

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**DENEYSEL PERİFERİK SİNİR İSKEMİ-REPERFÜZYON
MODELİNDE NİTRİK OKSİT, ADEZYON MOLEKÜLLERİ
VE SİTOKİNLERİN ROLÜ**

111920

Dr. Özlen TUBAY BAĞDATOĞLU

Yrd. Doç. Dr. Gürbüz POLAT
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Gürbüz POLAT

MERSİN- 2002

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DENEYSEL PERİFERİK SİNİR İSKEMİ-REPERFÜZYON MODELİNDE NİTRİK OKSİT, ADEZYON MOLEKÜLLERİ VE SİTOKİNLERİN ROLÜ

Dr. Özlen TUBAY BAĞDATOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Gürbüz POLAT

Bu tez, Mersin Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından.

SBE- TTB (OTB)-2001-3 no'lu proje olarak desteklenmiştir.


Tez No :9.....


MERSİN- 2002


Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan ‘‘Deneysel Periferik Sinir İskemi-Reperfüzyon Modelinde Nitrik Oksit, Adezyon Molekülleri ve Sitokinlerin Rolü’’ adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.


Tez Savunma Tarihi: 23./08./2002


Prof. Uğur ATIK
Mersin Üniversitesi Tıp Fak.
Biyokimya Anabilim Dalı Bşk.
Jüri Başkanı


Doç. Dr. Lütfü TAMER
Mersin Üniversitesi Tıp Fak.
Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi
Jüri Üyesi


Yrd. Doç. Dr. Gürbüz POLAT
Mersin Üniversitesi Tıp Fak.
Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi
Jüri Üyesi

Yukarıdaki tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 28.8.2002 tarih ve 10.-3.....sayılı kararı ile kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Canan ERDOĞAN
Enstitü Müdürü



ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Son yıllarda üzerinde pek çok çalışma yapılmakta olan iskemi-reperfüzyon hasarının oluşum mekanizmaları ve tedavisi henüz netlik kazanmamıştır. Çeşitli dokularda gözlenebilen ve iskeminin yarattığı çeşitli hasarların sürmesine yol açan reperfüzyon hasarının olası nedenlerini araştırmak amacıyla periferik sinir modelinde bu tez çalışması planlanmıştır. “Deneysel Periferik Sinir İskemi-Reperfüzyon Modelinde Nitrik Oksit, Adezyon Molekülleri ve Sitokinlerin Rolü” başlıklı bu çalışmayı yaparken amacımız yalnızca bir tez yapmak değildi. Amacımız iskemi-reperfüzyon hasarı nedeniyle çeşitli dokularda meydana gelen bozuklukların nedenlerini açıklayabilmek, yeni ve objektif parametreleri tanı ve tedavi yaklaşımları içerisinde değerlendirmeye alabilmek ve deney modeli üzerinde yapılabilecek daha ileri çalışmalar sonrasında bu olası tedavi seçeneklerini klinik pratiğe sokmak olmuştur.

“Deneysel Periferik Sinir İskemi-Reperfüzyon Modelinde Nitrik Oksit, Adezyon Molekülleri ve Sitokinlerin Rolü” başlıklı tez çalışmamın hazırlanması sırasında benden değerli yardımlarını esirgemeyen başta Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Uğur Atik ve tez danışmanım Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Gürbüz Polat olmak üzere, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Doç. Dr. Lülüfer Tamer, Yrd. Doç. Dr. Gülçin Eskandari, Yrd. Doç. Dr. Ali Ünlü, Yrd. Doç. Dr. Burak Çimen’e, Biyokimya Anabilim Dalı araştırma görevlisi arkadaşlarıma, ve tüm biyokimya laboratuvarı çalışanlarına sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışmamın deney aşamasındaki katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Derya Ü. Talas, Yrd. Doç. Dr. Ali Naycı, Yrd. Doç. Dr. Aydın Saray’a ve çalışmamın istatistiksel analizi sırasındaki katkı ve yardımlarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Arzu Kanık’a teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmamın tüm aşamalarında yanımda olan eşim Yrd. Doç. Dr. Celal Bağdatoğlu’na da teşekkür ederim.

Dr. Özlen TUBAY BAĞDATOĞLU

Mersin, 2002

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Periferik Sinir Vaskülarizasyonu	4
2.2. Rat Siyatik Siniri Vasküler Anatomisi	5
2.3. Rat Siyatik Sinirinin Regional Kan Akımı	6
2.4. İskemi Reperfüzyon Hasarı	7
2.4.1. İskemi reperfüzyon hasarında oluşan biyokimyasal değişiklikler	7
2.4.1.1. Serbest oksijen radikalleri ve oluşum mekanizmaları	9
2.4.1.2. Lipid peroksidasyonu	10
2.4.1.3. Nitrik oksitin rolü	11
2.4.1.4. Nötrofillerdeki değişiklikler	13
2.4.2. Adezyon molekülleri ve Fibronektin	13
2.4.3. Transforming growth factor β süper ailesi	16
2.4.3.1. Aktivin	17
2.4.3.2. Transforming growth factor β	18
3. ARAÇ, GEREÇ ve YÖNTEMLER	21
3.1. Araç ve Gereçler	21
3.1.1. Deney Tasarımı ve Cerrahi Prosedür	21
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	21
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	22
3.1.4. Çalışmada Kullanılan Testler	22

3.1.5. Araştırmada Kullanılan Ayıraçların Hazırlanması	23
3.1.5.1. Nitrit- Nitrat ölçümünde kullanılan ayıraçlar	23
3.1.5.2. Malondialdehit ölçümünde kullanılan ayıraçlar	23
3.1.5.3. Transforming growth factor $\beta 1$ ölçümünde kullanılan ayıraçlar	24
3.1.5.4. Transforming growth factor $\beta 2$ ölçümünde kullanılan ayıraçlar	25
3.2. Yöntemler	25
3.2.1. Deney Modeli	25
3.2.1. Deney Protokolü	26
3.2.2.1. Gruplar	26
3.2.3. Biyokimyasal Analizler	30
3.2.3.1. Örneklerin hazırlanması	30
3.2.3.2. Nitrit- Nitrat ölçümü	30
3.2.3.2.1. Prensip	30
3.2.3.2.2. Örneklerin ve reaktiflerin hazırlanması	31
3.2.3.2.3. Yöntem	31
3.2.3.3. MDA ölçümü	32
3.2.3.3.1. Prensip	32
3.2.3.3.2. Örneklerin ve reaktiflerin hazırlanması	32
3.2.3.3.3. Yöntem	32
3.2.3.4. Aktivin A ölçümü	33
3.2.3.4.1. Prensip	33
3.2.3.4.2. Örneklerin ve reaktiflerin hazırlanması	34
3.2.3.4.3. Yöntem	34
3.2.3.5. Fibronektin ölçümü	35
3.2.3.5.1. Prensip	35
3.2.3.5.2. Örneklerin ve reaktiflerin hazırlanması	35
3.2.3.5.3. Yöntem	35
3.2.3.6. Transforming growth factor $\beta 1$ ölçümü	36
3.2.3.6.1. Prensip	36
3.2.3.6.2. Örneklerin ve reaktiflerin hazırlanması	36
3.2.3.6.3. Yöntem	37
3.2.3.7. Transforming growth factor $\beta 2$ ölçümü	38

3.2.3.7.1. Prensip	38
3.2.3.7.2. Örneklerin ve reaktiflerin hazırlanması	39
3.2.3.7.3. Yöntem	39
3.2.4. Çalışma Standart Eğrilerinin Hazırlanması	40
3.2.4.1. Nitrit standart eğrisinin hazırlanması	40
3.2.4.2. Nitrat standart eğrisinin hazırlanması	42
3.2.4.3. MDA standart eğrisinin hazırlanması	43
3.2.4.4. Aktivin A standart eğrisinin hazırlanması	44
3.2.4.5. Fibronektin standart eğrisinin hazırlanması	45
3.2.4.6. TGF β 1 standart eğrisinin hazırlanması	46
3.2.4.7. TGF β 2 standart eğrisinin hazırlanması	47
3.2.5. İstatistiksel Analiz	48
4. BULGULAR	49
4.1. Biyokimyasal ve İstatistiksel Analizlerin Sonuçları	49
4.1.1. Nitrit-Nitrat sonuçları	49
4.1.2. MDA sonuçları	51
4.1.3. Fibronektin sonuçları	53
4.1.4. Aktivin A sonuçları	54
4.1.5. TGF β 1 sonuçları	56
4.1.6. TGF β 2 sonuçları	57
5. TARTIŞMA	65
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	74
7. KAYNAKLAR	75
ÖZGEÇMİŞ	86

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Periferik sinir ekstrensek ve intrinsek vaskülarizasyonu	4
Şekil 2.2. Femoral arter ligasyonunun rat siyatik sinirinde yarattığı kan akımı değişiklikleri	6
Şekil 2.3. İskemik hasardaki olaylar dizisi	8
Şekil 2.4. Hücre hasarında oksijenin rolü	10
Şekil 2.5. Nitrik oksit biyosentezi	12
Şekil 2.6. Fibronektinin yapısı	15
Şekil 2.7. Aktivinin fonksiyonları	17
Şekil 2.8. Transforming growth faktör β 1'in yapısı	19
Şekil 2.9. Transforming growth factor β sinyal iletimi	20
Şekil 3.1. Femoral damarların ve sinirin anatomisi	29
A) İskemi öncesi	
B) İskemi anında	
Şekil 3.2. Nitrit standart eğrisi	41
Şekil 3.3. Nitrat standart eğrisi	42
Şekil 3.4. MDA standart eğrisi	43
Şekil 3.5. Aktivin A standart eğrisi	44
Şekil 3.6. Fibronektin standart eğrisi	45
Şekil 3.7. TGF β 1 standart eğrisi	47
Şekil 3.8. TGF β 2 standart eğrisi	48
Şekil 4.1. Nitrit-Nitrat grafiği	50
Şekil 4.2. MDA grafiği	52
Şekil 4.3. Fibronektin grafiği	54
Şekil 4.4. Aktivin A grafiği	55
Şekil 4.5. TGF β 1 grafiği	57
Şekil 4.6. TGF β 2 grafiği	58

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Deney tasarımı (Kontrol, iskemi ve reperfüzyon grupları ve süreleri)	28
Çizelge 4.1. Nitrit-Nitrat sonuçları	50
Çizelge 4.2. MDA sonuçları	51
Çizelge 4.3. Fibronektin sonuçları	53
Çizelge 4.4. Aktivin A sonuçları	55
Çizelge 4.5. TGF β 1 sonuçları	56
Çizelge 4.6. TGF β 2 sonuçları	58
Çizelge 4.7. Grup I'de değişkenler arası korelasyon analizi sonuçları	59
Çizelge 4.8. Grup II'de değişkenler arası korelasyon analizi sonuçları	60
Çizelge 4.9. Grup III'de değişkenler arası korelasyon analizi sonuçları	60
Çizelge 4.10. Grup IV'de değişkenler arası korelasyon analizi sonuçları	61
Çizelge 4.11. Grup V'de değişkenler arası korelasyon analizi sonuçları	61
Çizelge 4.12. Grup VI'da değişkenler arası korelasyon analizi sonuçları	62
Çizelge 4.13. Grup VII'de değişkenler arası korelasyon analizi sonuçları	63
Çizelge 4.14. Grup VIII'de değişkenler arası korelasyon analizi sonuçları	63
Çizelge 4.15. Grup IX'da değişkenler arası korelasyon analizi sonuçları	64

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AR	Aktivin Reseptörü
ATP	Adenozin Trifosfat
BH ₄	6 (R)- tetra-hidro-L-biopterin
Bkz	Bakınız
cGMP	Siklik Guanozin Monofosfat
Ca ⁺⁺	Kalsiyum
CI % 95	% 95 Güven Aralığı
dk	Dakika
DNA	Deoksi Ribonükleik Asit
DPBS	Dulbecco'nun Fosfat Tuz Tamponu
ECM	Ekstrasellüler Matriks
ELISA	Enzim Bağlı İmmunosorbent Assay
FAD ⁺	Flavin Adenin Dinükleotit
FMN	Flavin Mononükleotit
FSH	Folikül Stimüle Edici Hormon
g	Gram
GTP	Guanozin Trifosfat
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HO ₂ .	Perhidroksil Radikali
HCl	Hidroklorik Asit
ICAM-1	İntersellüler Hücre Adezyon Molekülü-1
IR	İskemi Reperfüzyon
K ⁺	Potasyum
kg	Kilogram
KNO ₃	Potasyum Nitrat
L	Litre
L.	Lipid Radikali
LOO.	Lipid Peroksit Radikali
mRNA	Haberci Ribonükleik Asit
MDA	Malondialdehit

mg	Miligram
μ l	Mikrolitre
mM	Milimolar
n	Denek Sayısı
ng	Nanogram
Na ⁺	Sodyum
Na ⁺ -K ⁺ -ATP	Sodyum Potasyum Adenozin Trifosfataz
Na ₂ CO ₃	Sodyum Karbonat
NaCl	Sodyum Klorür
NAD ⁺	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat (fedükte form)
NaHCO ₃	Sodyum Bikarbonat
NaNO ₂	Sodyum Nitrit
NaOH	Sodyum Hidroksit
nm	Nanometre
nM	Nanomol
N	Normalite
NN	Nitrit-Nitrat
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
NR	Nitrat Redüktaz
O ₂ ⁻	Süperoksit Anyonu
·OH	Hidroksil Radikali
p	Anlamlılık (significance) Değeri
pg	Pikogram
PMNL	Polimorfonükleer Lökosit
PUFA	Poliansature Yağ Asidi
r	Korelasyon Katsayısı
RGD	Arjinin- Glisin-Aspartik Asit
RNA	Ribonükleik Asit
rpm	Santrifüj Rotorunun Dakikadaki Dönme Hızı

SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SOR	Serbest Oksijen Radikali
TBA	Thiobarbitürük Asit
TBST	Tris Buffered Saline With Tween
TGF β 1	Transforming Growth Factor Beta 1
TGF β 2	Transforming Growth Factor Beta 2



ÖZET

DeneySEL Periferik Sinir İskemi- Reperfüzyon Modelinde

Nitrik Oksit, Adezyon Molekülleri ve Sitokinlerin Rolü

İskemik sinir hasarının nöropatolojisi, göreceli olarak, iyi bilinmesine karşın patogenezi yeterince aydınlatılamamıştır. Öne sürülen mekanizmalardan biri kan sinir bariyerinin yıkılması sonucu ortaya çıkan oksidatif stres ve lipid peroksidasyonudur. İskemik hücre hasarı ile oluşan inflamasyon dokulara lökosit migrasyonunu artırmakta, bu da adezyon moleküllerinin ekspresyonlarını artırmaktadır. Periferik sinir iyileşmesinde özellikle önemli olan fibronektin de bu adezyon moleküllerinden biridir. Ayrıca olaya inflamasyon ve tamir olaylarında görevleri olan ve nöroprotektif etki gösteren lokal büyüme faktörleri yani sitokinler de tam olarak açıklanamayan mekanizmalarla katılmaktadırlar.

Bu çalışmada, iskemi-reperfüzyon hasarının rat siyatik siniri ve dalları üzerindeki etkileri değerlendirildi ve kan sinir bariyerinin yıkılması, oksidatif stres ve lipid peroksidasyonunun biyokimyasal sonuçları araştırıldı. Ayrıca bu olayda adezyon molekülleri ve sitokinlerin de olası etkileri incelendi.

Rat femoral arter ve venine damar klipsi konularak 3 saat süreyle klempe edildi ve siyatik sinir ve dallarında iskemi yaratıldı. Daha sonra klipsler alınarak değişen sürelerde reperfüzyona izin verildi. Ardından intrakardiyak yolla alınan kanlardan elde edilen serum örnekleriyle biyokimyasal analizler yapıldı. Oksidatif stres göstergesi olarak nitrik oksit son ürünü olan nitrit-nitrat düzeylerine, lipid peroksidasyonu içinse malondialdehit düzeylerine bakıldı. Adezyon moleküllerinden fibronektin, sitokinlerden ise Aktivin A, transforming growth faktör $\beta 1$ ve $\beta 2$ düzeyleri ölçüldü.

İskemi sonucu, incelenen tüm biyokimyasal parametrelerin serum düzeylerinde kontrollere göre artış saptandı ($p < 0,05$). Reperfüzyon sonucunda ise, reperfüzyon sürelerindeki değişikliklere bağlı olarak çalışma grupları arasında anlamlı fark olduğu gözlemlendi ($p < 0,05$). Ayrıca aynı grup içindeki farklı parametreler arasında reperfüzyon sürelerine bağlı olarak çeşitli ilişkiler olduğu izlendi ($r > 0,50$).

İskemi-reperfüzyon hasarı sonucunda kan-sinir bariyeri hasarı ve aksonal dejenerasyon ortaya çıkmaktadır. İskemi sonucunda biyokimyasal parametreler bozulmakta ve reperfüzyon süresine bağlı olarak da bu hasar bir süre devam etmektedir. Bu model çerçevesinde elde edilen bulgular, periferik sinirlerde çeşitli nedenlerle ortaya çıkabilecek I/R durumlarında lipid peroksidleri, nitrik oksit, adezyon molekülleri ve sitokinlerin düzeylerinin etkilendiğini, birbirleri ile etkileştiğini ve bu moleküllerin hasarın oluşumu ve/veya onarım sürecine katılmakta olduklarını göstermektedir. Aktivin, TGF β , ve fibronektinin iyi planlanmış deneysel çalışmalarda periferik sinir hasarlarında tedavi amacıyla kullanılması ve olası verimli sonuçların elde edilmesi durumunda klinik kullanımlarının tartışmaya açılabilmesi yararlı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: İskemi reperfüzyon hasarı, periferik sinir, nitrik oksit, adezyon molekülü, sitokin.

ABSTRACT

The Roles of Nitric Oxide, Adhesion Molecules and Cytokines in an Experimental Peripheral Nerve Ischemia-Reperfusion Model

Although the neuropathology of ischemic nerve fiber degeneration is relatively well known, its pathogenesis is poorly understood. One of the presumed mechanisms is the breakdown of blood-nerve barrier, causing the oxidative stress and lipid peroxidation. The ischemic cell injury causes inflammation so the migration of the leukocyte to the tissues increases. And this effect of the leukocyte results with the expression of adhesion molecules. One of these adhesion molecules, fibronectin, is important in peripheral nerve healing specially. On the other hand, local growth factors called as cytokines, that have neuroprotective effects on inflammation and repair, participates the process by undefined mechanisms.

In this study, we evaluated the effect of ischemia and reperfusion on the sciatic nerve of the rat and investigated the biochemical evidence of blood-nerve barrier disruption, oxidative stress and lipid peroxidation. Also, the probable effects of the adhesion molecules and cytokines are examined.

The distal portion and trifurcation of the sciatic nerve was rendered ischemic by clamping the femoral vessels for three hours and followed by varying duration of reperfusion. And then, some biochemical analyses have done by using the serum samples of the rats. For detecting the oxidative stress nitrite-nitrate, which are the metabolic end products of nitric oxide and for lipid peroxidation malondialdehyde measurements have done. Adhesive molecules as fibronectin and cytokines as Activin A, transforming growth factor $\beta 1$ and $\beta 2$ levels were measured.

Ischemia resulted in an increase in all the biochemical parameters comparing with the control serum levels ($p < 0,05$). And after the reperfusion a significant difference between the experimental groups determined causing the different duration of reperfusion ($p < 0,05$). Also some correlations were established between the biochemical parameters in the same group depending on the varying reperfusion time ($r > 0,50$).

These data indicate that, severe ischemia of the peripheral nerve results with the functional impairment, and disruption of blood-nerve barrier, in ischemia-reperfusion injury. The ischemia causes some important changes in biochemical parameters, and the nerve injury continues for a while according to the reperfusion time. As a result of this model, ischemia-reperfusion injury of peripheral nerve caused by several reasons, effects on the levels of nitric oxide, lipid peroxides, adhesion molecules and cytokines. Also these data indicates that all these molecules interact with each other and take part in the process during the injury or/and repair of the peripheral nerve. Activin A, transforming growth factor $\beta 1$ and $\beta 2$, fibronectin can be used in the treatment of ischemia-reperfusion injuries in some well performed experimental studies. And following several studies on this model, these molecules can take part in clinical use as therapeutic agents.

Key Words: Ischemia reperfusion injury, peripheral nerve, nitric oxide, adhesion molecule, cytokine.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bir periferik sinirin işlevlerini normal olarak sürdürebilmesi için iki temel gereksinimi karşılanmalıdır: 1) Periferik sinir merkezi sinir sistemindeki hücre gövdesi ile bağlantılı olmalıdır; 2) intranöral sistem yoluyla devamlı ve yeterli miktarda oksijen desteğine sahip olmalıdır. Sinirin tam kesisi, kesinin distalinde, uyarılabilirliğin 3-8 gün içinde tam kaybına yol açmaktadır. Tam iskemi durumunda ise sinir fonksiyonu 30-90 dakika içinde hızla bozulmaktadır (1-4). İskemi sırasında ortaya çıkan nöral doku hasarının derecesi iskeminin süresi ve bu dönemdeki kan akımı ile ilgilidir (5). Kan akımının yeniden sağlanmasıyla (reperfüzyon) oksijen ve metabolizma ile ilgili öncül maddelerin sağlanması, atık maddelerin atılması gibi doku perfüzyonunun ana öğeleri yeniden sağlanmış olur. Reperfüzyon, iskemik hasarın ilerleyişinin engellenmesine ve en azından geri dönüşümlü olan bazı hasarların ortadan kalkmasına yol açar. Akımın yeniden sağlanması, iskemi ile ortaya çıkan bazı olayları da beraberinde getirmektedir (6). Hasara uğramış dokuyla akımı yeniden sağlanan kan arasında oluşan hücresel ve biyokimyasal etkileşimler doku hasarını daha da artırabilir. Kan akımının yeniden sağlanmasının bu paradoksal yönü reperfüzyon hasarı olarak bilinmektedir (6).

Reperfüzyon hasarı çok çeşitli dokularda gerçekleşmekle birlikte, deneysel ve klinik çalışmalar daha çok kalp ve beyin dokularında yapılmıştır (7). Fenomen herhangi bir dokuya özgü olmayıp, çeşitli dokularda hücre hasarı ve ölüme giden mekanizmalardaki benzerliği yansıtmaktadır. Kalp ve sinir sisteminde bu konuyla ilgili yapılan çalışmalarda, patogeneze ilgili olarak birtakım mekanizmalar tanımlanmıştır. Bunlar, sitozolde kalsiyum iyonunun artması, hücre şişmesi, damarların lökositlerle tıkanması, toksik etkili serbest oksijen radikallerinin oluşumu, enerji bağımlı olan Na^+K^+ -ATP pompasının faaliyetinin durması ve hücre içine sıvı girişinin artması gibi olayları kapsamaktadır (8-12).

