxidants. *Lancet*, 1994;344: 626.
- 193.** Kotler M, Rodriguez C, Sainz RM et al. Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex. *J Pineal Res*, 1998; 24: 83-89.
- 194.** Türkoğlu E, Serbes G, Dolgun H, et al. Effects of alpha MSH on ischemia/reperfusion injury in the rat sciatic nerve. *Surgical neurol int*, 2012; 3: 74.
- 195.** Buki A, Okonkwo DO, Wang KK, and Povlishock JT. Cytochrome c release and caspase activation in traumatic axonal injury. *J Neurosci*, 2000; 20: 2825.
- 196.** Nuh zafer Cantürk, İskender Sayek. Cerrahi araştırma kitabı. 2005 nobel tıp kitabevleri.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Apaf-1	Apopitoz aktive edici faktör
ATP	Adenozin trifosfat
AIF	Apopitoz indükleyici faktör
BMP	Kemik morfogenetik protein
KSB	Kan sinir bariyeri
ETC	Elektron transport zinciri
ER	Endoplazma Retikulumu
GER	Granüllü Endoplazma Retikulumu
GPx	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktazı
GSH	Glutasyon
GST	Glutasyon S transferaz
HE	Hematoksilen eozin
HNF-3b	Hepatik nükleer faktör-3b
İR	İskemi reperfüzyon
IAP	Apopitoz inhibitör protein
KAT	Katalaz
MMP	Mitokondriyal membran potansiyeli
MSS	Merkezi sinir sistemi
MPT	Mitokondriyal geçirgenlik geçiş porları
MDA	Malondialdehit
NO	Nitrik oksit
PA	Proantosiyanidin
PS	Periferik sinir
PSS	Periferik sinir sistemi
ROS	Reaktif oksijen türleri
SH	Schwann hücresi
SOD	Süperoksit dismutaz
VDAC	Voltaj bağımlı anyon kanalları

TABLolar DİZİNİ

Tablolar	Sayfa No
Tablo 1 (Deney gruplarının dağılımı).....	45
Tablo 2 (Siyatik sinir dokusunda aktif kaspaz 3 değerlerinin ELISA yöntemi ile ölçümü).....	58
Tablo 3 (Normal ve delaminasyon gösteren miyelin kılıf dağılımının gruplar arası dağılımı).....	60
Tablo 4 (Kontrol grubundaki deneklerin serum MDA ve SOD değerleri).....	68
Tablo 5 (İskemi ve iskemi reperfüzyon grubundaki deneklerin serum MDA ve SOD değerleri).....	69
Tablo 6 (PA verilen iskemi ve iskemi reperfüzyon grubundaki deneklerin serum MDA ve SOD değerleri).....	70
Tablo 7 (Gruplardaki ortalama serum MDA değerleri).....	71
Tablo 8 (Serum SOD değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması).....	72

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekiller	Sayfa No
Şekil 1 (Siyatik sinir dokusunda aktif kaspaz 3 değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması).....	59
Şekil 2 (Normal ve delaminasyon gösteren miyelin kılıf dağılımının gruplar arası karşılaştırılması).....	60
Şekil 3 (Serum MDA değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması).....	71
Şekil 4 (Serum SOD değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması).....	72

RESİMLER DİZİNİ

Resimler	Sayfa No
Resim 1 (Femoral arter ve ven femoral sinirden diseke edildikten sonra anevrizma mikroklipsi uygulanması).....	44
Resim 2 (Aktif kaspaz 3 ve S100 için negatif kontrol).....	52
Resim 3 (Kontrol grubu aktif kaspaz 3 ve S100 işaretlenmesi).....	53
Resim 4A (İskemi grubu aktif kaspaz 3 ve S100 işaretlenmesi).....	54
B: (PA + iskemi grubu aktif kaspaz 3 ve S100 işaretlenmesi).....	54
Resim 5 A (İskemi+ 4 saat reperfüzyon grubu aktif kaspaz 3 ve S100 işaretlenmesi).....	55
B (PA + iskemi + 4 saat reperfüzyon grubu aktif kaspaz 3 ve S100 işaretlenmesi).....	55
Resim 6A (İskemi+ 7 gün reperfüzyon grubu aktif kaspaz 3 ve S100 işaretlenmesi).....	56
B: (PA + iskemi + 7 gün reperfüzyon grubu aktif kaspaz 3 ve S100 işaretlenmesi).....	56
Resim 7 A (İskemi+ 21 gün reperfüzyon grubu aktif kaspaz 3 ve S100 işaretlenmesi).....	57
B: (PA + iskemi + 21 gün reperfüzyon grubu aktif kaspaz 3 ve S100 işaretlenmesi).....	57
Resim 8 (Kontrol grubu elektron mikroskopik görüntü).....	61
Resim 9 (İskemi grubu elektron mikroskopik görüntü).....	61
Resim 10 (iskemi grubu elektron mikroskopik görüntü).....	62
Resim 11 (İskemi grubu elektron mikroskopik görüntü).....	62
Resim 12 (PA + iskemi grubu elektron mikroskopik görüntü).....	63
Resim 13 (PA +iskemi grubu elektron mikroskopik görüntü).....	63
Resim 14 (İskemi + 4 saat reperfüzyon grubu elektron mikroskopik görüntü).....	64
Resim 15 (PA + iskemi + 4 saat reperfüzyon grubu elektron mikroskopik görüntü).....	64

Resim 16 (PA + iskemi + 4 saat reperfüzyon grubu elektron mikroskopik görüntü).....	65
Resim 17 (İskemi + 7 gün reperfüzyon grubu elektron mikroskopik görüntü).....	65
Resim 18 (İskemi + 7 gün reperfüzyon grubu elektron mikroskopik görüntü).....	66
Resim 19 (PA + iskemi + 7 gün reperfüzyon grubu elektron mikroskopik görüntü).....	66
Resim 20 (İskemi + 7 gün reperfüzyon grubu elektron mikroskopik görüntü).....	67
Resim 21 (PA + iskemi + 7 gün reperfüzyon grubu elektron mikroskopik görüntü).....	67