Periferik sinirlerin iskemik dejenerasyonunun nöropatolojisi ile ilgili çalışmalar yapılmış olmasına karşın patogeneze çok iyi anlaşılamamıştır. Kan-sinir bariyerinin bozulması ile ortaya çıkan oksidatif stres ve lipid peroksidasyonu sonucu bir çok biyokimyasal ve patolojik değişiklik oluşmaktadır. İskemik hücre hasarı inflamasyonu oluşturmaktadır. Bu da dokulara lökosit migrasyonunu kolaylaştırmakta, adezyon moleküllerinin ekspresyonunu arttırmaktadır. Bu adezyon moleküllerinden özellikle

fibronektin periferik sinir iyileşmesinde önemlidir. Periferik sinir onarım sürecinde schwann hücreleri rol almaktadır ve nörit migrasyonunu proksimal-distal yönde ilerletmektedir. Bu sürecin kontakt aşamasında ise fibronektinin rehberlik ettiği düşünülmektedir. Bu molekülün schwann hücrelerinin proliferasyon ve migrasyonunu stimüle eden bir kemoatraktan olduğu gösterilmiştir (13-16). Fibronektinin reperfüzyon süreci boyunca düzeyleri yeterince incelenmemiştir. Ayrıca fibronektin ekspresyonunun serbest oksijen radikalleri, antioksidan sistemler ve nitrik oksit (NO) ile etkileşiminin incelenmesine patogenezi açıklamak için ihtiyaç duyulmaktadır (13-16). İskemi-reperfüzyon hasarında lökositler önemli rol oynamaktadırlar. NO ise lökosit adezyonu ve kemotaksisinin endojen inhibitörüdür. Bu etkisini endotel hücrelerinden salınan ICAM-1 gibi adezyon moleküllerini inhibe ederek yapmaktadır (17). İnflamasyon, doku yenilenmesi, hücre proliferasyonu, yara iyileşmesi gibi pek çok biyolojik aktivitesi bulunan bir grup molekül ise sitokinlerdir. Bunlar hücreler arası iletişimi sağlayan sinyal molekülleridir. Sitokinlerden bir kısmı hücrenin üreme ve çoğalmasını uyarırlar ki, bunlara büyüme faktörleri adı verilmektedir. Lokal büyüme faktörlerinden olan Transforming growth faktör β süper ailesinin üyelerinden Activin ve Transforming growth faktör $\beta 1$ ve $\beta 2$ (TGF $\beta 1$ ve $\beta 2$) de inflamasyon, yara iyileşmesi, ve tamir olaylarında rol almaktadırlar. Ayrıca nöroprotektif etkilerinin yanı sıra fibronektin, kollajen ve hücre yüzey integrinleri gibi pek çok ekstrasellüler matriks bileşeninin de potent indükleyicisidirler (18-21).

Beyin üzerinde, iskeminin olumsuz etkileri iyi bilinmesine karşın periferik sinir liflerinin iskemik hasardan korunması veya iskeminin olumsuz etkilerinin azaltılması konusundaki çalışmalar oldukça azdır. İskemik fonksiyon bozukluklarının fizyopatolojisinde yer alan faktörler tam netlik kazanmamıştır. Ayrıca deneysel olarak tekrarlanabilen, standart bir periferik sinir iskemi-reperfüzyon modeli için arayışlar henüz sürmektedir. Periferik sinirin beyine göre iskemiyeye daha dirençli olması, terapötik amaçlı girişimlerin önemini ve şansını arttırmaktadır. Bu nedenle, iskemik hasara yol açan mekanizmaların daha iyi aydınlatılmasıyla periferik sinirin korunması veya iskemik hasarın azaltılması olanağı doğabilir.

Çalışmamızda geçmişte bir periferik sinir iskemi-reperfüzyon modeli yaratma amaçlı girişimler göz önüne alınarak, bir modifiye iskemi-reperfüzyon modeli yaratılmasına çalışılmıştır. Bu modelin tekrarlanabilir ve kullanışlı olduğu çeşitli

parametrelerle kanıtlanmak istenmiş olup, periferik sinir iskemik hasarında serbest oksijen radikallerinin (SOR), fibronektin gibi adezyon fonksiyonu gösteren ekstrasellüler matriks (ECM) bileşenlerinin, ve lokal büyüme faktörlerinin (sitokin) olası rollerinin ve ilişkilerinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

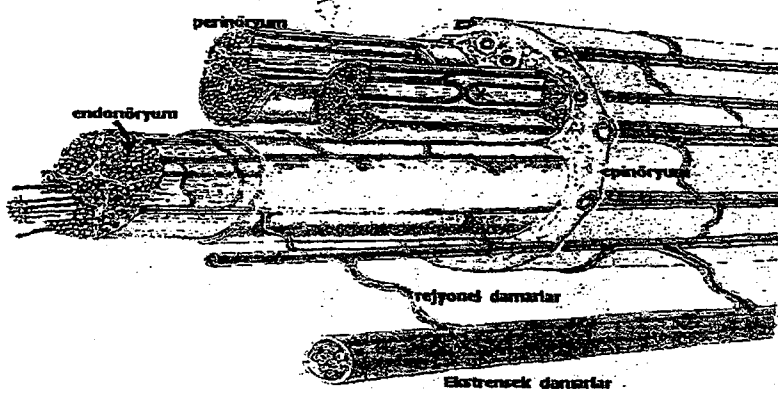


2. GENEL BİLGİLER

2.1. PERİFERİK SİNİR VASKÜLARİZASYONU

Periferik sinirler, hem impuls iletimi hem de aksonal transport için sürekli bir enerji gereksinimi içindedir. Periferik sinir kanlanması durması sinir fonksiyonunun hızla bozulmasına yol açar (22-23). Bir periferik sinirin kesilmesi sonrası eksitabilite 3-8 gün daha sürdüğü halde, tam iskemi altında kalması sonucu yarım saat içinde tüm ileti fonksiyonu durur (24-27).

Geçmişte yapılan araştırmalar, periferik sinirlerin, işlevsel olarak birbirinden bağımsız fakat oldukça iyi entegre olmuş ekstrensek ve intrinsek mikrovasküler sistemlerle beslendiğini ve vaskülarizasyonu iyi yapılar olduğunu göstermiştir (28-31). Ekstrensek sistem değişik sayı ve boyutlarda segmental olarak düzenlenen arterler ve onların yanındaki venlerden oluşur (32-34). Ekstrensek sistemi, öncelikle rejyonel büyük arter ve venlerden gelen dallar oluşturur, fakat müküler ve küçük periosteal dallar da katkıda bulunur. Ekstrensek sisteme ait damarlar, büyük sinir trunkuslarına yaklaştıkça siniri çevreleyen adventisya benzeri gevşek bağ dokusu (mezonöryum) içinde ilerlerler (35). Lokal besleyici damarlar epinöryuma ulaştınca inen ve çıkan dallara ayrılarak intranöral intrinsek vasküler sistemle anastomozlar yaparlar (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Periferik sinirin ekstrensek ve intrinsek vaskülarizasyonu (35)

İntrensek mikrovasküler sistem epinöral, perinöral ve endonöral pleksuslardan ve aralarındaki komunikan damarlardan oluşur (36). Sinir içi intrensek mikrovasküler sistem epinöryum içinde uzunlamasına ilerleyen damarlarla karakterizedir. Bu intrensek vasküler sistem ilerleyişi boyunca ekstrensek damarlardan segmental dallar alır. Bu rejyonel damarlar mezonöryumda ilerler ve sinirin ekstremitte hareketleri ile uzunlamasına hareketine izin verir (37).

Periferik sinirin intrensek vasküler sisteminin ana longitudinal damarları epinöryumda yerleşiktir (38). Epinöral pleksusta çok sayıda ve longitudinal uzanan arteriol ve venüller yer alır; bu damarlar perinöral ve endonöral pleksuslara çok sayıda komunikan dal ile bağlantılıdır. Daha sonra perinöryum içinde vasküler pleksuslar oluşur. Longitudinal damarlar perinöryumun hücresele tabakaları arasında uzun mesafeler boyunca yayılırlar. Bu damarlar endonöral boşluğa karakteristik bir şekilde oblik olarak girerler. İntrensek ve ekstrensek sistemler birbirleriyle denge içindedir ve her biri diğerindeki fonksiyonel bozuklukları kompanse edebilir (39,40).

Tüm sinir fasikülleri boyunca uzunlamasına yönelimli bir kapiller sistem bulunur. Segmental endonöral kapiller damarlar birbirleriyle bir zincirin halkaları gibi karakteristik U- biçimli kıvrımlar yaparak bağlantı halindedirler. Ayrıca ekstrasfasiküler epinöral damarlara transperinöral anastomozlarla bağlıdır. Sinirin kan akımı için önemli ölçüde bir rezerv kapasitesi vardır, Longitudinal damarlar periferik sinir fazlaca mobilize edildiğinde rejyonel ekstrensek kanlanmanın ortadan kalkmasını kompanse edebilirler (41-43).

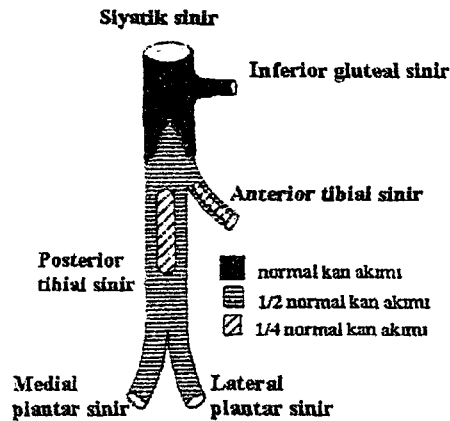
2.2. RAT SİYATİK SİNİRİ VASKÜLER ANATOMİSİ

Ratlarda siyatik sinirin damarlanması, medulla spinalisten çıktıktan ve pelvise girdikten sonra, A. glutealis inferior ve eşlik eden venleri tarafından sağlanır. Inferior gluteal arter, arteria komitans'ı (nervi ischiadici) posterior mezonöryumda oluşturarak sinirde kanlanmayı gerçekleştirir. Rat siyatik sinirinin ikinci büyük kanlanma kaynağı A. Poplitea ve genellikle popliteal arter yanındaki iki popliteal vendir (44). 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 yakını gerçekleştirir (45-46). Yapılan

mikroradyografik çalışmalar ve disseksiyonlarda % 40-50 sıklıkla uyluk 1/3 orta bölümde bir intermediat arterin siyatik sinirin kanlanması sağladığı saptanmıştır (47). Bu intermediat arter insandaki A. Medialis Femoralis Circumflexa'nın A. Gluteus Inferior ile anastomotik dalı ile benzerlikler göstermektedir; bu nedenle bunu Anastomotik arter ve ven olarak belirtmek doğru olacaktır (48).

2.3. RAT SİYATİK SİNİRİNİN REGIONAL KAN AKIMI

1905 yılında Okada, yalnızca inferior gluteal arterin bağlanması tüm siyatik sinirde iskemik dejenerasyon yaratacağını öne sürmüştür (49). Sonraki deneysel çalışmalarda Okada'nın bulguları doğrulanmamış ve siyatik sinirin ikili kanlanmasının herhangi birisinin, intrinsek veya ekstrinsek dolaşimlardan birisi tıkanıp taktirde, kompensasyon için yeterli olabileceği vurgulanmıştır (50-52). Hess, iliak arter ligasyonunu ve sonra Myers, epinöryumun disseksiyonu sonrasında oluşan değişiklikleri incelemişlerdir (53-54). Nukada'ya göre rat siyatik siniri beslenmesini femoral ve internal iliak arterler sağlar (55). İnternal iliak arter ligasyonu sonucu siyatik sinirin pelvik ve uyluk 1/3 üst ve 1/3 orta bölümlerinde kan akımı önemli ölçüde azalmıştır. Femoral arter ligasyonu uyluk 1/3 alt bölümü ve bunun distalinde kalan siyatik sinir trifurkasyonu ile bunun tibial, peroneal ve sural dallarında tam bir iske mi yaratmıştır. 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 sinir trasesi boyunca regional kan akımı değişikliklerini ortaya koymuştur (56). (Şekil 2.2)



Şekil 2.2 Femoral arter ligasyonunun rat siyatik sinirinde yarattığı kan akımı değişiklikleri (56)

2.4. İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI

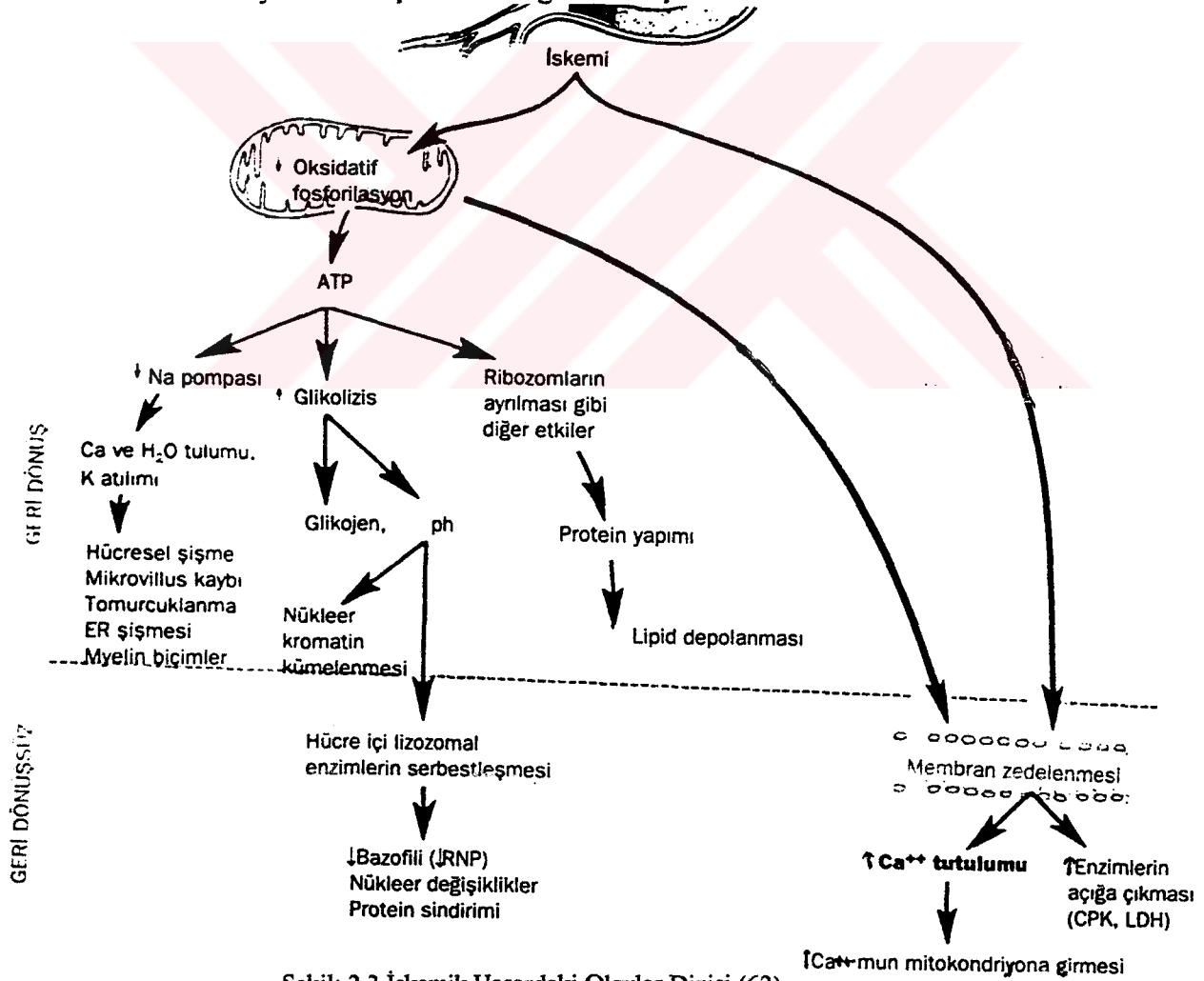
Aerobik metabolizmayı sürdürmek için gerekli olan oksijenin dokulara yeterli düzeyde ulaştırılmamasına iske mi adı verilir. İskemik dokudaki kan akımının restorasyonu ise reperfüzyon olarak adlandırılır. Doku kanlanması kesildiğinde gelişen bir dizi kimyasal reaksiyon sonucunda hücre fonksiyonlarında bozulma, hücre içi ve hücreler arasında ödem ve son olarak hücre ölümü gözlenir (57). Oksijen hücre fonksiyonları için vazgeçilmez bir moleküldür. Eksikliğinde başlayan anaerobik metabolizma ile çok az enerji elde edilebilir ve hücre içi enerji depolarının tükenmesi hücre içi ve dışı arasındaki iyon gradientlerinin korunamamasına ve iyonik homeostazisin bozulmasına neden olur (57-58).

Kan akımının başlamasıyla dokuya oksijen girişi, metabolizma için gerekli substratların temini ve metabolik atık ürünlerin uzaklaştırılması gibi temel fonksiyonel ögeler çalışmaya başlar. Reperfüzyon ile kan ve iskemik dokular arasındaki etkileşimler hasarı daha da artırır (59). Kan akımının tekrar başlaması iskeminin yol açtığı hasarı sınırlandırmaktadır fakat kan ve hasarlı doku arasındaki etkileşimler oluşan doku hasarını daha da arttırabilmektedir. Kesilmiş olan kan akımının tekrar başlaması sonucu, paradoksal olarak, hasarın daha da artmasına reperfüzyon hasarı adı verilir (60).

2.4.1. İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINDA OLUŞAN BİYOKİMYASAL DEĞİŞİKLİKLER

İskemik hasarın patolojisi hücre sel düzeydedir. Oksijen eksikliğinde hücre metabolizması anaerobik glikolize yönelir. Krebs döngüsü ve elektron transport zinciri bypass edilir, piruvat laktata çevrilir. 36 ATP'lik aerobik metabolizmadaki enerji üretimi anaerobik olana göre 18 kat fazladır. Substrat başına daha az enerji üretilmesine rağmen enerji üretebilmek amacıyla daha fazla substrat metabolize edilir. Metabolizmadaki bu artışa karşılık enerji üretimindeki bu azalma Pastör etkisi olarak bilinir (61). Hücrede enerjinin %60'ı Na^+ - K^+ pompasının çalışmasında kullanılırken, %40 enerji geri kalan hücre fonksiyonlarında kullanılır. Enerji üretiminde kullanılan substratlar tamamen metabolize olunca bu pompa çalışamaz. Na^+ ve suyun hücre içinde birikimiyle akut hücre sel şişme meydana gelir. Hücre içinde yüksek olan K^+ konsantrasyonu azalır. K^+ 'un bu dışarı akımı bir inbalansa neden olarak voltaj bağımlı

Ca^{++} kanallarını uyarır ve sarkoplazmik retikulumdan Ca^{++} salınır. İntraselüler Ca^{++} toksik düzeye erişince membran fosfolipidleri hidrolize uğrar. ATP eksikliğine bağlı olarak granüllü endoplasmik retikulum'dan ribozomlar ayrılır, ribozom fonksiyonu bozulur ve protein sentezi durur. Laktik asit artışı ise intraselüler pH'ı düşürür. DNA ve RNA'da sarılma ve kümelenme oluşur. Transkripsiyon gerçekleşemez ve protein sentezi inhibe olur. Vital protein ve enzimlerin sentezlenememesi ve plasma membranının lizisi ile hücre ölümü oluşur. Her ne kadar bu reaksiyonlar zinciri letal olsa da başlangıçta oksijen ve kan akımı hızla sağlandığında reversibldir. Mitokondri intakt iken ATP üretilir, Na^+-K^+ pompası çalışır, intraselüler laktik asit okside edilebilir ve DNA hasarı ortadan kalkar. Ribozomlar tekrar Endoplasmik retikulum'a bağlanır. Lizozomlar hasarlı hücresel yapıları sindirir, yıkılanlar yerine konarak olay geri döner (61,62). Anoksi uzun sürdüğünde ise hücre hasarı geri dönüşsüzdür. İskemik hasardaki olaylar zinciri şekil 2.3'de gösterilmiştir.



Şekil: 2.3 İskemik Hasardaki Olaylar Dizisi (62)

İskemi-reperfüzyon (İR) hasarı patogenezi ile ilgili pek çok çalışmalar olmasına rağmen henüz hasarın nedenleri kesinleşmiş değildir. Patogeneizde inflamatuar mekanizmaların major rol oynadığı düşünülmektedir. Bu inflamatuar mekanizmalarda lökositler, lökosit adezyon molekülleri ve sitokinler rol almaktadır (63). Ayrıca mekanizmalardan birisi de oksidatif strestir. Oksidatif strese bağlı olarak kan-sinir bariyeri yıkıma uğramakta ve lipid peroksidasyonu oluşmaktadır (64).

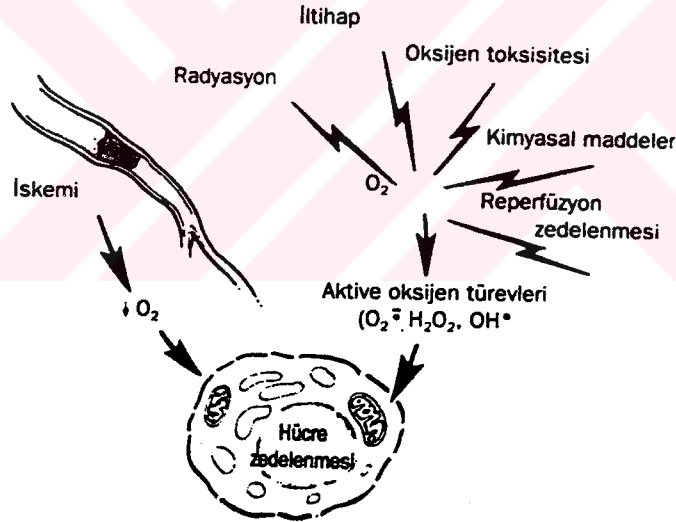
İR hasarı üzerine çeşitli hipotezler vardır. Buna göre hücre hasarı reperfüzyon sırasında olmaktadır. Bunun nedeni de toksik oksijen metabolitlerinin üretimidir. Bunlar süper oksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikalleri ($.OH$) gibidir (61,62). Bu teoriye göre iskemi metabolik bozukluğa yol açmakta bu da oksijen metabolitlerinin üretimini sağlamaktadır. Kan akımı düzeltildikten sonra da reperfüzyon hasarına neden olmaktadır. Toksik oksijen türevlerinin büyük ölçüde reperfüzyon sırasında iskemi alanına infiltre olan polimorfonükleer lökositlerce yapıldığı düşünülmektedir (61,62).

2.4.1.1. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ VE OLUŞUM MEKANİZMALARI

İskemi-reperfüzyon hasarının oluşmasında başlıca rolü indirgenme reaksiyonları sonucunda oluşan serbest oksijen radikalleri (SOR) oynar (65). Serbest oksijen radikalleri kimyasal olarak reaktif moleküllerdir; bunun nedeni termodinamik stabiliteyi kazanmak için komşu moleküllerden elektronları veya hidrojen atomlarını ayırmaları gerekir ve bunun sonucunda bu moleküller stabiliteelerini kaybeder ve bu reaksiyon kısır döngü haline gelir (66). Bu reaksiyonda önce süperoksit radikali (O_2^-) ve sonra perhidroksil radikali (HO_2), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oldukça reaktif hidroksil radikali ($.OH$) oluşur. Hidroksil radikali canlı hücrelerde bulunan hemen hemen tüm moleküllerle (proteinler, polisakkaritler, aminoasitler, DNA bazları, uzun zincirli doymamış yağ asitleri ve organik asitler) reaksiyona girebilir (66,67).

SOR oluşum yolları çok çeşitlidir. Bunlar arasında elektron transport zinciri esnasında oluşan doğal oksijen kaynaklı radikaller, Haber-Weis ve Fenton reaksiyonları ile meydana gelen radikaller, katekolaminler tarafından radikal üretimi, eikosonoid metabolizması ve nitrik oksit yolu ile oluşan radikaller sayılabilir. Ksantin oksidaz aracılığıyla radikal üretimi de oldukça önemli bir kaynaktır (68). Reperfüzyon iki ucu

keskin bir bıçak gibidir. Organın normal metabolik fonksiyonuna devam edebilmesi için oksijene, yani reperfüzyona ihtiyacı vardır. Fakat oksijenin iskemik bölgeye yeniden girişi serbest oksijen radikallerine (SOR) bağlı olarak doku hasarına neden olur (61). Bu radikallerin oluşumu iskemi sırasında özellikle hipoksantin-ksantin yolu ile olmaktadır. Bunlar iskemik period sırasında üretilip biriken adenin nükleotidleridir. Anoksik durumda NAD^+ kullanan ksantin dehidrogenaz enzimi ksantin oksidaza döner. Bu da oksijen metabolitlerinin üretimi ile sonuçlanır. Ksantin oksidaz elektron alıcısı olarak oksijeni kullanarak hipoksantin ve ksantini ürik aside çevirir. Bu reaksiyon sırasında süperoksit anyonu oluşur. Bunlar da doku hasarına yol açan daha toksik oksijen metabolitlerine çevrilirler. Veya süperoksit radikali demir ve bakır serbest radikallerine çevrilebilir. Bu demir radikali de doku hasarı yapabilmektedir (61,68). Tüm bunların dışında nötrofiller de serbest oksijen radikallerinin potansiyel kaynaklarından biridir. Normalde fagositoz sırasında nötrofiller NADPH oksidaz enzimiyle süperoksit radikali oluştururlar (11). Hücre hasarında oksijenin rolü şekil 2.4'de gösterilmiştir.



Şekil 2.4 Hücre hasarında oksijenin rolü (62)

2.4.1.2. LİPİD PEROKSİDASYONU

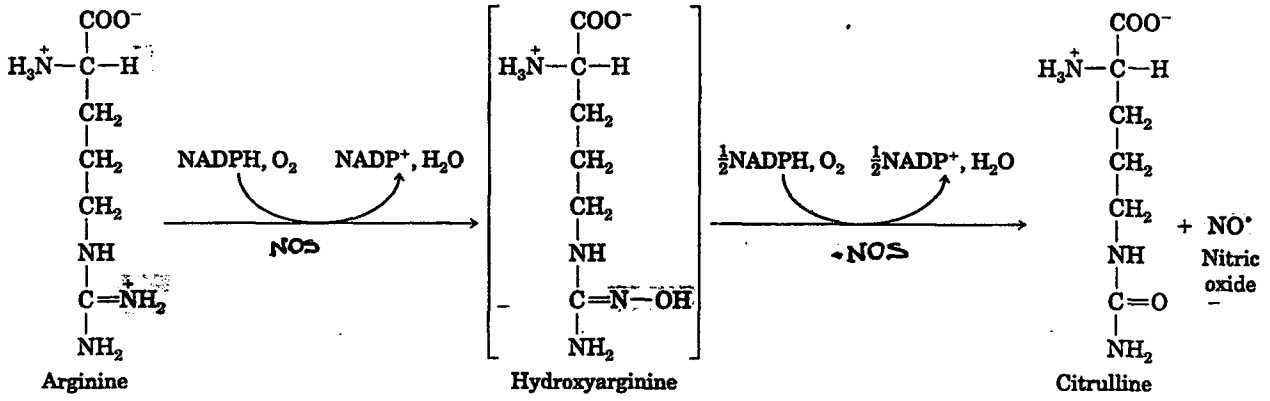
Serbest oksijen radikallerinin İR hasarındaki en büyük hasarlandırıcı etkileri lipid peroksidasyonu üzerinedir. Lipid peroksidasyonu kuvvetli bir radikal olan hidroksil radikali etkisiyle, zar yapısında bulunan fosfolipidlerde mevcut poliansature yağ asidi zincirindeki alfa metilen gruplarından (PUFA) (örneğin araşidonik asit veya

linolenik asit) bir hidrojen atomunun uzaklaşması ile başlamaktadır. Böylece bir yağ asidi zinciri radikal niteliği kazanır. Oluşan lipid radikali (L.) dayanıksız bir bileşik olup bir dizi değişikliğe uğramaktadır. Öncelikle molekül içi çift bağ aktarılması ile dien konjugatları oluşmaktadır. Daha sonra lipid radikallerinin moleküler oksijenle reaksiyona girmesi sonucu lipid peroksit radikali (LOO.) oluşmaktadır. Bu lipid peroksit radikali de zar yapısındaki diğer bir poliansature yağ asidini etkileyerek yeni bir lipid radikalinin oluşumunu sağlamakta, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksitlerine dönüşmektedir. Böylece reaksiyonun otokatalitik bir biçimde yürümesi sağlanmaktadır. Lipid peroksidasyonu lipid hidroperoksitlerinin aldehit (MDA: Malondialdehit) ve diğer karbonil bileşiklerine dönüşmesi ile sona ermektedir (68).

Lipid peroksidasyonu membranın iyonlara geçirgenliğini artırır. Membran reseptör ve enzimleri gibi transmembran proteinlerinde hasar oluşturur (68). Lipid membranın destrüksiyonu hücrede iyon ve enzim imbalansına neden olur, bu da Ca^{++} akımına, hücre ödemi ve nekroza yol açar (61).

2.4.1.3. NİTRİK OKSİTİN ROLÜ

Nitrik oksit (.NO) eşlenmemiş tek bir elektron içeren bir serbest radikaldir. NO radikali intra ve intersellüler haberci olarak karşımıza çıkmaktadır. NO radikali endotel türevi gevşeme faktörü ile özdeştir (68). NO oksijen ve L-argininden Nitrik oksit sentaz (NOS) ile oluşur (Şekil 2.5)(69). NOS enzimi FAD, FMN, Heme, Ca^{+2} , calmodulin ve 6 (R)- tetra-hidro-L- biopterin (BH_4) kofaktörlerine ihtiyaç duyan bir enzimdir. Bu enzimin çeşitli izoformları vardır. Nöronal form (n NOS, NOS-1, Tip I) Ca^{+2} bağımlı bir enzimdir ve nöral doku ile iskelet kasında bulunur. İndüklenebilir form (i NOS, NOS-2, Tip II) sitokin veya endotoksin aktivasyonuna cevap olarak hücre ve dokudan salınır. Normal koşullar altında Ca^{+2} bağımlı değildir. Üçüncü form olan endotelial form (e NOS, NOS-3, Tip III) Ca^{+2} bağımlıdır. Nöronal formundan farkı boyut olarak daha küçük oluşudur. İlk olarak vasküler endotel hücrelerinde bulunmuştur (70). e NOS fizyolojik dozlarda toksik değil iken, Ca^{++} bağımsız indüklenebilir formu olan i NOS formu toksiktir. İskemi ve sepsiste i NOS aracılığı ile salınan NO yüksek miktarlarda iken toksiktir (68).



Şekil 2.5 Nitrik oksit biyosentezi (69)

NO süperoksit anyon radikali ile reaksiyona girerek peroksinitrite dönüşebilmektedir. Ancak NO bir yandan süperoksit anyon radikalini temizlerken diğer yandan oluşan peroksinitrit potent bir oksidandır. Peroksinitrit hücre membranında lipid peroksidasyonunu başlatarak hücre hasarı yapmaktadır (68). Protein tirozin rezidülerinin nitrasyonuna neden olarak protein yapısını bozmaktadır. Bu şekilde oluşan nitrotirozin de oksidatif stresin önemli göstergelerindedir (70).

NO etkisini cGMP yolu üzerinden göstermektedir. Ca^{++} arjininden NO sentezini indükler. NO ise GTP 'den cGMP oluşumunu artırır. cGMP inaktif protein kinazları aktive eder ve düz kaslarda gevşemeye neden olur. NO oldukça kısa bir yarı ömre sahip olduğundan süratle nitrit (NO_2) ve nitrata (NO_3) dönüşmektedir (68).

NO angiogenez ve hücre sel migrasyonu sağlar. Yarada kollajen depolanması ve kollajen çapraz bağlarını arttırarak yara iyileşmesini hızlandırır. Sitozolik guanilat siklaz ve cGMP aracılı vasodilatasyon yapar. Platelet agregasyon inhibisyonu ile antiatherojenik rolü vardır. Endotelial lökosit hücre adezyonunu inhibe eder. Lökosit adezyon, aktivasyon ve kemotaksisinin endojen inhibitörüdür. Endotel proliferasyonu ve apoptozisi modüle eder. Sellüler immünomodülasyon ve bakteriyel sitotoksiteyi artırır. Nörojenez ve fonksiyonel tamirde rol oynar ve nöronal hasardan korunmada önem taşır (70).

Miyokardiyal IR hasarında iNOS artışı ve eNOS azalışı izlenmiştir (71). Nitrik oksitin IR sırasında oluşan reaktif oksijen radikallerini temizlediği düşünülmektedir

(72). Bu nedenle İR hasarında ise NO inhalasyon ve İV olarak denenmiştir ve oksijenlenmenin düzeldiği gözlenmiştir. Adezyon molekül salınımını, nötrofil aktivasyonu ve kemotaksisini inhibe edici etkisi nedeniyle İR hasarında denenmektedir (61,73,74,75).

2.4.1.4. NÖTROFİLLERDEKİ DEĞİŞİKLİKLER

İskemi reperfüzyon hasarında primer mediatörler serbest oksijen radikallerinin yanında nötrofillerdir. SOR hücrel hasar ile ilgili olan nötrofil ve sitokinlerin üretimine neden olurlar. Bu, organizmanın savunmasına yönelik aktivasyon ise iskemi reperfüzyonda ek bir hasar oluşturmaktadır (61). Nötrofiller burada hücre adezyonuna neden olarak, mekanik olarak kapillerleri tıkayıp akımı bozarak, litik enzimler sekrete ederek, proinflamatuvar sitokinleri amplifiye ederek ve bizzat kendileri radikal oluşturarak etki ederler (76).

İskemi reperfüzyonda nötrofillerin aracı olduğu hasarda adezyon moleküllerine bağlanmaları önemlidir. Nötrofillerin aktivasyonu ile salınan sitokinler adezyon moleküllerinin salınımını artırırlar (61). Son yıllarda İR hasarında adezyon moleküllerinin rolü üzerinde durulmaktadır. Bu lökosit aracılı doku hasarında mekanizmalar şöyle özetlenebilir; Mikrovasküler oklüzyon, sitotoksik enzimlerin salınışı, artmış vasküler permeabilite ve endotel fonksiyon bozukluğu, SOR salınışı, sitokin salınımının artışı, endotel hasarına bağlı NO yapımının azalması ve böylelikle endotel-lökosit adezyonunu inhibe edici etkisinin ortadan kalkması, aktive nötrofillerden vasokonstrüktör etkili arasıdonik asit metabolitlerinin üretilmesi olarak sıralanabilir (63,77,78).

2.4.2. ADEZYON MOLEKÜLLERİ VE FİBRONEKTİN

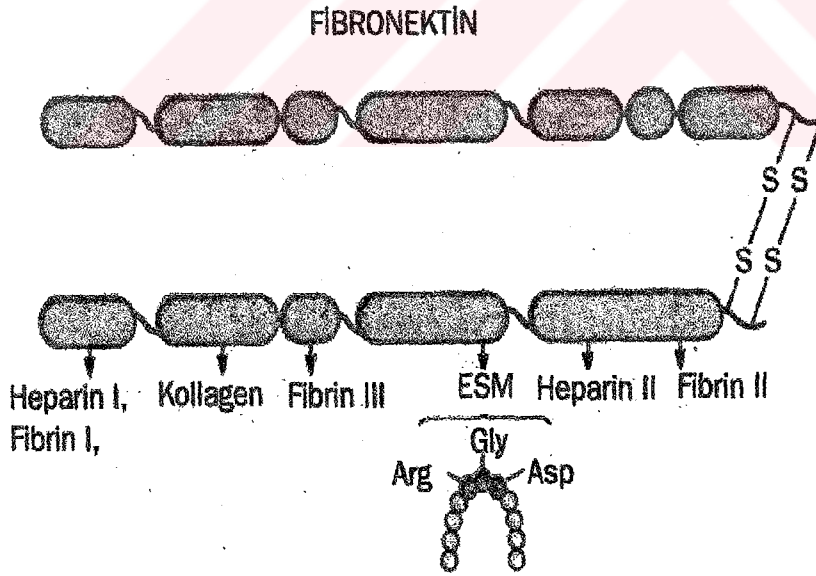
Hücreler nasıl etkileşirler? 1980'lerden itibaren bu soru üzerinde çalışmalar yapılmış ve bunun hücreden sentezlenen ürünlere bağlı multisellüler bir olay olduğu düşünülmüştür (79). 1990'larda ise bu soru üzerinde yapılan çalışmalar hücre-hücre adezyonu ve intrasellüler sinyal üretimine doğru yönelmiştir (79). Hücre biyolojisinde hücrelerin invivo olarak bağlanma ve yayılmaları, invitro olarak ise çoğalma ve farklılaşmış özelliklerini eksprese edebilmeleri için yapışabilme fonksiyonları önemli

olmaktadır (80). Hücrelerin birbirlerine ve ekstrasellüler matrikse (ECM) bağlanmaları embriyogenez, gelişim, kanser ve metastaz, iskemi reperfüzyon hasarı, inflamasyon ve immün yanıt gibi pek çok olayda kritik rol oynamaktadır (79).

Lökosit adezyon molekülleri lökosit ve diğer hücrelerden salınırlar ve pek çok lökosit fonksiyonunu düzenlerler. Lökositlerin inflame dokuya emigrasyonları özgül adezyon moleküllerini de içine alan çok basamaklı bir olaydır. Dokuya göç edebilmek için lökositler öncelikle vasküler endotele bağlanırlar. Bu ilk bağlanma oldukça gevşektir ve adezyon moleküllerinin Selektin ailesi ve onun ligandlarınca kontrol edilir. Daha sonra lökositlerin aktivasyonu ve endotel aracılığı ile İntegrin ailesi ve onun reseptörleri (ICAM-1) ile daha sıkı bağlanma oluşur. Lökositlerin transmigrasyonu son aşamadır, endotel hücreler arasından geçen lökositler doku hasarının olduğu ekstrasellüler matrikse yönelirler, burada ise sitokinlerin önderliğinde ilerlerler. Ekstrasellüler matrikste diğer adeziv moleküllerce (fibronektin gibi) bağlanarak işlev görürler. Epitelyal ve mezenkimal hücrelerdeki önemli adesiv makromoleküller fibronektin, vitronektin, entaktin, fibriler kollajenler (tip 1,2,3,5 ve 11) ve bazal membranlardaki tip 4 kollajendir. Bu bileşenler bir takım integrinler, heparan sülfat gibi proteoglikanlar ve diğer hücre yüzey reseptörleri ile ilişki içindedirler. Bu adesiv moleküllerden birisi olan fibronektin özellikle yara iyileşmesi ve sınır rejenerasyonu ile ilgilidir (63,80,81).

Reperfüzyondan sonraki ilk 2-5 dakika içinde endotel disfonksiyonu olur. 10-20 dk içinde ise etkilenen alandaki endotel yüzeyinde P-selektin upregülasyonu oluşur. Bu da polimorfonükleer lökositlerin (PMNL) disfonksiyonel ve selektin düzeyi artmış olan endotele gevşek ve reversibl olarak bağlanmalarına yol açar. Bu noktada olaylar yavaşlar ve PMNL'in kademeli infiltrasyonu oluşur (74). 20 dk'dan sonra intrasellüler depolardan hızla mobilize olan P-selektin internal degradasyona uğrayarak azalır ve L-selektin en önemli mediatör haline gelir (63). Lökositlerin kademeli infiltrasyonu özellikle reperfüzyondan 180 dk sonra belirgindir. 270 dk'da ise reperfüzyon hasarının sonucu olan doku nekrozu oluşmaktadır (74). Bu endotel disfonksiyonunda PMNL infiltrasyonu aşamasına kadar olan dönemde P ve L-selektin anahtar görevi yapmaktadır (74). Diğer bir selektin ailesi üyesi olan E-selektin ise özellikle ilk 4 saatlik postreperfüzyonda majör rol oynamaz. 6. saatten sonraki yanıtlarda aktiftir(74).

Fibronektin, ekstrasellüler matriksdeki (ECM) nonkollajen adeziv proteinlerdendir. ECM'yi hücre yüzeyine bağlar. Glikoprotein yapısındadır ve molekül ağırlığı 500kD'dır. Karboksi terminal bölgelerinden bir çift disülfid bağı ile bağlı 2 büyük subünitten oluşan dimerdir. Her subünit ise farklı işlevlere sahip fleksible domainlerden oluşur. Örneğin kollajen, heparin, hücre bağlayıcı domainler. Hücre bağlayıcı domainde spesifik bir tripeptit dizisi belirlenmiştir (RGD; Arjinin-glisin-aspartik asit). Eğer bu peptitler solid yüzeye bağlanırlarsa hücrelerin buraya bağlanmalarını sağlarlar. Bu üçlü peptit (integrin reseptörü) fibronektine özel değildir. Diğer ECM proteinlerinde de vardır. Fibronektin 50 ekzonlu tek bir gen tarafından kodlanır. Özellikle konnektif dokularda fazladır. Plasma fibronektini ve fibronektin filamanları gibi çeşitli formlarda bulunur. Plasma fibronektini solubildir ve kanda ve diğer vücut sıvılarında sirküle olur. Fagositoz, kan pıhtılaşması ve yara iyileşmesinde rol aldığı düşünülmektedir. Fibronektin filamanları ise unsolubildir ve fibronektinin hücre yüzeyi ve matrikste yer alan formudur. Fibronektinin üç tipi vardır. Tip 1'de 45, Tip 2'de 60, Tip 3'de 90 aminoasit vardır. Tip 1 ve 2'de iki adet disülfid bağı varken, Tip3'de disülfid bağı yoktur (82,83). Şekil 2.6'da fibronektinin yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2.6 Fibronektinin yapısı (78)

Fibronektin hücre adezyonu, hücre göçü ve tümör invazyonunda rol alır. Fibrinojen, kollajen, glikozaminoglikan (heparan sülfat) gibi ECM bileşenlerine bağlanarak adeziv olayları başlatır (82,83). Ayrıca diğer görevleri arasında inflamasyon, yara iyileşmesi ve sinir rejenerasyonu da vardır. Travma sonrası kan beyin bariyerinin yıkıldığı ve serebral ödemin olduğu durumda NOS aktivitesinin arttığı ve ayrıca aynı alanda endojen fibronektin ekstrasvazasyonunun olduğu izlenmiştir (84,85). Periferik sinir tamir sürecinde schwann hücreleri rol almaktadır ve nörit migrasyonunu proksimal-distal yönde ilerletmektedir. Bu sürecin kontakt aşamasında ise fibronektinin rehberlik ettiği düşünülmektedir. Agregat olmuş plazma fibronektini fibroblast, makrofaj, nörit ve schwann hücrelerine bağlanma yetisine sahiptir. Fibronektinin schwann hücrelerinin proliferasyon ve migrasyonunu stimüle eden bir kemoatraktan olduğu gösterilmiştir (86). IR hasarı tedavisinde sentetik fibronektin peptitleri kullanılması denenmektedir. Etki mekanizması tam olarak anlaşılmasa da erken dönemde kullanıldığında PMNL birikiminin azaldığı, infarkt alanının küçüldüğü ve nörolojik disfonksiyonun azaldığı izlenmiştir (87,88).

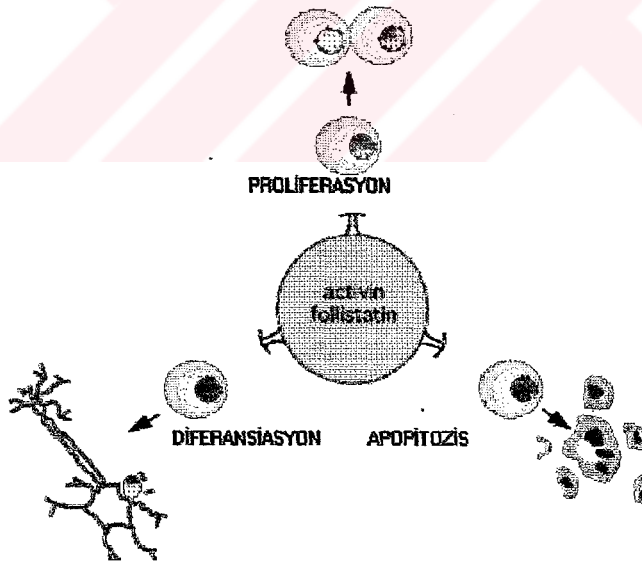
2.4.3. TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β (TGF- β) SÜPER AİLESİ

TGF- β süper ailesi sitokinlerin geniş bir grubunu oluşturan bir ailedir. Ailenin üyeleri arasında Aktivin, TGF- β 1,2,3, İnhibin, Kemik morfojenik protein, Drosophila dekapentaplejik gen ürünü, Müllerian duct inhibiting substance, Vg- ilişkili gen ürünleri vb. sayılabilir. Bu ailedeki üyeler yapısal olarak benzer, fonksiyonel olarak farklı etkili büyüme faktörleridir. Bu aile, sitokin reseptörlerinin kinaz aktivitesi gösteren grubuna dahil olan serin-treonin kinaz reseptörleri üzerinden aktivite gösterirler. Aile üyeleri büyüme ve farklılaşmanın önemli taşıyıcılarıdır. Memelilerde embriyogenez sırasındaki temel vücut planının ayarlanmasında rol alırlar. Örneğin, nöral tüp, kartilaj, kemik ve seksüel organların oluşumunun kontrolü; yara iyileşmesinin tetiklenmesi; ve immün ve endokrin fonksiyonların kontrolü gibi. İnsanlarda ayrıca fibrozis, immunosupresyon, kanser ve diğer bozukluklarla ilişkilidirler (19,89).

2.4.3.1. AKTİVİN

Aktivinler TGF- β süper ailesine dahil olan dimerik proteinlerdir. İlk kez 1986 yılında folliküler sıvıdan izole edilmiş olan ve hipofizer follikül stimüle edici hormon (FSH) sentez ve sekresyonunu stimüle eden gonadal proteinlerdir. İlk bulduklarında bilindiğinden farklı olarak sadece over ve testislerden değil diğer dokulardan da sentezlenirler. Reprodüktif aksı regüle eden parakrin ve otokrin faktörler gibi fonksiyon gösterirler. Aktivin mRNA ekspresyonu çok çeşitli dokularda izlenir ki bunlar plasenta, hipofiz, adrenaller, dalak, kemik iliği, ve beyin spesifik bölgeleri gibidir. Bu dokulardaki farklı biyolojik fonksiyonları nedeniyle aktivin büyüme faktörü ve sitokin rolü üstlenir (19).

Aktivinlerin üç farklı formu mevcuttur. Bunlar; Homodimerik aktivin A ($\beta A \beta A$), Homodimerik aktivin B ($\beta B \beta B$) ve Heterodimerik aktivin AB ($\beta A \beta B$) şeklindedir. βC , βD ve βE zincirleri 1997 yılında tanımlanmıştır (18). Pek çok çalışmada Aktivin A, AB, ve B şeklindeki bu üç izoform arasındaki farklılıklar tarif edilmesine rağmen benzer aktivitelere sahip bulunmuşlardır. Yine de her varyantın spesifik fonksiyonları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (18). Aktivinın önemli fonksiyonları şekil 2.7’de gösterilmiştir (90).



Şekil 2.7 Aktivinın fonksiyonları (90)

Aktivinın biyolojik aktivitesi iki farklı tip reseptörden oluşan bir heterodimerik reseptör kompleksi üzerinden gerçekleşir; 1) Tip I reseptör (AR I ve AR Ib), 2) Tip II reseptör (AR II ve AR II b). Bu reseptörler intrasellüler serin-treonin kinaz aktivitesi

gösterirler. Bu transmembran reseptörlerinin yanı sıra solubl aktivin bağlayıcı bir protein olan follistatin aktivine bağlanarak onun biyolojik etkilerini inhibe eder (18).

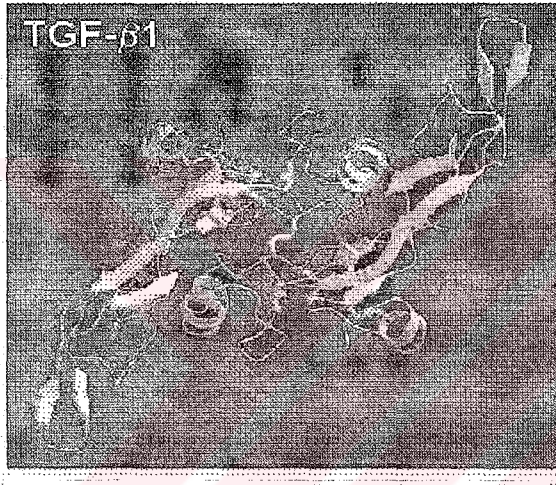
Aktivinlerin hedef hücredeki etkileriyle ilgili olarak yapılmış çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda aktivinlerin büyüme ve farklılaşmadaki, organojenezdeki, inflamatuvar olaylardaki ve yara iyileşmesindeki rollerinden söz edilmektedir (18). İnvitro ve invivo çalışmalar aktivinin keratinosit proliferasyon ve/veya diferansiasyonunun regülasyonunda rolü olduğunu belirtmektedir. Ayrıca aktivin normal rat böbrek fibroblastlarında kollajen tip1 mRNA düzeylerini arttırmaktadır. Bu bulgular dermis ve epidermisteki yara iyileşmesinde aktivinin rolü olduğunu göstermektedir (18). Mezenkimal kompartmanda aktivin ekstrasellüler matriks moleküllerinin indükleyicisi gibi davranmaktadır. Özellikle embriyonik 3 T₃ fibroblastlarda aktivinin fibronektin ekspresyonu üzerine stimulatör etkisi gösterilmiştir (18). Aktivin ekspresyonu pek çok dokuda proinflamatuvar sitokinlerle stimule edilmektedir. Bu ise aktivinin antiinflamatuvar aktivitedeki rolüne işaret etmektedir (18). Birçok akut beyin hasarı modelinde, çeşitli orijinlerdeki akut nöronal hasara yanıt olarak yüksek aktivin A ekspresyonunun olduğu gösterilmiştir (91). İskemik hasar ve mekanik irritasyona yanıt olarak aktivin A indüklenmektedir. Özet olarak, aktivin çeşitli doku ve organlarda inflamasyon ve tamir olaylarında rol alır. İnvitro çalışmalar mezankim ve olasılıkla epitel tamirindeki etkisini göstermektedir. Ayrıca nöroprotektif etkileri mevcuttur. Aktivin A hasarlı nöronlarda yaşam süresini modüle eder ve indüklenmesiyle travmatik beyin hasarına karşı nöroprotektif etki gösterir (18,19,91,92).

2.4.3.2. TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β (TGF- β)

Aktivinler gibi transforming growth factor- β süper ailesinin üyesidirler. Beta 1, 2, 3, 1.2, 1.3 olmak üzere beş adet izoformu vardır. Memelilerde ise β 1,2, ve 3 tespit edilmiştir. Bu izoformların matür polipeptitleri 112 aminoasit içerir ve birbirleriyle % 80 oranında dizi homolojileri vardır ve benzer biyolojik aktiviteleri mevcuttur (20). Şekil 2.8'de TGF- β 1'in yapısı gösterilmiştir (93).

Üç tip TGF- β reseptörü tanımlanmıştır. Bunlar, Tip I, II, III şeklindedir. Tip I reseptörü tüm normal hayvan hücrelerinde tespit edilmiştir. Tip II reseptörü

klonlanmıştır ve bir serin- treonin kinazdır. Tip III reseptörü de klonlanmıştır ve bir membran betaglikandır. Tip III reseptörün direkt olarak TGF- β sinyal transdüksiyonu ile ilişkisi yoktur (20). Tip I ve II ise direkt olarak sinyal transdüksiyonu ile ilgilidir (21). Sinyalizasyonda Tip I ve II reseptörlerin rolleri şöyledir ki; TGF- β direkt olarak Tip II reseptörüne bağlanır. Tip II reseptörü ise aktif bir kinazdır ve bu bağlanma reseptör I tarafından algılanır. Tip I reseptörleri Tip II reseptörlerinin yokluğunda ligandlarına bağlanamazlar. Tip II reseptörler ise farklı Tip I reseptör izoformlarına bağlanabilirler. Aynı olasılıklar aktivin reseptörleri için de geçerlidir. Hücre tiplerine göre liganda verilen biyolojik cevabın spesifitesi kompleksteki Tip I reseptöre göre değişir. Bu da sitokinlerin multifonksiyonel doğasının temelini oluşturmaktadır (89).



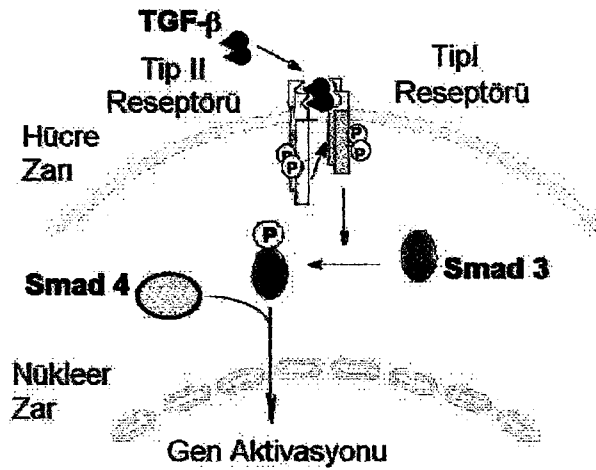
Şekil 2.8 TGF- β 1'in yapısı (93)

TGF- β süper ailesinin ligandlarından gelen sinyaller serin-threonin kinaz reseptörlerince aktive edilen Smad proteinleri tarafından dönüşüme uğrarlar. Bu reseptörce aktive olan Smad proteinlerinin fosforilasyonu ise hücre çekirdeğinde gen regülasyonunu uyarır (94). Smad proteinlerinin de yer aldığı TGF- β sinyal iletimi şekil 2.9'da gösterilmiştir.

TGF- β dokularda geniş bir varyasyon gösterir. Kompleks multifonksiyonel biyolojik etkileri vardır; TGF- β bir mitojen, morfojen olabileceği gibi hücre tipi ve hücre farklılaşmasına bağlı olarak inhibitör de olabilir. Neoplastik olmayan dokularda genellikle epitelyal hücreleri inhibe ederken, mezenkimal hücreleri stimüle eder. Anjiojenez ve ekstrasellüler matriks formasyonunu tetikler ve immun sistemi suprese

eder. Ayrıca hücre adezyonu ve hücresele farklılaşmayı regüle eder. Bu özellikleri nedeniyle TGF- β embriyojenez, yara iyileşmesi için önemlidir ve kanser gelişimiyle ilgisi mevcuttur (20). TGF- β hücre siklusuna etki eder ve kollajen, fibronektin, hücre yüzey integrinleri gibi pek çok ECM bileşeninin potent indükleyicisidir (21). Bunların yanı sıra fibroblast, monosit ve makrofajlar için kemotaktiktir (95). Yapılan bir çalışmada lokalize serebral hasar sonrasında rat beyinde skar alanında artmış TGF- β 1 ekspresyonu izlenmiştir. Çünkü TGF- β hasar, inflamasyon ve fibrozis arasındaki bağlantıyı uyarır. Doku hasarı sonrasında aktive makrofajlarca salınan TGF- β kollajen sentez ve yıkımı arasındaki dengeyi sağlar (95).

İskemi reperfüzyon hasarının patofizyolojik mekanizması halen anlaşılamamıştır. TGF- β 'nın farklı organ sistemlerinde IR hasarına karşı koruyucu olduğu gösterilmişse de TGF- β aktivitesinin bu olaydaki regülasyonu hakkında bilgiler azdır. Kan damarlarında ve cilt fibroblastlarında akut iskemik koşullarda TGF- β reseptörleri ve TGF- β 1 belirgin olarak artar. TGF- β aktivitesi iskemik koşullar altında artar ve bunun iskemik hasara karşı adaptif bir yanıt olduğu düşünülmektedir (96). Myokardial IR hasarında da TGF- β artışı gösteren yayınlar mevcuttur. Özellikle myokard infarktüsünün ilk günlerinde TGF- β 1 ve β 2 artmaktadır (71, 97). Aktivinde olduğu gibi TGF- β 'nın da nöroprotektif etkisi mevcuttur (98).



Şekil 2.9 TGF- β sinyal iletimi (99)

3. ARAÇ, GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. ARAÇ VE GEREÇLER

3.1.1. DENEY TASARIMI VE CERRAHİ PROSEDÜR

Bu çalışma Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma Merkezi Deneysel Hayvanları Laboratuvarında yapılmıştır. Deneysel hayvanı olarak, farklı gruplar altında ortalama ağırlıkları 300 gram olan 72 adet Albino rat kullanılmıştır. Ratlar Kayseri Erciyes Üniversitesi Araştırma ve Deneysel Hayvanları Laboratuvarından sağlanmıştır. Deneysel hayvanları oda ısısında (24° C), ayrı ayrı kafeslerde tutularak ve aynı gıdaları içeren diyet ve su ile beslenmişlerdir.

Anestezi intramusküler yoldan verilen 50 mg/ kg dozda Ketamin Hidroklorür (Ketalar, 50 mg/ml, Eczacıbaşı ilaç sanayii, İstanbul, Türkiye) ile gerçekleştirilmiştir.

3.1.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Ayırıcıların hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler analitik kalitede olup, Sigma ve Merck firmalarından temin edilmiştir. Araştırmada kullanılan önemli kimyasal maddeler aşağıda verilmiştir;

Nitrit- Nitrat Ölçümünde Kullanılanlar: Sodyum nitrit, potasyum nitrat.

Malondialdehit (MDA) Ölçümünde Kullanılanlar : 1,1,3,3 tetrametoksi propan , Sodyum dodesil sülfat, Asetik asit , Thiobarbitürik asit, n- butanol, pyridin, doymuş sodyum hidroksit.

TGF- β 1 ve β 2 Ölçümünde Kullanılanlar: Potasyum klorür, Sodyum klorür, Potasyum dihidrojen fosfat, Disodyum hidrojen fosfat, Magnezyum klorür- 6 hidrat, Kalsiyum klorür -2 hidrat, Hidroklorik asit, Sodyum hidroksit, Sodyum bikarbonat, Sodyum karbonat, Tris HCl, ve Triton X.

Fibronektin Ölçümünde Kullanılanlar: İnsan fibronektin antiserumu (Dade Behring) kullanılmış olup, ayrıca kimyasal madde gerekmemiştir.

Aktivin A Ölçümünde Kullanılanlar: Mouse aktivin A immunoassay kiti (R&D systems) kullanılmış olup, ayrıca kimyasal madde gerekmemiştir.

Bunların dışında ayraçların hazırlanmasında distile su (MINI pure SM) kullanılmıştır.

3.1.3. ÇALIŞMADA KULLANILAN CİHAZLAR

Bu çalışma sırasında kullanılmış olan cihazlar aşağıda verilmiştir;

ELISA cihazı	(Organon Teknika Microwell System Reader 230- S)
Microplate yıkama cihazı	(Organon Teknika Microwell System Washer 400)
Nefelometre	(Dade Behring BN 100, Marburg, Germany)
Spektrofotometre	(Varian Cary 50 Bio UV Visible Spectrophotometer)
Santrifüj	(Sigma ultra santrifüj 3 K 30, Nüve NF 800 ve Heraeus Sepatech Labofuge 200)
Benmari (sıcak su banyosu)	(Mettler thermostating fluid- waterbath)
PH metre	(WTW Inolab labor PH-meter)
Etüv	(Nüve EN 500)
Hassas terazi	(Shimadzu AX 120)
Vorteks	(Velp. Scientifica 2x ³)
Distile su cihazı	(MINI pure SM ve Barnstead EASY pure UV)
Derin dondurucu	(Bosch ve Arçelik)
Otomatik pipetler	(Medisis, Gilson)
Multichannel otomatik pipet	(Treff-Lab)
Cam pipetler	(Precicolor HBG, Germany)

3.1.4. ÇALIŞMADA KULLANILAN TESTLER

Çalışmada biyokimyasal analizlerde kullanılan kitler aşağıda belirtilmiştir;

Nitrit- Nitrat Ölçümü : Nitrite / Nitrate colorimetric method (Roche Diagnostics Mannheim, Germany, 1 746 081).

Fibronektin Ölçümü : Human fibronectin N antiserum, OUND 09 (Dade Behring).

TGF- β 1 Ölçümü : TGF β 1 E max immunoassay system 145822 (Promega corporation, Madison, WI, USA).

TGF- β 2 Ölçümü : TGF β 2 E max immunoassay system 143540 (Promega corporation, Madison, WI, USA).

Aktivin A ölçümü: Quantikine M Murine , Mouse Activin A Immunoassay, 0141148 (R & D systems, Minneapolis, MN).

3.1.5. ARAŞTIRMADA KULLANILAN AYIRAÇLARIN HAZIRLANMASI

3.1.5.1. Nitrit – Nitrat Ölçümünde Kullanılan Ayıraçlar :

Nitrit stok standart çözeltisinin hazırlanması:

1 mM Sodyum Nitrit (NaNO_2) stok çözelti hazırlamak için molekül ağırlığı (MA) 69,00 g/mol olan sodyum nitritten 0,0069 g alındı ve distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

Nitrat stok standart çözeltisinin hazırlanması:

72,99 mM Potasyum nitrat (KNO_3) stok çözeltisi hazırlamak için molekül ağırlığı (MA) 101,1 g/mol olan potasyum nitrattan 0,738 g tartıldı ve distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

3.1.5.2. Malondialdehit (MDA) Ölçümünde Kullanılan Ayıraçlar:

MDA stok standart çözeltisinin hazırlanması:

Molekül ağırlığı 164,20 g/mol olan, yoğunluğu 0,997 g/ml olan %99'lük 1,1,3,3 tetrametoksi propan'dan 6,6 µl alınarak 100 ml'ye tamamlandı. +4°C'de buzdolabında saklandı.

% 8,1'lik Sodyum dodesil sülfat (SDS) hazırlanması:

8,1 g SDS bir miktar distile suda çözülerek, yine distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Oda ısısında saklandı.

% 20'lik Asetik asit (PH = 3,5) hazırlanması:

20 ml asetik asit biraz distile su üzerine eklenerek karıştırıldı, ve 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. Daha sonra sodyum hidroksit (NaOH) ile PH'sı 3,5'e ayarlandı. Oda ısısında saklandı.

% 0,8'lik Thiobarbitürik asit (TBA) (PH= 3,5) hazırlanması:

0,8 g TBA bir miktar distile suda çözüldükten sonra 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. Ardından PH'sı NaOH ile 3,5'e ayarlandı. Oda ısısında saklandı.

n-butanol-pyridin solüsyonu (15/1) hazırlanması:

1 ml pyridin üzerine 14 ml n-butanol eklenecek şekilde çalışılan örnek sayısına göre hazırlandı (6 ml pyridin + 84 ml n-butanol şeklinde). Günlük olarak çalışmanın hemen öncesinde hazırlandı.

3.1.5.3. TGF- β 1 Ölçümünde Kullanılan Ayıraçlar:

1 N Hidroklorik asit (HCl) hazırlanması:

Molekül ağırlığı 36,5 g/mol, yoğunluğu 1,19 g/ml olan % 37'lik HCl 'den 82,89 ml alınıp bir miktar distile su üzerine eklendi. Daha sonra distile su ile 1 litreye (L) tamamlandı.

1 N Sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi hazırlanması:

MA = 40 g/mol olan NaOH 'den 40 g alınarak bir miktar distile suda çözüldü ve sonra 1 L 'ye tamamlandı.

DPBS Tamponunun (PBS Dulbecco's Liquid = Dulbecco's phosphate buffer saline) hazırlanması:

0,2 g potasyum klorür (KCl), 8 g sodyum klorür (NaCl), 0,2 g potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), 1,15 g disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) karıştırılarak, 1 L distile suya tamamlandı. 1 N HCL ve/veya 1N NaOH çözeltisi kullanılarak PH 7,35'e ayarlandı. Daha sonra 100 mg magnezyum klorür 6 hidrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) ve 130 mg kalsiyum klorür 2 hidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) eklenip karıştırıldı.

Karbonat kaplayıcı tampon hazırlanması:

0,025 M sodyum bikarbonat (NaHCO_3) hazırlanması: MA = 84,01 g/mol olan NaHCO_3 'den 0,11 g alındı.

0,025 M sodyum karbonat (Na_2CO_3) hazırlanması: MA = 105,99 g/mol olan Na_2CO_3 'dan 0,13 g alındı.

Daha sonra her ikisi karıştırılarak 50 ml'ye distile su ile tamamlandı. Ve ardından PH' ları 1 N HCL veya 1 N NaOH ile 9,7 'e ayarlandı.

TBST (Tris Buffered Saline with Tween) yıkama tamponunun hazırlanması:

20 mM Tris HCl (PH = 7,6) hazırlanması: MA = 157,6 g/mol olan Tris HCl'den 1,576 g alındı.

150 mM NaCl hazırlanması: MA = 58,44 g/mol olan NaCl'den 4,383 g alındı.

Daha sonra her ikisi karıştırılıp 500 ml'ye distile su ile tamamlandı. Ardından 0,05 % (v/v) olacak şekilde 250 µl Triton-X eklenerek tampon hazırlığı tamamlandı. (Çalışmamız sırasında deterjan olarak Tween -20 yerine Triton-X kullanılmıştır.)

3.1.5.4. TGF- β 2 Ölçümünde Kullanılan Ayıraçlar:

TGF- β 1 ölçümünde kullanılan ayıraçların hepsi TGF- β 2 ölçümü için de kullanılmıştır.

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. DENEY MODELİ

Bu deneysel çalışmada yaratılacak periferik sinir iskemi-reperfüzyon hasarı için rat siyatik sinir modeli kullanıldı. Bell'in özellikle rat siyatik siniri kanlanması üzerine yapmış olduğu ayrıntılı çalışmalar ve önceki model arayışları temel alınarak çalışma tasarlandı (45).

Cerrahi girişim öncesi ratlara anestezi için 50 mg /kg ketamin hidroklorür intramusküler olarak uygulandı. Anestezi altındaki denekler tespit edildikten sonra epilatuvar krem kullanılarak sağ ve sol inguinal bölgeleri ile sağ ve sol bacaklarının dorsalindeki kılları alındı. Sonra, operasyon sahası önce cerrahi sabun (Hibisel, Doğu ilaç firması, İstanbul, Türkiye) sonra da povidon-iyot (Batticon, Adeka ilaç sanayii, İstanbul, Türkiye) ile temizlendi ve steril örtü ile kapatıldı. Uyluk iç yüzünden inguinal kıvrıma kadar uzanan bir insizyonla derinleşilerek femoral arter, ven ve sinir bulundu (Şekil 3.1.A). Femoral sinir yaklaşık 1 santimetrelik bir bölümde arter ve venden disseke edildi. Daha sonra iskemi oluşturabilmek amacıyla femoral arter ve veni Yaşargil anevrizma klipsi (Yaşargil anevrizma klipsi, FE 751, Aesculap, Tuttlingen, Germany) ile klempe edildi (Şekil 3.1.B). Böylelikle siyatik sinir ve devamı (peroneal, tibial ve sural dalları) tama yakın iskemik hale getirilmiş oldu (56). Bu şekilde 3 saat iskemide tutulan sinirin klipsler çıkarılarak deney protokolüne uygun sürelerde reperfüze olması sağlandı. Reperfüzyon sürelerinin tamamlanmasının ardından yeniden anestezi uygulan ratların torakotomi ile kalplerine ulaşıldı. Ve kalbe steril enjektörle direkt olarak girilerek intrakardiyak yolla kanları alındı.

3.2.2. DENEY PROTOKOLÜ

Bu deneysel çalışmada her grupta 8 rat olmak üzere 2 kontrol (pozitif ve negatif) ve 7 deney grubundan oluşan 9 farklı grup oluşturuldu. Ratlar deney öncesi gruplara rast gele dağıtıldı.

3.2.2.1. GRUPLAR

Grup I (Kontrol A, normal siyatik sinir (iskemi yok, reperfüzyon yok), n=7): Bu grupta femoral arter ve ven disseke edildi ve klempe edilmedi. 3 saat beklendikten sonra biyokimyasal analizler için ratların intrakardiak olarak kanları alındı. Bu gruptaki ratlardan bir tanesi deney esnasında öldüğünden başlangıçta 8 olan grup içi rat sayısı 7'ye inmiştir.

Grup II (Kontrol B, iskemik siyatik sinir (3 saat iskemi var , reperfüzyon yok), n= 8): Bu grupta femoral arter ve ven disseke edildikten sonra birlikte Yaşargil anevrizma klipsi ile klempe edildi. Klipsler 3 saat tutulduktan sonra açıldı ve reperfüzyona bırakılmadan, hemen, intrakardiak olarak kanları alındı.

Grup III (3 saat iskemi, 1 saat reperfüzyon, n=8): Bu grupta femoral arter ve ven disseke edildikten sonra birlikte Yaşargil anevrizma klipsi ile klempe edildi. Klipsler 3 saat tutulduktan sonra açıldı ve 1 saat süreyle reperfüzyona izin verildi. Reperfüzyon süresinin tamamlanmasının ardından intrakardiak olarak kanları alındı.

Grup IV (3 saat iskemi, 2 saat reperfüzyon, n=8): Bu grupta femoral arter ve ven disseke edildikten sonra birlikte Yaşargil anevrizma klipsi ile klempe edildi. Klipsler 3 saat tutulduktan sonra açıldı ve 2 saat süreyle reperfüzyona izin verildi. Reperfüzyon süresinin tamamlanmasının ardından intrakardiak olarak kanları alındı.

Grup V (3 saat iskemi, 24 saat (1 gün) reperfüzyon, n=8): Bu grupta femoral arter ve ven disseke edildikten sonra birlikte Yaşargil anevrizma klipsi ile klempe edildi. Klipsler 3 saat tutulduktan sonra açıldı ve 24 saat süreyle reperfüzyona izin verildi. Reperfüzyon süresinin tamamlanmasının ardından intrakardiak olarak kanları alındı.

Grup VI (3 saat iskemi, 7 gün (1 hafta) reperfüzyon, n=8): Bu grupta femoral arter ve ven disseke edildikten sonra birlikte Yaşargil anevrizma klipsi ile klempe edildi. Klipsler 3 saat tutulduktan sonra açıldı ve 7 gün süreyle reperfüzyona izin

verildi. Reperfüzyon süresinin tamamlanmasının ardından intrakardiak olarak kanları alındı.

Grup VII (3 saat iskemi, 14 gün (2 hafta) reperfüzyon, n=8): Bu grupta femoral arter ve ven disseke edildikten sonra birlikte Yaşargil anevrizma klipsi ile klempe edildi. Klipsler 3 saat tutulduktan sonra açıldı ve 14 gün süreyle reperfüzyona izin verildi. Reperfüzyon süresinin tamamlanmasının ardından intrakardiak olarak kanları alındı.

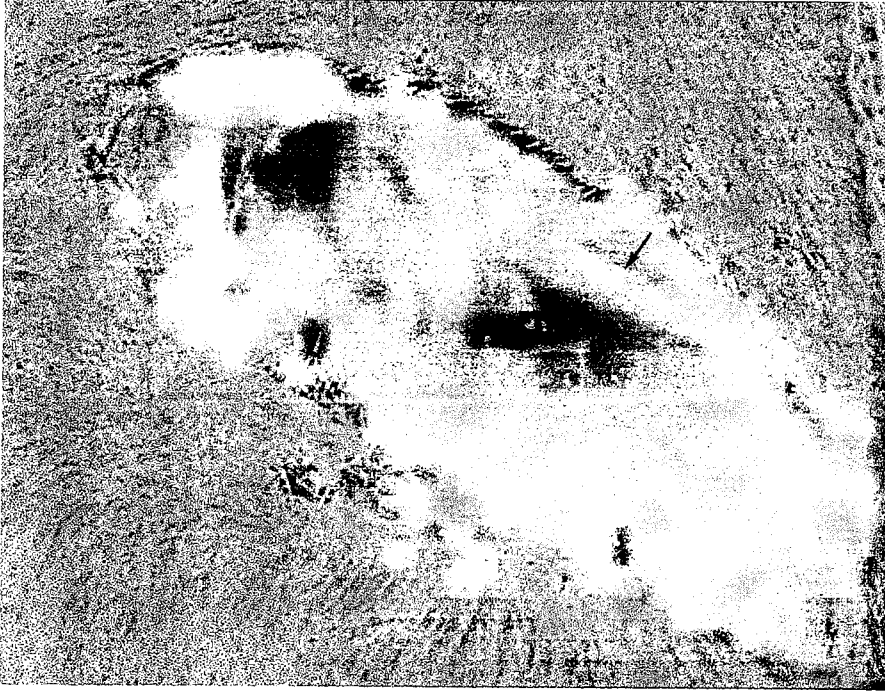
Grup VIII (3 saat iskemi, 21 gün (3 hafta) reperfüzyon, n=8): Bu grupta femoral arter ve ven disseke edildikten sonra birlikte Yaşargil anevrizma klipsi ile klempe edildi. Klipsler 3 saat tutulduktan sonra açıldı ve 21 gün süreyle reperfüzyona izin verildi. Reperfüzyon süresinin tamamlanmasının ardından intrakardiak olarak kanları alındı.

Grup IX (3 saat iskemi, 28 gün (4 hafta) reperfüzyon, n=8): Bu grupta femoral arter ve ven disseke edildikten sonra birlikte Yaşargil anevrizma klipsi ile klempe edildi. Klipsler 3 saat tutulduktan sonra açıldı ve 28 gün süreyle reperfüzyona izin verildi. Reperfüzyon süresinin tamamlanmasının ardından intrakardiak olarak kanları alındı.

İskemi ve reperfüzyon periyotlarını gösteren çalışma şeması Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge3.1. Deneý tasarımı (Kontrol, iskemi ve iskemi + reperfüzyon grupları ve süreleri)

GRUPLAR	İSKEMİ	İSKEMİ SÜRESİ	REPERFÜZYON	REPERFÜZYON SÜRESİ
I	-	-	-	-
II	+	3 SAAT	-	-
III	+	3 SAAT	+	1 SAAT
IV	+	3 SAAT	+	2 SAAT
V	+	3 SAAT	+	24 SAAT (1 GÜN)
VI	+	3 SAAT	+	7 GÜN (1 HAFTA)
VII	+	3 SAAT	+	14 GÜN (2 HAFTA)
VIII	+	3 SAAT	+	21 GÜN (3 HAFTA)
IX	+	3 SAAT	+	28 GÜN (4 HAFTA)



A



B

Şekil 3.1 Femoral damarların ve sinirin anatomisi. A- İskemi öncesi. B- İskemi anında (Kalın ok femoral arter ve veni, ince ok ise femoral siniri göstermektedir).

3.2.3. BİYOKİMYASAL ANALİZLER

3.2.3.1. ÖRNEKLERİN HAZIRLANMASI

Deney esnasında intrakardiak olarak alınan kanlar bekletilmeden 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj (Heraeus Labofuge 200, Nüve NF 800) edildi ve serumları ayrıldı. Bu serumlar porsiyonlanarak steril düz biyokimya tüplerine konuldu. Serumlar çalışmalar başlayana kadar - 20°C'de derin dondurucuda saklandı. Çalışma öncesi oda ısısına getirilerek kullanıldı.

Diğer çalışmalardan farklı olarak, TGF- β 1 ve TGF- β 2 analizlerinde örneklere asitle muamele prosedürü (acid treatment procedure) uygulandı. Çalışmada kullanılan kit (TGF β 1 E max immunoassay system 145822 (Promega corporation, Madison, WI, USA) ve TGF β 2 E max immunoassay system 143540 (Promega corporation, Madison, WI, USA) immunoreaktif olan biyolojik olarak aktif miktarları ölçmek için tasarlanmış olduğundan , total miktarları ölçebilmek amacıyla bu işlem uygulandı. Bu prosedüre göre örnekler ayıraçların hazırlanması aşamasında anlatılan (Bkz. 3.1.5.3 ve 3.1.5.4) DPBS tamponu ile 1/5 oranında dilüe edildi. Daha sonra 100 μ l örnek başına 2 μ l 1 N HCl eklendi. Bu esnada pH'nın 3 ve altında olup olmadığı kontrol edildi. İyice karıştırılan örnekler 15 dakika oda ısısında inkube edildi. Ardından yine 100 μ l örnek başına 2 μ l 1 N NaOH eklenerek nötrale edildi. Ve pH'nın yaklaşık olarak 7,6 olup olmadığı kontrol edildi.

3.2.3.2. NİTRİT- NİTRAT ÖLÇÜMÜ

Bu çalışmada nitrit ve nitrat ölçümleri nitrit-nitrat kolorimetrik assay kiti (Nitrite / Nitrate colorimetric method, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany, 1 746 081) kullanılarak yapıldı.

3.2.3.2.1. Prensip:

Nitrojen monoksit biyolojik sıvılarda nitrit olarak tespit edilmektedir. Örnekte mevcut olan nitrat ise NADPH varlığında nitrat redüktaz (NR) enzimiyle nitrite redüklenir.



Oluşan nitrit ise sülfanilamid ve N-(1-naftil)-etilendiamin dihidroklorid ile reaksiyona girerek kırmızı viole diazo boyası meydana getirir. Oluşan bu rengin şiddeti ise spektrofotometrik olarak, 540 nm dalga boyunda ölçülür.

3.2.3.2.2. Örneklerin ve Reaktiflerin hazırlanması:

Örneklerin hazırlanması: 150 µl serum örneği yine 150 µl kit içerisinde hazır olarak bulunan potasyum fosfat tamponu (PH= 7,5) ile 1 ml kapasiteli ependorf tüpleri içerisinde karıştırıldı. Daha sonra bu örnekler ultrasantrifüjde (Sigma 3K 30) 4200 rpm'de 45 dakika santrifüj edildi.

Koenzim tabletlerinin hazırlanması: Her birinde 0,5 mg NADPH ve 0,01 mg FAD içeren tabletler potasyum fosfat tamponu ile steril bir düz biyokimya tüpü içerisinde çözüldü. 3 adet tablet için 1 ml tampon kullanılacak şekilde bu miktar örnek sayısına göre ayarlandı. Bu işlem çalışmadan hemen önce yapıldı.

Nitrat redüktaz hazırlanması: 4 ünite liyofilize enzim içeren bir şişe 0,6 ml redistile su ile çözüldü. Enzim çözünmüş şekli ile +4°C'de 2 hafta dayanabilmektedir.

Sülfanilamid ve N-(1-naftil)-etilendiamin dihidroklorid boyaları ile potasyum fosfat tamponu kit içinde hazır olarak bulunmakta idi.

3.2.3.2.3. Yöntem:

Tüm örnekler ve standartlar aynı yöntemle çalışıldı (Standart çalışmalarını tez içerisinde bölüm 3.2.4.'de anlatılmıştır). Potasyum fosfat tamponu ile santrifüj edilen örneklerden nitrit+nitrat total ölçümü için otomatik pipetle 150 µl alındı ve steril bir deney tüpü içerisinde üzerine 15 µl daha önce hazırlanan koenzim ve 6 µl yine daha önce hazırlanan enzim solüsyonları eklendi. Ayrıca çalışma körü hazırlamak için örnek yerine aynı miktarda distile su konularak üzerine koenzim ve enzim solüsyonları eklendi. İyi karıştırıldıktan sonra 30 dakika oda ısısında inkube edildi. Bu işlemin amacı örneklerin içerisinde mevcut olan nitratların nitrit haline çevrilmesidir.

İnkubasyon devam ederken diğer yandan başlangıçta potasyum fosfat tamponu ile santrifüj edilen örneklerden bu kez 100 µl'si ELISA mikroplate'in kuyucuklarına sırayla pipetlendi. Üzerine önce 50 µl sülfanilamid içeren boya reaktifi, ardından 50 µl N-(1-naftil)-etilendiamin dihidroklorid içeren boya reaktifi eklendi. Ayrıca kör olarak ELISA mikroplate'in ilk kuyucuğuna örnek miktarı kadar (100 µl) distile su ve aynı miktarlarda boya pipetlendi. Oda ısısında 5 dakika inkube edildikten sonra ELISA okuyucusunda (Organon Teknika microwell system reader 230 S) 540 nm dalga

boyunda kör ve örneklerin absorbansları okundu. Bu işlem ile örnekte başlangıçta bulunan nitrit miktarı tespit edilmiş oldu.

İnkubasyon süresi dolduğunda bu örneklerden total nitrit tayini yapabilmek için körün ve örneklerin 100 µl'si ELISA mikropate'in kuyucuklarına sırayla pipetlendi. Üzerine önce 50 µl sülfanilamid içeren boya reaktifi, ardından 50 µl N-(1-naftil)-etilendiamin dihidroklorid içeren boya reaktifi eklendi. Oda ısısında 5 dakika inkube edildikten sonra ELISA okuyucusunda (Organon Teknika microwell system reader 230 S) 540 nm dalga boyunda kör ve örneklerin absorbansları okundu. Bu işlem ile de başlangıçta örnek içinde varolan ve inkubasyon sırasında nitratlardan redüklenen total nitrit miktarı ölçülmüş oldu.

Total nitrit absorbans değerlerinden nitrit absorbansları çıkartılarak örneklerdeki nitrat absorbans değerleri elde edilmiş oldu. Absorbansların tespitinin ardından nitrit ve nitrat için ayrı ayrı hazırlanmış olan standart eğriler yardımıyla örnek konsantrasyonları hesaplandı. Nitrit ve nitrat konsantrasyonları toplanarak sonuçlar total nitrit+nitrat konsantrasyonu olarak µM cinsinden verildi.

3.2.3.3.MALONDİALDEHİT (MDA) ÖLÇÜMÜ:

Bu çalışmada Malondialdehit ölçümü Yagi tarafından önerilen yöntemle göre yapıldı (100).

3.2.3.3.1. Prensi:

Aerobik koşullarda PH 3,5'de thiobarbitürik asit (TBA) ile serumun 95°C'de inkubasyonu sonucu eğer lipid peroksidasyonu varsa , lipid peroksidasyonunun sekonder bir ürünü olan MDA oluşmaktadır. Oluşan MDA ise TBA ile pembe renkli bir kompleks oluşturmaktadır. Oluşan pembe rengin 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçümü ile lipid peroksidasyonu saptanmaktadır.

3.2.3.3.2. Örneklerin ve reaktiflerin hazırlanması:

MDA ölçümü sırasında 3.2.3.1. no'lu bölümde anlatıldığı şekilde hazırlanan serum örnekleri kullanıldı. Çalışmada kullanılan ayraçlar ise bölüm 3.1.5.2.'da anlatıldığı şekilde hazırlandı.

3.2.3.3.3. Yöntem:

Tüm örnekler ve standartlar aynı yöntemle çalışıldı (Standart çalışmaları tez içerisinde bölüm 3.2.4. 'de anlatılmıştır). Steril deney tüplerine kör için 50 µl distile su,

örnek için 50 µl serum ve standart için 50 µl 1/10 dilue standart konuldu. Her tüpün üzerine sırasıyla 100 µl %8,1'lik SDS, 750 µl % 20'lik asetik asit, , 750 µl % 0,8'lik TBA çözeltisi eklendi. Sonra tüm tüplere 350 µl distile su eklenerek tüplerin ağızları kapatıldı ve önceden 95°C'ye gelmiş olan sıcak su banyosunda (Memmert thermostating fluid waterbath) 30 dakika süre ile inkubasyona bırakıldı. Sıcak su banyosundan alınan tüpler musluk suyunda soğutuldu. Üzerlerine 0,5 ml distile su ve 2,5 ml çalışmadan hemen önce hazırlanmış olan n-butanol-pyridin (15/1) çözeltisi eklendi. Tüplerin kapakları tekrar kapatılarak vortekslendi (Velp scientifica 2x³). Daha sonra tüm tüpler 4000 rpm'de 15 dakika süre ile santrifüj (Nüve NF 800) edildi. Bu işlemin ardından üstte kalan organik kısmın absorbans değerleri quartz küvetlere otomatik pipet ile alınarak 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik (Varian cary 50 Bio UV visible spectrophotometer) olarak okundu. Önceden hazırlanan standart eğri üzerinden örnek konsantrasyonları nmol/ml cinsinden hesaplandı.

3.2.3.4. AKTİVİN A ÖLÇÜMÜ:

Bu çalışmada Aktivin A ölçümü fare Aktivin A immunoassay kiti (Quantikine M Murine , Mouse/Rat Activin A Immunoassay, 0141148 (R & D systems, Minneapolis, MN) kullanılarak yapıldı.

3.2.3.4.1. Prensi:

Bu çalışmada kantitatif sandviç enzim immunoassay tekniği kullanılmaktadır. Microplate Aktivin A için spesifik olan monoklonal antikor ile kaplanmıştır. Standartlar, kontrol ve örnekler kuyucuklara pipetlenmekte ve eğer Aktivin A mevcut ise bu immobilize antikor tarafından bağlanmaktadır. Yıkama işlemi sonrasında bağlanmayan maddeler ayrılmaktadır. Ardından kuyucuklara Aktivin A'ya spesifik olan enzim bağlı monoklonal antikor eklenmektedir. İkinci bir yıkama ile de bağlanmayan antikor-enzim reaktifi uzaklaştırılmaktadır. Daha sonra kuyucuklara substrat solüsyonu eklenmektedir. Enzimatik reaksiyon sonrasında mavi bir ürün meydana gelmekte olup, bu renk stop solüsyonu eklendiğinde sarıya dönmektedir. Ölçülen rengin şiddeti başlangıç aşamasında bağlanmış olan Aktivin A miktarı ile doğru orantılıdır.

3.2.3.4.2. Örnek ve Reaktiflerin hazırlanması:

Örnek hazırlanması: 50 µl örnek serumu 200 µl kit içinde hazır olarak bulunan kalibratör diluent RD 5Y ile 5 kat dilue edildi.

Reaktiflerin hazırlanması:

Fare Aktivin A kontrol solüsyonunun hazırlanması: Kit içinde hazır olarak bulunan liyofilize kontrol Aktivin A, 1 ml distile su ile çözüldü.

Fare Aktivin A konjugat konsantresi hazırlanması: Horseradish peroksidaz ile konjuge edilmiş olan ve aktivin A'ya karşı antikor içeren konjugat konsantresinin 0,625 ml'si yine kit içinde bulunan 13,75 ml konjugat diluenti ile steril bir erlenmayer içinde hazırlandı.

Yıkama tamponu hazırlanması: Tamponlanmış surfactant içeren 25 ml yıkama tamponu konsantresi distile su ile 625 ml'ye tamamlandı.

Substrat solüsyonu hazırlanması: Örnek başına 100 µl olacak şekilde, stabilize hidrojen peroksit içeren renk reaktifi A ve yine stabilize kromojen (tetrametil benzidin) içeren renk reaktifi B'den eşit miktarlarda karıştırıldı. Bu solüsyon kullanımdan 15 dakika önce hazırlandı.

Bunların dışında kit içinde bulunan ve tampon solüsyonu içeren assay diluent RD1-47 ile hidroklorik asit içeren stop solüsyonu hazır olarak kullanıldı.

3.2.3.4.3. Yöntem:

Tüm örnekler ve standartlar aynı yöntemle çalışıldı (Standart çalışmaları tez içerisinde bölüm 3.2.4. 'de anlatılmıştır).

Kit içerisinde yer alan ve Aktivin A için spesifik olan monoklonal antikor ile kaplanmış olan microplate'in her kuyucuğuna 70 µl assay diluent RD1-47 pipetlendi. Daha sonra her kuyucuğa standartlar, kontrol ve serum örnekleri 50'şer µl olarak pipetlendi ve plate 1 dakika sallanarak karıştırıldı, ardından üzeri adesiv plate kaplayıcısı ile kaplanarak 2 saat oda ısısında inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonrasında yıkama tamponu ile 5 kez microwell yıkama cihazında (Organon Teknika microwell system washer 400) yıkandı. Daha sonra her kuyucuğa 120 µl fare aktivin A konjugatı eklendi, tekrar üzeri kaplanarak 2 saat oda ısısında inkube edildi. Ardından tekrar 5 defa yıkama tamponu ile yıkandı. Üzerine 100 µl substrat solüsyonu eklenerek, 30 dakika oda ısısında fakat güneş ışığı görmeden inkube edildi. En son olarak 100 µl stop solüsyonu konularak reaksiyon sona erdirildi. 30 dakika içerisinde ELISA

okuyucusunda (Organon Teknika microwell system reader 230S) 450 nm dalga boyunda ve beraberinde dalga boyu doğrulanması için referans dalga boyu olan 540 nm'de absorbanslar okundu. Standart eğri kullanılarak örnek konsantrasyonları hesaplandı. Elde edilen konsantrasyonlar örnek dilüsyon faktörü olan 5 ile çarpılarak, sonuçlar pg/ml cinsinden verildi.

3.2.3.5. FİBRONEKTİN ÖLÇÜMÜ:

Bu çalışmada kantitatif fibronektin ölçümü insan fibronektin antiserumu (Human fibronectin N antiserum, OUND 09 , Dade Behring) kullanılarak nefelometrik olarak yapıldı.

3.2.3.5.1. Prensip:

İmmunokimyasal bir reaksiyon ile plazma veya serum örneklerinde bulunan fibronektin spesifik antikolar ile immun kompleks oluşturur. Bu kompleksler örnekten geçen ışınların saçılmasına neden olur. Bu saçılan ışının yoğunluğu örnekteki protein konsantrasyonu ile orantılıdır. Sonuçlar bilinen konsantrasyondaki bir standart ile karşılaştırma yapılmak suretiyle elde edilir.

3.2.3.5.2. Örneklerin ve Reaktiflerin hazırlanması:

Çalışmada kullanılan serum örnekleri bölüm 3.2.3.1.'de anlatılmış olduğu gibi hazırlandı. Örnekler ve reaktifler çalışma öncesinde oda ısısına getirilerek kullanıldı.

Çalışma sırasında nefelometre cihazında (Dade Behring BN 100, Marburg, Germany) insan fibronektin antiserumu (N antiserum to human fibronectin , OUND, Dade Behring), protein standardı (N protein standard PY (human), OUID, Dade Behring), Protein kontrol (N/T protein control PY (human), OWSY, Dade Behring), Reaksiyon tamponu (N reaction buffer, OUMS, Dade Behring), ve diluent (N diluent, OUMT, Dade Behring) reaktifleri hazır olarak sağlanmak suretiyle kullanıldı.

3.2.3.5.3. Yöntem:

Çalışma sırasındaki tüm basamaklar nefelometre cihazında (Dade Behring BN 100, Marburg, Germany) otomatik olarak gerçekleştirildi. Örneklerin çalışılmasına başlanmadan önce diluent reaktifi ile cihaz tarafından otomatik olarak protein standardının seri dilüsyonları yapıldı. Fibronektin için bir standart eğri elde edildi. Bu eğride X eksenini g/L cinsinden konsantrasyonu gösterirken, Y eksenini ışık saçılma indeksi (LSI= light scattering index) olarak belirtilen değeri göstermekte idi. Bu işlemin

ardından internal kalite kontrol amacıyla protein kontrol solüsyonu çalışıldı. Sonuçların uygun bulunması nedeniyle örnekler çalışılmaya başlandı. Cihaza her örnek için 150 µl serum yüklendi. Örnekler yine cihaz tarafından otomatik olarak diluent reaktifi ile 1/20 oranında dilüe edilerek çalışıldı. Çalışma sonrasında fibronektin sonuçları yine nefelometre tarafından standart eğriye göre değerlendirilerek elde edildi. Örnek konsantrasyonları g/L cinsinden verildi.

3.2.3.6. TGF- β1 ÖLÇÜMÜ:

Bu çalışmada TGF- β1 ölçümü, TGF- β1 immunoassay kiti (TGF β1 E max immunoassay system 145822 , Promega corporation, Madison, WI, USA) kullanılarak yapıldı.

3.2.3.6.1. Prensip:

Çalışma biyolojik olarak aktif olan TGF- β1'in antikor sandviç formatında sensitif ve spesifik tespiti için planlanmıştır (101). Bu formatta 96 adet yassı tabanlı kuyucuk içeren microplate solubl TGF- β1'i bağlayan TGF- β kaplayıcı monoklonal antikor (mAb) ile kaplanmıştır. Yıkama TGF- β1 ise ikinci bir spesifik poliklonal antikor (pAb) ile bağlanmaktadır. Yıkama işleminden sonra spesifik olarak bağlı poliklonal antikorun (pAb) miktarı , tersiyer bir reaktif olan türe spesifik antikor ile konjuge edilmiş horseradish peroksidaz (TGF- β HRP conjugate) kullanılarak tayin edilir. Bağlanmayan konjugat yıkama ile ayrılır ve daha sonra kromojenik bir substratla inkube edildiğinde oluşan renk değişikliği ölçülür. Test solüsyonlarındaki TGF- β1 miktarı oksidasyon-redüksiyon reaksiyonundaki oluşan renk ile orantılıdır.

3.2.3.6.2. Örneklerin ve Reaktiflerin hazırlanması:

Bölüm 3.2.3.1.'de anlatılmış olduğu gibi TGF- β1 ölçümü için örneklere asit muamelesi işlemi (acid treatment procedure) uygulandı. Daha sonra kit içerisinde yer alan TGF- β örnek 1x tamponu ile örnekler 1/20 oranında dilüe edildi .Bu şekilde örnekler önce asit muamelesi sırasında DPBS tamponu ile 1/5 oranında, ardından TGF- β örnek 1x tamponu ile 1/20 oranında olmak üzere toplam 1/100 oranında dilüe edilmiş oldu.

Çalışma sırasında kullanılan ve kit içinde yer almayan ayraçların hazırlanması bölüm 3.1.5.3.'de anlatıldığı şekilde yapıldı. Kit içerisinde yer alan reaktiflerin hazırlanması ise 3.2.3.6.3.'deki çalışma yöntemi bölümünde anlatılmıştır.

3.2.3.6.3. Yöntem:

Tüm örnekler ve standartlar aynı yöntemle çalışıldı (Standart çalışmaları tez içerisinde bölüm 3.2.4. 'de anlatılmıştır).

Çalışmaya steril polistren ELISA microplate'inin kaplanması işlemi ile başlandı. 15 ml kapasiteli steril bir tüp içerisinde 10 ml daha önce hazırlanmış olan (bkz. Bölüm 3.1.5.3.) karbonat kaplayıcı tampon ve 10 µl TGF- β kaplayıcı mAb karıştırıldı. Bu karışımdan multichannel otomatik pipet (Treff-Lab) yardımı ile plate'in her kuyucuğuna 100 µl pipetlendi. Daha sonra plate +4°C'de gece boyunca, sallanmadan inkubasyona bırakıldı.

Gece boyunca inkube olan ve antikor ile kaplanan plate dolaptan alındı ve 10-15 dakika boyunca oda ısısında bekletildi. Daha sonra temiz bir kurutma kağıdı üzerine ters çevrilerek fazlalıklar alındı. Bu işlemler sonrasında ise TGF- β blok 1x tampon hazırlandı. Bunun için, temiz bir 50 ml kapasiteli erlenmayer içinde 22,4 ml distile su ve 5,6 ml kit içinde yer alan TGF- β blok 5x tampon karıştırıldı. Ardından bu karışımdan her kuyucuğa 270 µl eklendi. Pipetleme sırasında kuyucukların yüzeyine değmemeye özen gösterildi. Plate 37°C'de 35 dakika sallanmadan inkube edildi. Bu şekilde TGF- β blok 1x tampon ile plate'in nonspesifik olarak bloklanması sağlanmış oldu.

Bloklama işleminden sonra önceden hazırlanmış olan TBST yıkama tapanonu (bkz. Bölüm 3.1.5.3.) ile bir kez microwell yıkama cihazında (Organon Teknika microwell system washer 400) yıkama yapıldı. Daha sonra TGF- β örnek 1x tamponu hazırlanması işlemine geçildi. Temiz bir 50 ml kapasiteli erlenmayer içinde 6,9 ml TGF- β örnek 10x tamponu ve 62,1 ml distile su karıştırıldı. Hazırlanan bu tampon örnek ve standart dilüsyonu için de kullanıldı. Ve her kuyucuğa 100 µl dilüe edilmiş örneklerden sırayla pipetlendi. Kör olarak ise 100 µl distile su kullanıldı. Oda ısısında, 500 rpm'de shaker (memmert) üzerinde sallanarak, 90 dakika inkube edildi. Inkubasyonun ardından TBST yıkama tapanonu ile 5 kez yıkama yapıldı.

Temiz bir tüpte anti TGF- β1 pAb hazırlandı. Bunun için 10 µl anti TGF- β1 pAb ve 10 ml TGF- β örnek 1x tamponu karıştırıldı. Bu dilüe edilmiş antikordan her kuyucuğa 100 µl eklendi. Ve yine sallanarak oda ısısında 2 saat inkubasyona bırakıldı. Inkubasyon bitiminde TBST yıkama tapanonu ile 5 kez yıkama yapıldı.

TGF- β horseradish peroksidaz (HRP) konjugatı hazırlanması işlemine geçildi. Temiz bir tüp içerisinde 100 μ l stok TGF- β horseradish peroksidaz (HRP) konjugatı ile 9,9 ml TGF- β örnek 1x tamponu karıştırıldı. Sonra bu karışımdan her kuyucuğa 100 μ l pipetlenerek ,oda ısısında, sallanarak 2 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sırasında bir sonraki aşamada kullanılacak olan TMB one kromojen solüsyonu da oda ısısına getirildi. 2 saatlik inkubasyon sonrasında tekrar TBST yıkama tamponu ile 5 kez yıkama yapıldı.

Yıkama işleminin ardından her kuyucuğa 100 μ l TMB one kromojen solüsyonu eklendi, ve plate bu kez sallanmadan oda ısısında 15 dakika inkube edildi. Kuyucuklarda mavi renk oluşumu izlendi. Daha sonra her kuyucuğa 100 μ l önceden hazırlanmış olan 1 N HCl (bkz. Bölüm 3.1.5.3.) eklenerek reaksiyon durduruldu. Mavi rengin sarı renge dönüşümü izlendi. Okuma işlemi 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucusunda (Organon Teknika microwell system reader 230S) yapıldı. Alınan absorbans değerleri standart eğriye göre değerlendirilerek örnek konsantrasyonları hesaplandı. Ardından sonuçlar örnek dilüsyon faktörü olan 100 ile çarpılarak, örneklerdeki TGF- β 1 miktarları ng/ml cinsinden verildi.

3.2.3.7. TGF- β 2 ÖLÇÜMÜ:

Bu çalışmada TGF- β 2 ölçümü, TGF- β 2 immunoassay kiti (TGF β 2 E max immunoassay system 143540 ,Promega corporation, Madison, WI, USA) kullanılarak yapıldı.

3.2.3.7.1. Prensip:

Çalışmada biyolojik olarak aktif TGF- β 2 ölçümü antikor sandviç formatında yapılmaktadır (101). Burada microplate kuyucukları TGF- β kaplayıcı monoklonal antikor (mAb) ile kaplanmıştır ve böylece solubl TGF- β 2 bağlanabilmektedir. Sonrasında ikinci bir antikor olan Anti- TGF- β 2 poliklonal antikor (pAb) ise sandviçi tamamlamak için eklenmektedir. Yıkama işlemi sonrasında antikor konjugatı (horseradish peroksidaz, TGF- β HRP) eklenmekte ve bu da sandviç kompleksine bağlanmaktadır. Son olarak kromojenik bir substrat olan 3,3',5,5'-tetrametil benzidin (TMB) eklenmektedir. Örnekteki spesifik olarak bağlanmış olan TGF- β 2 miktarı

oksidasyon-redüksiyon reaksiyonu sırasında oluşan renk şiddeti ile orantılıdır. Ve standart eğri kullanılarak TGF- β 2 miktarı tayin edilmektedir.

3.2.3.7.2. Örneklerin ve Reaktiflerin hazırlanması:

Bölüm 3.2.3.1.'de anlatılmış olduğu gibi TGF- β 2 ölçümü için örneklere asit muamelesi işlemi (acid treatment procedure) uygulandı. Daha sonra kit içerisinde yer alan TGF- β örnek 1x tamponu ile örnekler 1/10 oranında dilüe edildi .Bu şekilde örnekler önce asit muamelesi sırasında DPBS tamponu ile 1/5 oranında, ardından TGF- β örnek 1x tamponu ile 1/10 oranında olmak üzere toplam 1/50 oranında dilüe edilmiş oldu.

Çalışma sırasında kullanılan ve kit içinde yer almayan ayraçların hazırlanması bölüm 3.1.5.4.'de anlatıldığı şekilde yapıldı. Kit içerisinde yer alan reaktiflerin hazırlanması ise 3.2.3.7.3.'deki çalışma yöntemi bölümünde anlatılmıştır.

3.2.3.7.3. Yöntem:

Tüm örnekler ve standartlar aynı yöntemle çalışıldı (Standart çalışmaları tez içerisinde bölüm 3.2.4. 'de anlatılmıştır).

Çalışmaya steril polistren ELISA microplate'inin kaplanması işlemi ile başlandı. 15 ml kapasiteli steril bir tüp içerisinde 10 ml daha önce hazırlanmış olan (bkz. Bölüm 3.1.5.4.) karbonat kaplayıcı tampon ve 10 μ l TGF- β kaplayıcı mAb karıştırıldı. Bu karışımdan multichannel otomatik pipet (Treff-Lab) yardımı ile plate'in her kuyucuğuna 100 μ l pipetlendi. Daha sonra plate +4°C'de gece boyunca, sallanmadan inkubasyona bırakıldı.

Gece boyunca inkube olan ve antikor ile kaplanan plate dolaptan alındı ve 10-15 dakika boyunca oda ısısında bekletildi. Daha sonra temiz bir kurutma kağıdı üzerine ters çevrilerek fazlalıklar alındı. Bu işlemler sonrasında ise TGF- β blok 1x tampon hazırlandı. Bunun için, temiz bir 50 ml kapasiteli erlenmayer içinde 22,4 ml distile su ve 5,6 ml kit içinde yer alan TGF- β blok 5x tampon karıştırıldı. Ardından bu karışımdan her kuyucuğa 270 μ l eklendi. Pipetleme sırasında kuyucukların yüzeyine değmemeye özen gösterildi. Plate 37°C'de 35 dakika sallanmadan inkube edildi. Bu şekilde TGF- β blok 1x tampon ile plate'in nonspesifik olarak bloklanması sağlanmış oldu.

Bloklama işleminden sonra önceden hazırlanmış olan TBST yıkama tamponu (bkz. Bölüm 3.1.5.4.) ile bir kez microwell yıkama cihazında (Organon Teknika

microwell system washer 400) yıkama yapıldı. Daha sonra TGF- β örnek 1x tamponu hazırlanması işlemine geçildi. Temiz bir 50 ml kapasiteli erlenmayer içinde 6,9 ml TGF- β örnek 10x tamponu ve 62,1 ml distile su karıştırıldı. Hazırlanan bu tampon örnek ve standart dilüsyonu için de kullanıldı. Ve her kuyucuğa 100 μ l dilüe edilmiş örneklerden sırayla pipetlendi. Kör olarak ise 100 μ l distile su kullanıldı. Oda ısısında, 500 rpm'de shaker (memmert) üzerinde sallanarak, 90 dakika inkube edildi. İnkubasyonun ardından TBST yıkama tamponu ile 5 kez yıkama yapıldı.

Temiz bir tüpte anti TGF- β 2 pAb hazırlandı. Bunun için 5 μ l anti TGF- β 2 pAb ve 10 ml TGF- β örnek 1x tamponu karıştırıldı. Bu dilüe edilmiş antikordan her kuyucuğa 100 μ l eklendi. Ve yine sallanarak oda ısısında 2 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon bitiminde TBST yıkama tamponu ile 5 kez yıkama yapıldı.

TGF- β horseradish peroksidaz (HRP) konjugatı hazırlanması işlemine geçildi. Temiz bir tüp içerisinde 100 μ l stok TGF- β horseradish peroksidaz (HRP) konjugatı ile 9,9 ml TGF- β örnek 1x tamponu karıştırıldı. Sonra bu karışımdan her kuyucuğa 100 μ l pipetlenerek ,oda ısısında, sallanarak 2 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sırasında bir sonraki aşamada kullanılacak olan TMB one kromojen solüsyonu da oda ısısına getirildi. 2 saatlik inkubasyon sonrasında tekrar TBST yıkama tamponu ile 5 kez yıkama yapıldı.

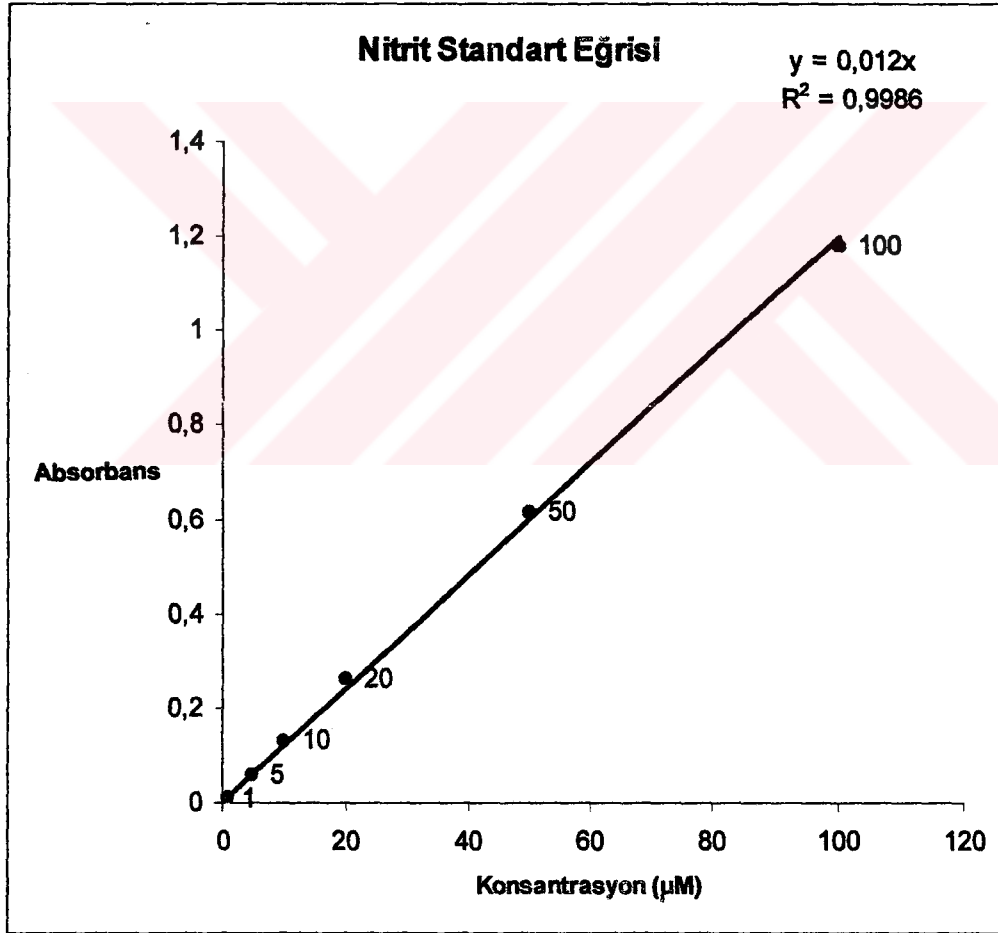
Yıkama işleminin ardından her kuyucuğa 100 μ l TMB one kromojen solüsyonu eklendi, ve plate bu kez sallanmadan oda ısısında 15 dakika inkube edildi. Kuyucuklarda mavi renk oluşumu izlendi. Daha sonra her kuyucuğa 100 μ l önceden hazırlanmış olan 1 N HCl (bkz. Bölüm 3.1.5.4.) eklenerek reaksiyon durduruldu. Mavi rengin sarı renge dönüşümü izlendi. Okuma işlemi 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucusunda (Organon Teknika microwell system reader 230S) yapıldı. Alınan absorbans değerleri standart eğriye göre değerlendirilerek örnek konsantrasyonları hesaplandı. Ardından sonuçlar örnek dilüsyon faktörü olan 50 ile çarpılarak, örneklerdeki TGF- β 2 miktarları ng/ml cinsinden verildi.

3.2.4. ÇALIŞMA STANDART EĞRİLERİNİN HAZIRLANMASI:

3.2.4.1. NİTRİT STANDART EĞRİSİ HAZIRLANMASI:

Bölüm 3.1.5.1.'de anlatıldığı şekilde hazırlanan 1mM Sodyum nitrit stok standart çözeltisinden (NaNO_2) 1 ml alınarak 10 ml'ye distile su ile tamamlandı. Bu dilüsyon

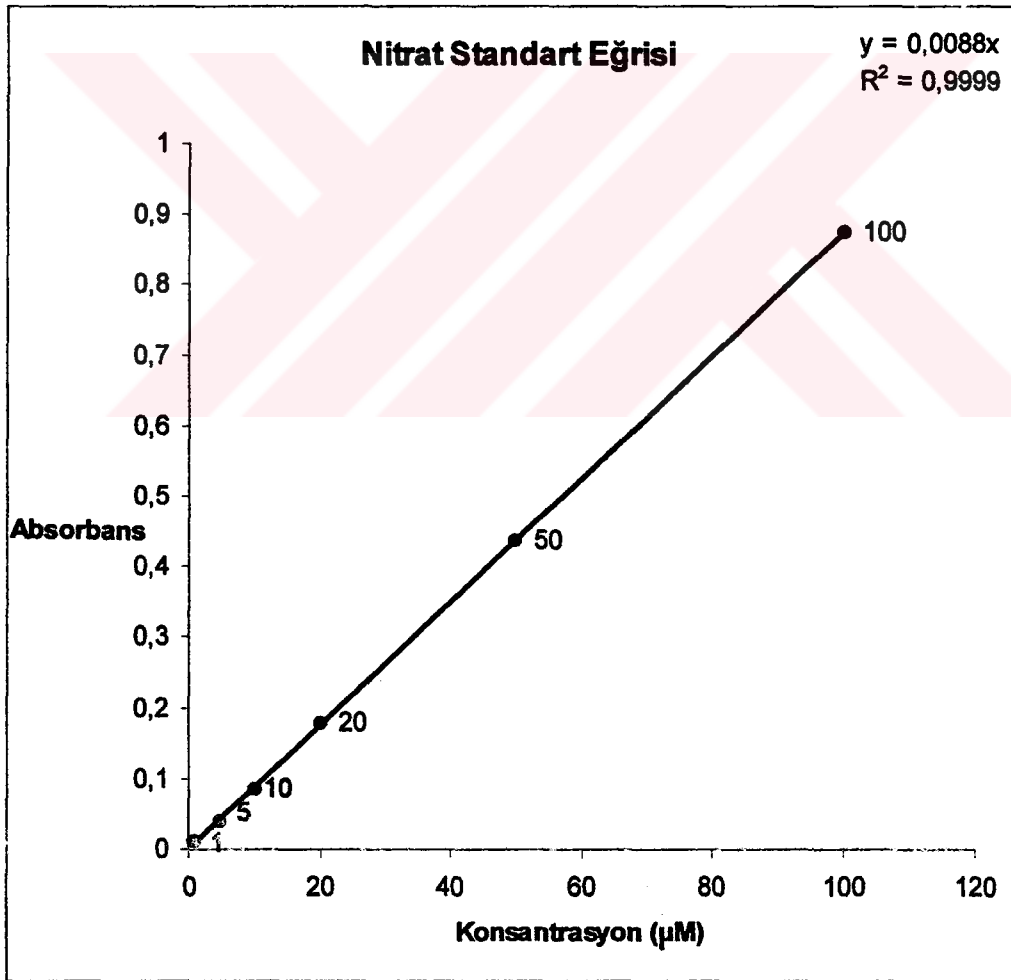
işlemi sonucunda elimizdeki nitrit konsantrasyonu 100 µM oldu. 100 µM konsantrasyondaki nitrit çözeltisinden 1 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 50 µM konsantrasyon düzeyleri elde edilecek şekilde distile su ile seri dilüsyonlar yapıldı. Elde edilen bu 6 adet farklı konsantrasyondaki nitrit çözeltisi bölüm 3.2.3.2.3.'de anlatılan nitrit çalışma yöntemine uygun olarak çalışıldı. Elde edilen absorbans değerleri ve bilinen konsantrasyon değerlerine göre standart eğri çizimi yapıldı. Örneklerin çalışılma aşamasının ardından bu eğri kullanılarak örnek konsantrasyonları hesaplandı. Nitrit standart eğrisi Şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.2: Nitrit Standart eğrisi

3.2.4.2. NİTRAT STANDART EĞRİSİNİN HAZIRLANMASI:

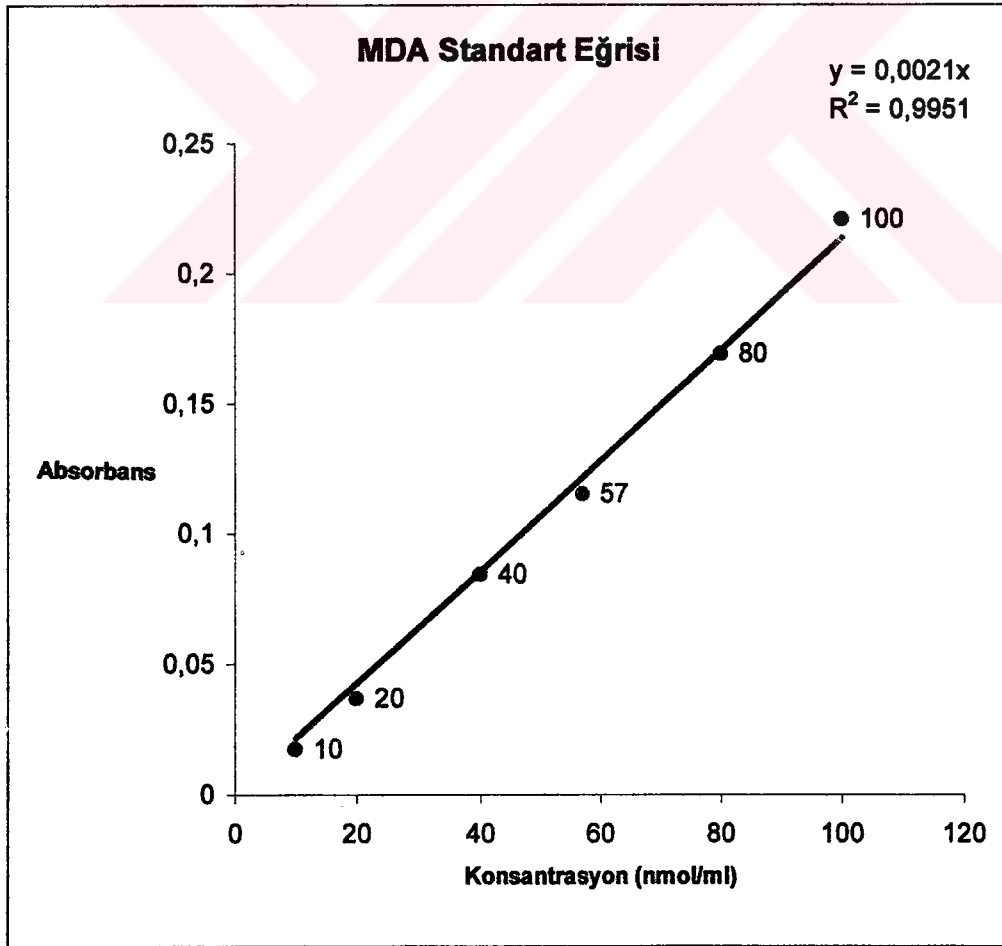
Bölüm 3.1.5.1.'de anlatıldığı şekilde hazırlanan 72,99 mM Potasyum nitrat stok standart çözeltisinden (KNO_3) 14 μl alınarak 10 ml'ye distile su ile tamamlandı. Bu dilüsyon işlemi sonucunda elimizdeki nitrat konsantrasyonu 100 μM oldu. 100 μM konsantrasyondaki nitrat çözeltisinden 1 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM , 50 μM konsantrasyon düzeyleri elde edilecek şekilde distile su ile seri dilüsyonlar yapıldı. Elde edilen bu 6 adet farklı konsantrasyondaki nitrat çözeltisi bölüm 3.2.3.2.3.'de anlatılan nitrat çalışma yöntemine uygun olarak çalışıldı. Elde edilen absorbans değerleri ve bilinen konsantrasyon değerlerine göre standart eğri çizimi yapıldı. Örneklerin çalışılma aşamasının ardından bu eğri kullanılarak örnek konsantrasyonları hesaplandı. Nitrat standart eğrisi Şekil 3.3'de verilmiştir.



Şekil 3.3: Nitrat Standart Eğrisi.

3.2.4.3. MDA STANDART EĞRİSİNİN HAZIRLANMASI:

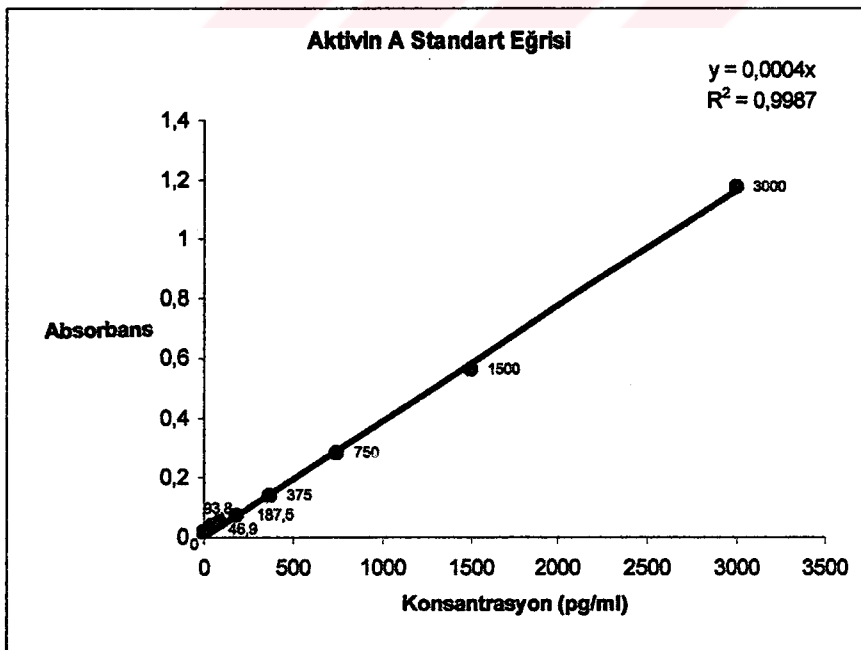
Bölüm 3.1.5.2.'de anlatıldığı şekilde hazırlanan $6,58 \times 10^{-5}$ g/ml konsantrasyondaki MDA stok standart çözeltisinden 1 ml alınarak 10 ml'ye distile su ile tamamlandı. Bu dilüsyon işlemi sonucunda elimizdeki 1,1,3,3 tetrametoksiopropan konsantrasyonu $6,58 \times 10^{-6}$ g/ml oldu. Bu konsantrasyon 40 nmol/ml'ye eşit bir konsantrasyondur. Benzer şekilde stok MDA çözeltisinden 10 nmol/ml, 20 nmol/ml, 57 nmol/ml, 80 nmol/ml, 100 nmol/ml konsantrasyon düzeyleri elde edilecek şekilde distile su ile seri dilüsyonlar yapıldı. Elde edilen bu 6 adet farklı konsantrasyondaki MDA çözeltisi bölüm 3.2.3.3.3.'de anlatılan MDA çalışma yöntemine uygun olarak çalışıldı. Elde edilen absorbans değerleri ve bilinen konsantrasyon değerlerine göre standart eğri çizimi yapıldı. Örneklerin çalışılma aşamasının ardından bu eğri kullanılarak örnek konsantrasyonları hesaplandı. MDA standart eğrisi Şekil 3.4'da verilmiştir.



Şekil 3.4: MDA Standart Eğrisi

3.2.4.4. AKTİVİN A STANDART EĞRİSİNİN HAZIRLANMASI:

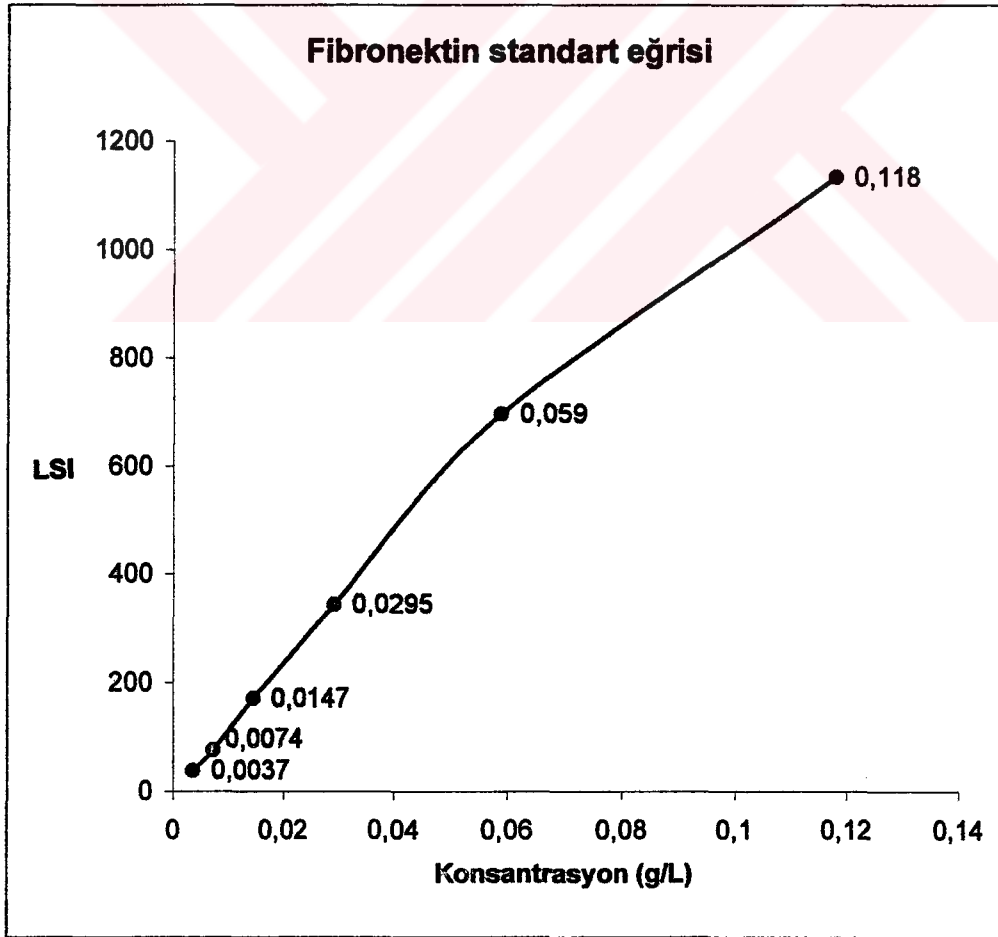
Aktivin A kiti (Quantikine M Murine , Mouse Activin A Immunoassay, 0141148 (R & D systems, Minneapolis, MN) içinde mevcut olan 15 ng liyofilize, rekombinan aktivin A standardı 5 ml kalibratör diluent RD 5Y ile çözüldü. Bu şekilde standart konsantrasyonu 3000 pg/ml oldu. Daha sonra 7 adet steril biyokimya tüpü alındı ve içlerine 200 µl kalibratör diluent RD 5Y pipetlendi. Sonra 3000 pg/ml konsantrasyondaki stok standarttan 200 µl 1 no'lu tüpe aktarıldı ve iyice karıştırıldı. 1 no'lu tüpten tekrar 200 µl alınarak 2 no'lu tüpe aktarıldı ve iyice karıştırıldı. Bu dilüsyon işlemleri 6 no'lu tüpe kadar yapıldı. Fakat 6 no'lu tüpteki standart 7 no'lu tüpe aktarılmadı. Böylece 7 no'lu tüpte sadece kalibratör diluent RD 5Y bulunmuş oldu ve dolayısıyla bu tüpün konsantrasyonu 0 pg/ml oldu. Bu dilüsyon işlemleri ile 0 pg/ml, 46,9 pg/ml, 93,8 pg/ml, 187,5 pg/ml, 375 pg/ml, 750 pg/ml, 1500 pg/ml ve 3000 pg/ml konsantrasyonlarda 8 adet standart çözelti elde edilmiş oldu. Daha sonra bölüm 3.2.3.4.3.'de açıklanan çalışma yöntemi kullanılarak bu standartlara ait absorbanslar elde edildi. Elde edilen absorbans değerleri ve bilinen konsantrasyon değerlerine göre standart eğri çizimi yapıldı. Örneklerin çalışılma aşamasının ardından bu eğri kullanılarak örnek konsantrasyonları hesaplandı. Aktivin A standart eğrisi Şekil 3.5 'de verilmiştir.



Şekil 3.5: Aktivin A Standart Eğrisi

3.2.4.5. FİBRONEKTİN STANDART EĞRİSİNİN HAZIRLANMASI:

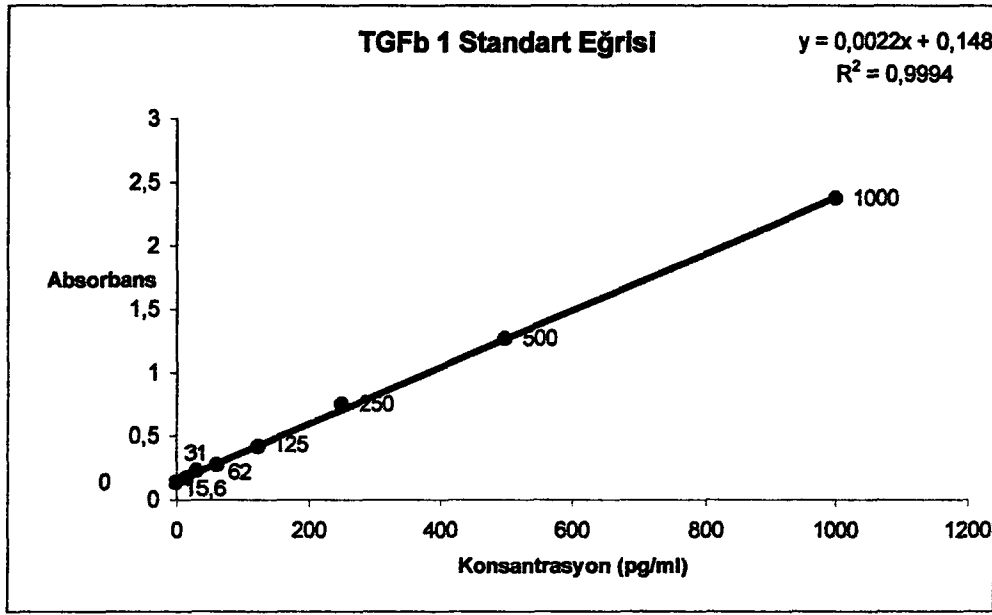
Örneklerin çalışılmasına başlanmadan önce diluent reaktifi ile nefelometre cihazı (Dade Behring BN 100, Marburg, Germany) tarafından otomatik olarak protein standartının seri dilüsyonları yapıldı. Ve bu şekilde 0,0037 g/l, 0,0074 g/l, 0,0147 g/l, 0,0295 g/l, 0,0590 g/l, ve 0,1180 g/l konsantrasyonlarında 6 adet standart konsantrasyonu elde edildi. Ölçülen değerler ve bilinen bu konsantrasyonlar kullanılarak fibronektin için bir standart eğri elde edildi. Bu eğride X eksenini g/L cinsinden konsantrasyonu gösterirken, Y eksenini ışık saçılma indeksi (LSI= light scattering index) olarak belirtilen değeri göstermekte idi. Standart eğri çalışmasının ardından cihaz serum örneklerindeki fibronektin miktarını okuyarak, yine otomatik olarak standart eğri ile değerlendirdi. Fibronektin standart eğrisi Şekil 3.6'da verilmiştir.



Şekil 3.6: Fibronektin Standart Eğrisi

3.2.4.6. TGF- β 1 STANDART EĞRİSİNİN HAZIRLANMASI:

Standart eğri hazırlanmasında TGF- β 1 ölçümü için kullanılan, TGF- β 1 immunoassay kiti (TGF β 1 E max immunoassay system 145822 , Promega corporation, Madison, WI, USA) içerisinde bulunan 1 μ g/ml konsantrasyonundaki TGF- β 1 standardı kullanıldı. Bu standarta da tıpkı örneklere yapılmış olduğu gibi asit muamele işlemi (Bkz. Bölüm 3.2.3.1.) yapılmış idi. Bu 1 μ g/ml konsantrasyondaki standart TGF- β örnek 1x tampon ile 1/1000 oranında dilüe edildi, ve standart konsantrasyonu 1000 pg/ml düzeyine indirilmiş oldu. Daha sonra microplate 'in 8 kuyucuğuna 100 μ l TGF- β örnek 1x tampon pipetlendi. 1 no'lu kuyucuğa ise dilüe edilerek konsantrasyonu 1000 pg/ml düzeyine indirilmiş olan TGF- β 1 standardı eklendi. Ard arda 6 defa ½ oranında seri dilüsyonlar yapıldı. Önce 1 no'lu kuyucuktan 100 μ l standart alınarak 2 no'lu kuyucuğa eklendi. Sonra 2 no'lu kuyucuktan yine 100 μ l alınarak 3 no'lu kuyucuğa pipetlendi. Bu işleme 7 no'lu kuyucuğa kadar devam edildi. 7 no'lu kuyucuktan alınan 100 μ l standart ise dışarı atıldı. 8 no'lu kuyucukta sadece TGF- β örnek 1x tampon bulunmaktaydı ve içerisinde standart olmadığından konsantrasyonu 0 pg/ml idi. Tüm bu işlemler sonucunda 0 pg/ml, 15,6 pg/ml, 31 pg/ml, 62 pg/ml, 125 pg/ml, 250 pg/ml, 500 pg/ml ve 1000 pg/ml konsantrasyonlarında 8 adet standart elde edilmiş oldu. Daha sonra bölüm 3.2.3.6.3.'da anlatılmış olan çalışma yöntemine göre standart çalışması yapıldı. Daha sonra elde edilen absorbans değerleri ve bilinen konsantrasyon değerlerine göre standart eğri çizimi yapıldı. Örneklerin çalışılma aşamasının ardından bu eğri kullanılarak örnek konsantrasyonları hesaplandı. TGF- β 1 standart eğrisi Şekil 3.7 'de verilmiştir.

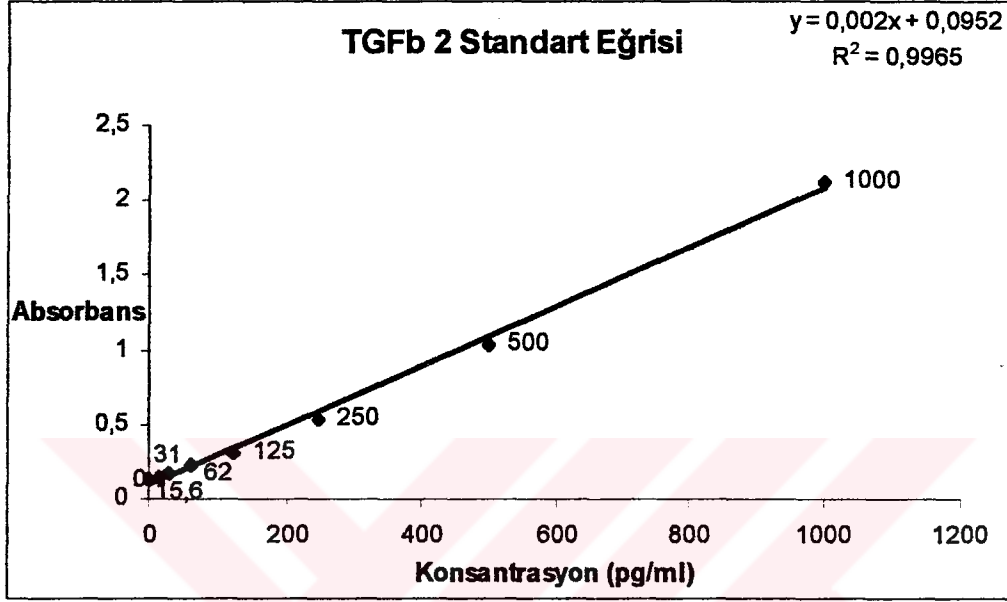


Şekil 3.7: TGF- β 1 Standart Eğrisi

3.2.4.7. TGF- β 2 STANDART EĞRİSİNİN HAZIRLANMASI:

Standart eğri hazırlanmasında TGF- β 2 ölçümü için kullanılan, TGF- β 2 immunoassay kiti (TGF β 2 E max immunoassay system 143540 ,Promega corporation, Madison, WI, USA) içerisinde bulunan 1 μ g/ml konsantrasyonundaki TGF- β 2 standartı kullanıldı. Bu standarda da tıpkı örneklere yapılmış olduğu gibi asit muamele işlemi (Bkz. Bölüm 3.2.3.1.) yapılmış idi. Bu 1 μ g/ml konsantrasyondaki standart TGF- β örnek 1x tampon ile 1/1000 oranında dilüe edildi. Ve standart konsantrasyonu 1000 pg/ml düzeyine indirilmiş oldu. Daha sonra microplate 'in 8 kuyucuğuna 100 μ l TGF- β örnek 1x tampon pipetlendi. 1 no'lu kuyucuğa ise dilüe edilerek konsantrasyonu 1000 pg/ml düzeyine indirilmiş olan TGF- β standardı eklendi. Ard arda 6 defa $\frac{1}{2}$ oranında seri dilüsyonlar yapıldı. Önce 1 no'lu kuyucuktan 100 μ l standart alınarak 2 no'lu kuyucuğa eklendi. Sonra 2 no'lu kuyucuktan yine 100 μ l alınarak 3 no'lu kuyucuğa pipetlendi. Bu işleme 7 no'lu kuyucuğa kadar devam edildi. 7 no'lu kuyucuktan alınan 100 μ l standart ise dışarı atıldı. 8 no'lu kuyucukta sadece TGF- β örnek 1x tampon bulunmaktaydı ve içerisinde standart olmadığından konsantrasyonu 0 pg/ml idi. Tüm bu işlemler sonucunda 0 pg/ml, 15,6 pg/ml, 31 pg/ml, 62 pg/ml, 125 pg/ml, 250 pg/ml, 500 pg/ml ve 1000 pg/ml konsantrasyonlarında 8 adet standart elde edilmiş oldu. Daha sonra bölüm 3.2.3.7.3.'da anlatılmış olan çalışma yöntemine göre standart çalışması

yapıldı. Daha sonra elde edilen absorbans değerleri ve bilinen konsantrasyon değerlerine göre standart eğri çizimi yapıldı. Örneklerin çalışılma aşamasının ardından bu eğri kullanılarak örnek konsantrasyonları hesaplandı. TGF- β 2 standart eğrisi Şekil 3.8’de verilmiştir.



Şekil 3.8: TGF- β 2 Standart Eğrisi

3.2.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ:

Çalışmamızda istatistiksel analizler için SPSS 9,05 for Windows istatistik yazılım programı kullanıldı. Tüm değişkenler için, her çalışma grubuna ait ortalama (mean), standart hata (standart error = SE), ve % 95 güven aralığı (95% confidence interval for mean = 95% CI) hesaplamaları için Descriptives analizi yapıldı. Aynı değişkenin grup içi karşılaştırmasında tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA ve Tukey post- hoc testleri) uygulandı (102). Grup içi değişkenler arası ilişkilerin değerlendirilmesi içinse korelasyon analizi yapıldı (103). Değişkenlere ait grafikler ise error-bar grafikleri kullanılarak hazırlandı. Anlamlılık değeri (p= significance) olarak $p < 0,05$ kabul edildi. Korelasyon katsayısı (r= Pearson coefficient of correlation) değeri olarak ise $r > 0,50$ kabul edildi.

4.BULGULAR

Yapılan deneysel çalışmanın değerlendirilmesi için belirlenen parametreler; rat siyatik sinirinde iskemi-reperfüzyon modelinde nitrit - nitrat, malondialdehit, aktivin A, fibronektin, transforming growth faktör $\beta 1$ ve transforming growth faktör $\beta 2$ ölçümleri idi. Çalışmamızda yer alan tüm parametrelerin biyokimyasal analizleri bölüm 3.2.3.'de ayrıntılı şekilde anlatılan yöntemlere göre yapıldı. Elde edilen sonuçlar ise bölüm 3.2.5.'de belirtilen istatistiksel metotlar ile değerlendirildi.

4.1. BİYOKİMYASAL VE İSTATİSTİKSEL ANALİZLERİN SONUÇLARI:

Tüm parametreler için, her çalışma grubuna ait ortalama (mean), standart hata (standart error = SE), ve % 95 güven aralığı (95% confidence interval for mean = 95% CI) değerleri çizelgeler halinde verildi. Ayrıca her parametreye ait error-bar grafikleri de ayrı ayrı verildi. Çalışma gruplarına ait bilgiler ise bölüm 3.2.2.'de ayrıntılı şekilde anlatılmış olmakla beraber kısaca şu şekildedir;

Grup I : İskemi ve reperfüzyon yapılmamış grup.

Grup II : 3 saat iskemi yapılmış, reperfüzyon yapılmamış grup.

Grup III : 3 saat iskemi yapılmış, ve 1 saat reperfüzyon yapılmış grup.

Grup IV : 3 saat iskemi yapılmış, ve 2 saat reperfüzyon yapılmış grup.

Grup V : 3 saat iskemi yapılmış, ve 24 saat reperfüzyon yapılmış grup.

Grup VI : 3 saat iskemi yapılmış, ve 7 gün reperfüzyon yapılmış grup.

Grup VII : 3 saat iskemi yapılmış, ve 14 gün reperfüzyon yapılmış grup.

Grup VIII :3 saat iskemi yapılmış, ve 21 gün reperfüzyon yapılmış grup.

Grup IX : 3 saat iskemi yapılmış, ve 28 gün reperfüzyon yapılmış grup.

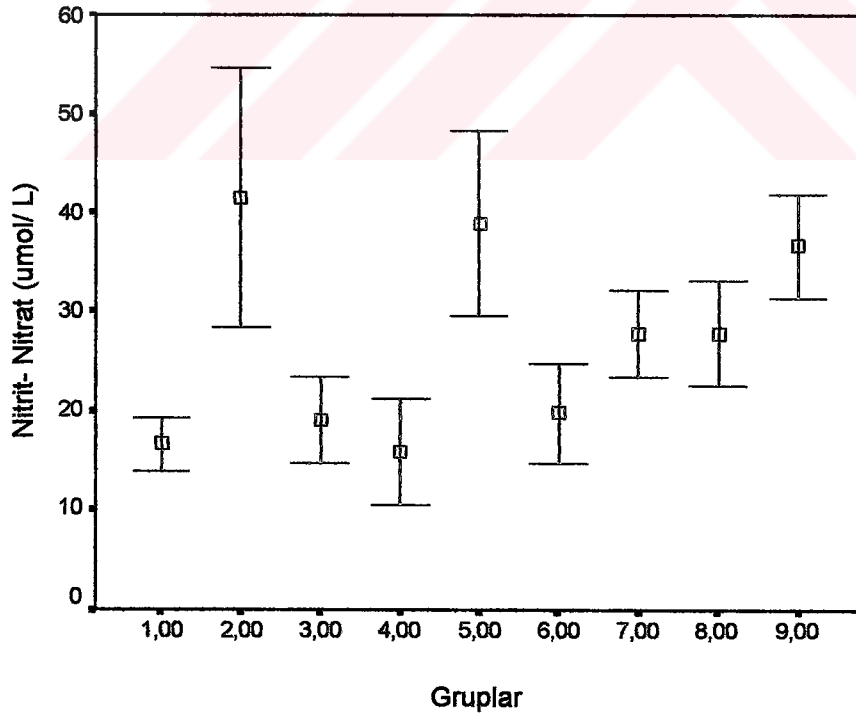
4.1.1. NİTRİT-NİTRAT SONUÇLARI:

Nitrit-nitrat sonuçlarının her çalışma grubundaki ortalama (mean), standart hata (standart error = SE), ve ortalama için % 95 güven aralığı (95% confidence interval for mean = 95% CI) değerleri Çizelge 4.1 'de verilmiştir. Yine nitrit-nitrat sonuçlarına ait grafik de Şekil 4.1'de verilmiştir. Nitrit-nitrat sonuçlarının birimi μM 'dır.

Çizelge 4.1: Nitrit –Nitrat Sonuçları

(Tablo içindeki n değeri her grup içinde yer alan denek sayısını göstermektedir.)

Grup no	n	Ortalama \pm Standart Hata	Ortalama İçin % 95 Güven Aralığı	
			Alt sınır	Üst sınır
1	7	16,61 \pm 1,10	13,91	19,32
2	8	41,48 \pm 5,52	28,43	54,54
3	8	19,10 \pm 1,83	14,76	23,43
4	8	15,90 \pm 2,25	10,57	21,23
5	8	38,97 \pm 3,95	29,64	48,30
6	8	19,78 \pm 2,16	14,68	24,89
7	8	27,78 \pm 1,83	23,46	32,10
8	8	27,86 \pm 2,23	22,58	33,15
9	8	36,67 \pm 2,19	31,48	41,86



Şekil 4.1 Nitrit-Nitrat Grafiği (Grafikte X eksenini çalışma gruplarını, Y eksenini ise ortalama için % 95 güven aralığını göstermektedir.)

Nitrit-nitrat çalışmamızın sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde nitrit- nitrat değerleri açısından çalışma grupları arasında fark olduğu gözlemlendi ve anlamlılık değeri $p= 0,000$ olarak bulundu.

Çalışma grupları, nitrit-nitrat sonuçları açısından birbirleriyle karşılaştırıldığında 1. ve 2. gruplar ($p= 0,000$), 1. ve 5. gruplar ($p= 0,000$), 1. ve 9. gruplar ($p= 0,000$), 2. ve 3. gruplar ($p= 0,000$), 2. ve 4. gruplar ($p= 0,000$), 2. ve 6. gruplar ($p= 0,000$), 2. ve 7. gruplar ($p= 0,033$), 2. ve 8. gruplar ($p= 0,035$), 3. ve 5. gruplar ($p= 0,000$), 3. ve 9. gruplar ($p= 0,002$), 4. ve 5. gruplar ($p= 0,000$), 4. ve 9. gruplar ($p= 0,000$), 5. ve 6. gruplar ($p= 0,000$), ve 6. ve 9. gruplar ($p= 0,003$) arasında fark bulundu.

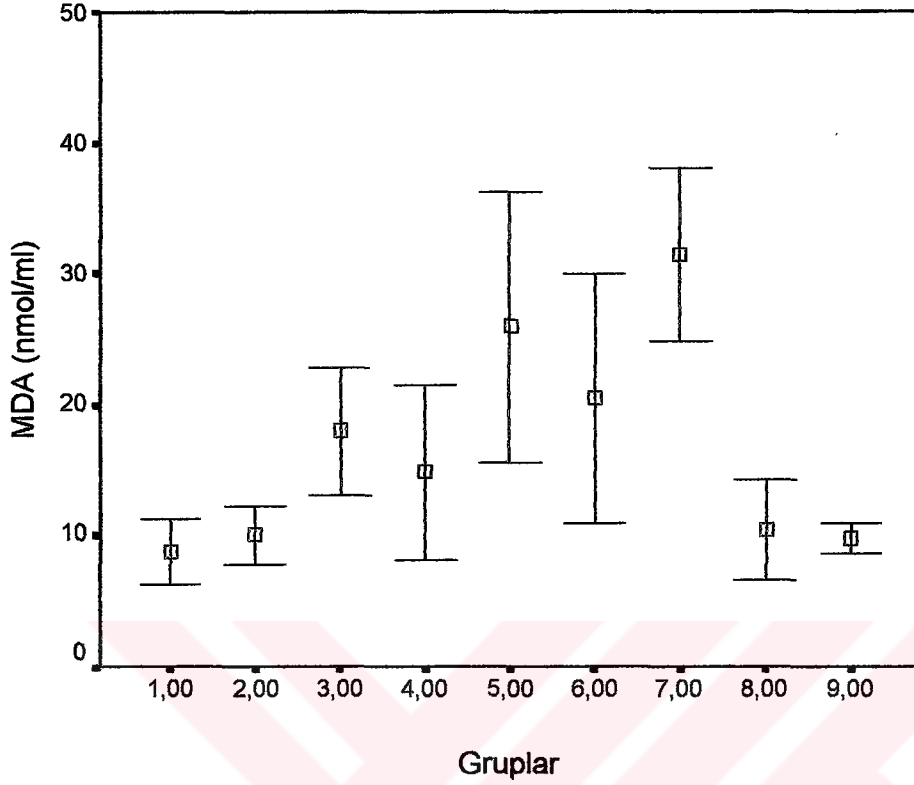
4.1.2. MALONDİALDEHİT SONUÇLARI:

Malondialdehit sonuçlarının her çalışma grubundaki ortalama (mean), standart hata (standart error = SE), ve ortalama için % 95 güven aralığı (95% confidence interval for mean = 95% CI) değerleri Çizelge 4.2 'de verilmiştir. Yine MDA sonuçlarına ait grafik de Şekil 4.2 'de verilmiştir. MDA sonuçlarının birimi nmol/ml'dir.

Çizelge 4.2: Malondialdehit Sonuçları

(Tablo içindeki n değeri her grup içinde yer alan denek sayısını göstermektedir.)

Grup no	n	Ortalama \pm Standart Hata	Ortalama İçin % 95 Güven Aralığı	
			Alt sınır	Üst sınır
1	7	8,83 \pm 1,01	6,35	11,31
2	8	10,05 \pm 0,94	7,83	12,28
3	8	17,98 \pm 2,08	13,06	22,90
4	8	14,83 \pm 2,84	8,12	21,54
5	8	25,94 \pm 4,37	15,61	36,26
6	8	20,48 \pm 4,04	10,91	30,04
7	8	31,39 \pm 2,80	24,76	38,01
8	8	10,43 \pm 1,62	6,61	14,25
9	8	9,75 \pm 0,47	8,64	10,87



Şekil 4.2: MDA Grafiği (Grafikte X eksenini çalışma gruplarını, Y eksenini ise ortalama için % 95 güven aralığını göstermektedir.)

Malondialdehit çalışmamızın sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde malondialdehit değerleri açısından çalışma grupları arasında fark olduğu gözlemlendi ve anlamlılık değeri $p=0,000$ olarak bulundu.

Çalışma grupları, malondialdehit sonuçları açısından birbirleriyle karşılaştırıldığında 1. ve 5. gruplar ($p=0,001$), 1. ve 7. gruplar ($p=0,000$), 2. ve 5. gruplar ($p=0,002$), 2. ve 7. gruplar ($p=0,000$), 3. ve 7. gruplar ($p=0,015$), 4. ve 7. gruplar ($p=0,001$), 5. ve 8. gruplar ($p=0,003$), 5. ve 9. gruplar ($p=0,001$), 7. ve 8. gruplar ($p=0,000$), ve 7. ve 9. gruplar ($p=0,000$) arasında fark bulundu.

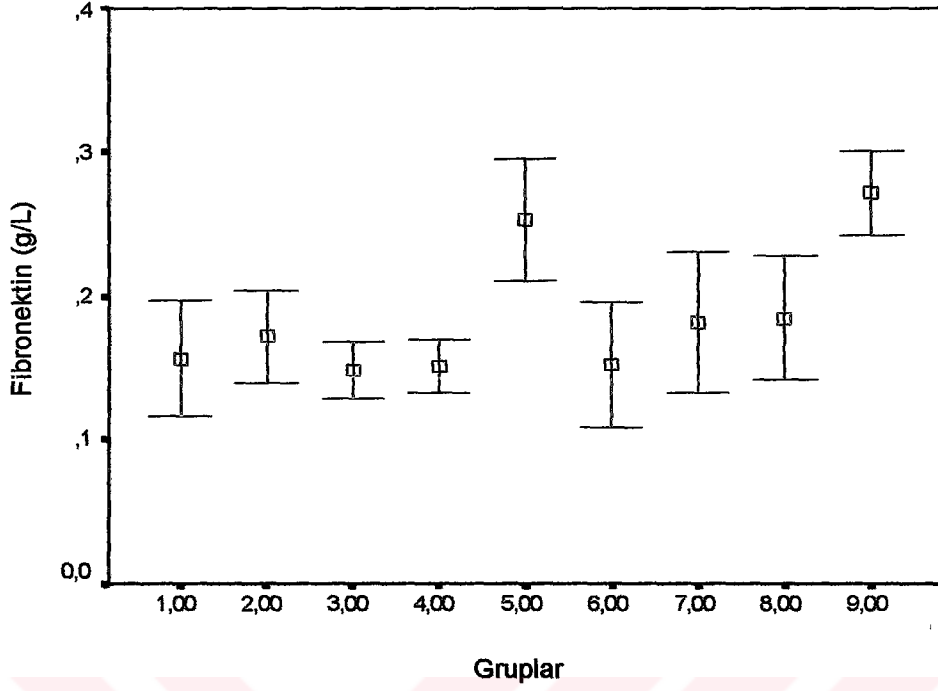
4.1.3. FİBRONEKTİN SONUÇLARI:

Fibronektin sonuçlarının her çalışma grubundaki ortalama (mean), standart hata (standart error = SE), ve ortalama için % 95 güven aralığı (95% confidence interval for mean = 95% CI) değerleri Çizelge 4.3'de verilmiştir. Yine fibronektin sonuçlarına ait grafik de Şekil 4.3 'de verilmiştir. Fibronektin sonuçlarının birimi g/L'dir.

Çizelge 4.3: Fibronektin Sonuçları

(Tablo içindeki n değeri her grup içinde yer alan denek sayısını göstermektedir.)

Grup no	n	Ortalama ± Standart Hata	Ortalama İçin % 95 Güven Aralığı	
			Alt sınır	Üst sınır
1	7	0,16 ± 0,02	0,12	0,20
2	8	0,17 ± 0,01	0,14	0,20
3	8	0,15 ± 0,01	0,13	0,17
4	8	0,15 ± 0,01	0,13	0,17
5	8	0,25 ± 0,02	0,21	0,29
6	8	0,15 ± 0,02	0,11	0,20
7	8	0,18 ± 0,02	0,13	0,23
8	8	0,18 ± 0,02	0,14	0,23
9	8	0,27 ± 0,01	0,24	0,30



Şekil 4.3: Fibronektin Grafiği (Grafikte X eksenini çalışma gruplarını, Y eksenini ise ortalama için % 95 güven aralığını göstermektedir.)

Fibronektin çalışmamızın sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde fibronektin değerleri açısından deney çalışma grupları arasında fark olduğu gözlemlendi ve anlamlılık değeri $p=0,000$ olarak bulundu.

Çalışma grupları, fibronektin sonuçları açısından birbirleriyle karşılaştırıldığında 1. ve 5. gruplar ($p=0,002$), 1. ve 9. gruplar ($p=0,000$), 2. ve 5. gruplar ($p=0,011$), 2. ve 9. gruplar ($p=0,001$), 3. ve 5. gruplar ($p=0,000$), 3. ve 9. gruplar ($p=0,000$), 4. ve 5. gruplar ($p=0,000$), 4. ve 9. gruplar ($p=0,000$), 5. ve 6. gruplar ($p=0,001$), 5. ve 7. gruplar ($p=0,041$), 6. ve 9. gruplar ($p=0,000$), 7. ve 9. gruplar ($p=0,003$), ve 8. ve 9. gruplar ($p=0,005$) arasında fark bulundu.

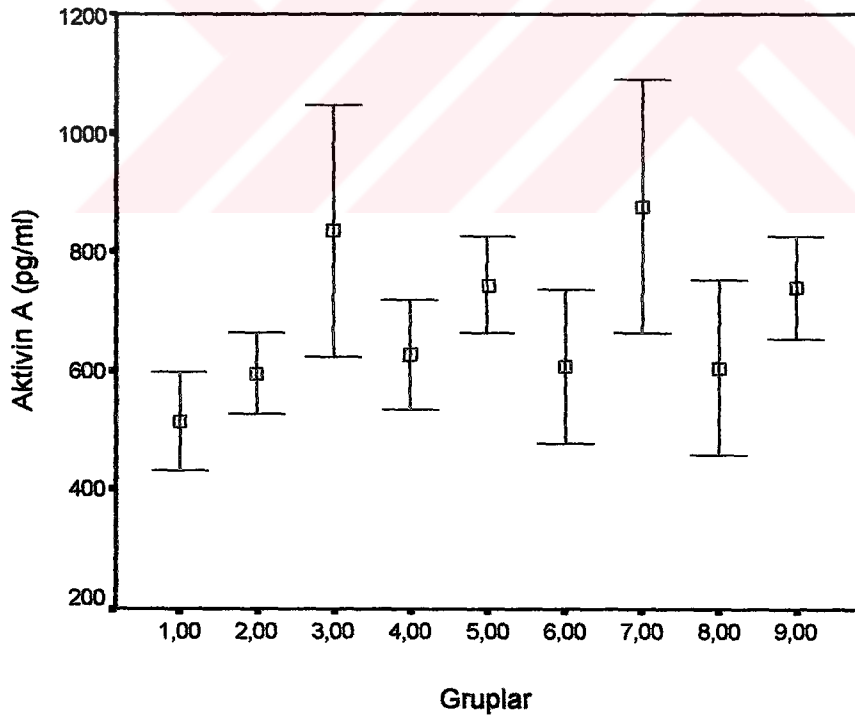
4.1.4. AKTİVİN A SONUÇLARI:

Aktivin A sonuçlarının her çalışma grubundaki ortalama (mean), standart hata (standart error = SE), ve ortalama için % 95 güven aralığı (95% confidence interval for mean = 95% CI) değerleri Çizelge 4.4 'de verilmiştir. Yine aktivin A sonuçlarına ait grafik de Şekil 4.4 'de verilmiştir. Aktivin A sonuçlarının birimi pg/ml'dir.

Çizelge 4.4 : Aktivin A Sonuçları

(Tablo içindeki n değeri her grup içinde yer alan denek sayısını göstermektedir.)

Grup no	n	Ortalama \pm Standart Hata	Ortalama İçin % 95 Güven Aralığı	
			Alt sınır	Üst sınır
1	7	514,29 \pm 33,90	431,34	597,23
2	8	595,16 \pm 28,99	526,61	663,71
3	8	835,50 \pm 89,59	623,66	1047,34
4	8	626,05 \pm 39,28	533,16	718,94
5	8	743,93 \pm 34,38	662,62	825,23
6	8	606,56 \pm 54,91	476,72	736,40
7	8	876,15 \pm 90,39	662,42	1089,88
8	8	604,69 \pm 62,41	457,12	752,26
9	8	738,66 \pm 36,23	653,00	824,32



Şekil 4.4: Aktivin A Grafiği (Grafikte X eksenini çalışma gruplarını, Y eksenini ise ortalama için % 95 güven aralığını göstermektedir.)

Aktivin A çalışmamızın sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde aktivin A değerleri açısından deney çalışma grupları arasında fark olduğu gözlemlendi ve anlamlılık değeri $p=0,000$ olarak bulundu.

Çalışma grupları, aktivin A sonuçları açısından birbirleriyle karşılaştırıldığında 1. ve 3. gruplar ($p=0,008$), 1. ve 7. gruplar ($p=0,002$), 2. ve 7. gruplar ($p=0,024$), 6. ve 7. gruplar ($p=0,036$), ve 7. ve 8. gruplar ($p=0,033$) arasında fark bulundu.

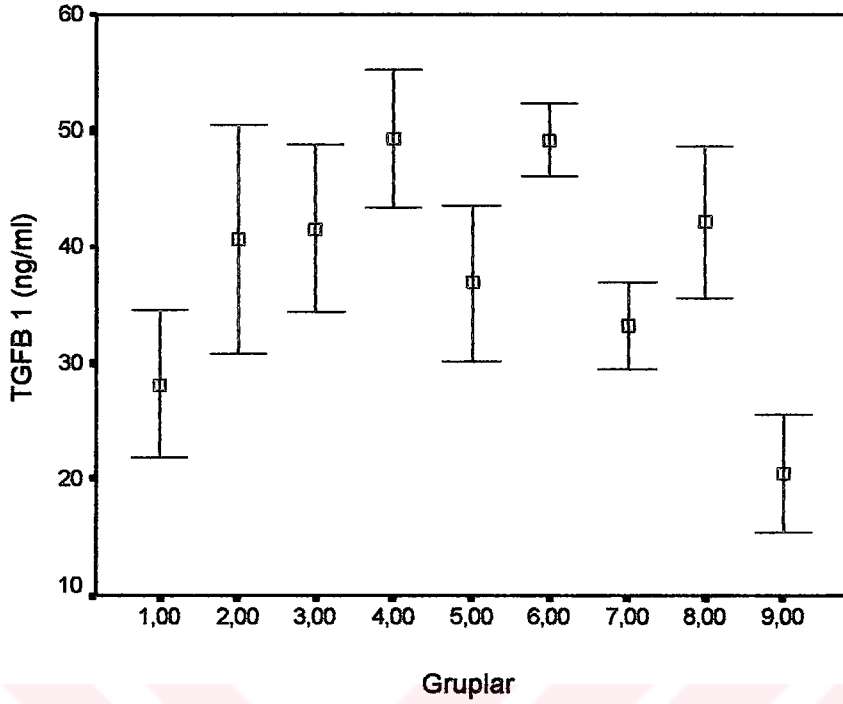
4.1.5. TGF $\beta 1$ SONUÇLARI:

TGF $\beta 1$ sonuçlarının her çalışma grubundaki ortalama (mean), standart hata (standart error = SE), ve ortalama için % 95 güven aralığı (95% confidence interval for mean = 95% CI) değerleri Çizelge 4.5 'de verilmiştir. Yine TGF $\beta 1$ sonuçlarına ait grafik de Şekil 4.5 'de verilmiştir. TGF $\beta 1$ sonuçlarının birimi ng/ml'dir.

Çizelge 4.5: TGF $\beta 1$ Sonuçları

(Tablo içindeki n değeri her grup içinde yer alan denek sayısını göstermektedir.)

Grup no	n	Ortalama \pm Standart Hata	Ortalama İçin % 95 Güven Aralığı	
			Alt sınır	Üst sınır
1	7	28,16 \pm 2,60	21,80	34,53
2	8	40,68 \pm 4,19	30,77	50,59
3	8	41,59 \pm 3,07	34,33	48,84
4	8	49,34 \pm 2,49	43,46	55,23
5	8	36,87 \pm 2,82	30,19	43,55
6	8	49,16 \pm 1,33	46,03	52,29
7	8	33,26 \pm 1,59	29,50	37,02
8	8	42,17 \pm 2,75	35,67	48,67
9	8	20,57 \pm 2,15	15,49	25,64



Şekil 4.5: TGF β1 Grafiği (Grafikte X ekseninde çalışma gruplarını, Y ekseninde ise ortalama için % 95 güven aralığını göstermektedir.)

TGF β1 çalışmamızın sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde TGF β1 değerleri açısından deney çalışma grupları arasında fark olduğu gözlemlendi ve anlamlılık değeri $p=0,000$ olarak bulundu.

Çalışma grupları, TGF β1 sonuçları açısından birbirleriyle karşılaştırıldığında 1. ve 2. gruplar ($p=0,050$), 1. ve 3. gruplar ($p=0,027$), 1. ve 4. gruplar ($p=0,000$), 1. ve 6. gruplar ($p=0,000$), 1. ve 8. gruplar ($p=0,017$) arasında fark bulundu. Ayrıca 2. ve 9. gruplar ($p=0,000$), 3. ve 9. gruplar ($p=0,000$), 4. ve 5. gruplar ($p=0,038$), 4. ve 7. gruplar ($p=0,002$), 4. ve 9. gruplar ($p=0,000$), 5. ve 6. gruplar ($p=0,043$), 5. ve 9. gruplar ($p=0,002$), 6. ve 7. gruplar ($p=0,002$), 6. ve 9. gruplar ($p=0,000$), 7. ve 9. gruplar ($p=0,033$), ve 8. ve 9. gruplar ($p=0,000$) arasında da fark bulundu.

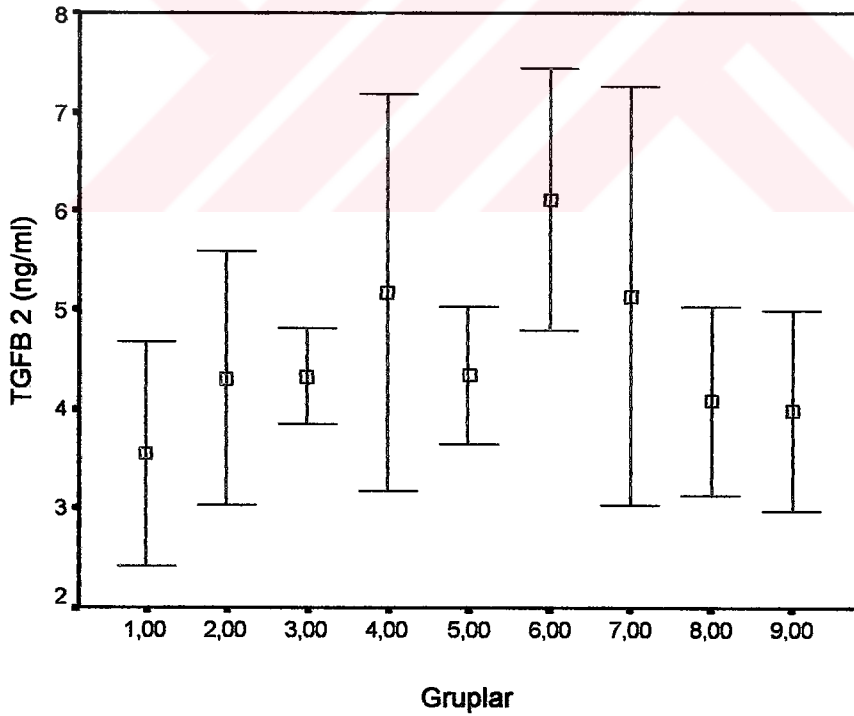
4.1.6. TGF β2 SONUÇLARI:

TGF β2 sonuçlarının her çalışma grubundaki ortalama (mean), standart hata (standart error = SE), ve ortalama için % 95 güven aralığı (95% confidence interval for mean = 95% CI) değerleri Çizelge 4.6 'da verilmiştir. Yine TGF β2 sonuçlarına ait grafik de Şekil 4.6 'da verilmiştir. TGF β2 sonuçlarının birimi ng/ml'dir.

Çizelge 4.6: TGF β 2 Sonuçları

(Tablo içindeki n değeri her grup içinde yer alan denek sayısını göstermektedir.)

Grup no	n	Ortalama \pm Standart Hata	Ortalama İçin % 95 Güven Aralığı	
			Alt sınır	Üst sınır
1	7	3,55 \pm 0,46	2,42	4,68
2	8	4,31 \pm 0,54	3,03	5,60
3	8	4,33 \pm 0,21	3,84	4,82
4	8	5,18 \pm 0,85	3,17	7,19
5	8	4,34 \pm 0,29	3,65	5,03
6	8	6,12 \pm 0,56	4,80	7,45
7	8	5,14 \pm 0,89	3,03	7,26
8	8	4,09 \pm 0,40	3,14	5,04
9	8	3,98 \pm 0,43	2,97	5,00



Şekil 4.6: . TGF β 2 Grafiği (Grafikte X eksenini çalışma gruplarını, Y eksenini ise ortalama için % 95 güven aralığını göstermektedir.)

TGF β 2 çalışmamızın sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde TGF β 2 değerleri açısından deney çalışma grupları arasında fark olmadığı gözlemlendi ve anlamlılık değeri $p=0,074$ olarak bulundu.

Böylece biyokimyasal tüm parametreler için deney çalışma grupları arasındaki farklar one-way ANOVA ve Tukey post-hoc testleri ile değerlendirilmiş oldu. Daha sonra ise aynı grup içindeki farklı parametreler arasındaki ilişkilerin değerlendirilmesinde korelasyon analizi kullanıldı. Korelasyon analizinin sonuçları da yine çizelgeler halinde verildi. Çizelgelerde yer alan p değeri anlamlılık (significance) değerini, r değeri ise korelasyon katsayısını (Pearson coefficient of correlation) ifade etmektedir. Çalışmada anlamlılık değeri olarak $p < 0,05$, korelasyon katsayısı değeri olarak ise $r > 0,50$ kabul edildi.

Grup I için yapılan korelasyon analizinin sonuçları Çizelge 4.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.7: Grup I’de Değişkenler Arası Korelasyon Analizi Sonuçları

(NN=Nitrit-Nitrat çalışmasını ifade etmektedir.)

		NN	MDA	TGFB1	TGFB2	AKTİVİN A	FİBRONEKTİN
NN	r	1,000	,155	,747	,405	,389	-,062
	p	,	,740	,054	,367	,388	,896
MDA	r	,155	1,000	-,149	-,702	,063	,494
	p	,740	,	,750	,079	,894	,260
TGFB1	r	,747	-,149	1,000	,529	-,091	-,529
	p	,054	,750	,	,222	,846	,222
TGFB2	r	,405	-,702	,529	1,000	,405	-,150
	p	,367	,079	,222	,	,368	,749
AKTİVİN A	r	,389	,063	-,091	,405	1,000	,595
	p	,388	,894	,846	,368	,	,159
FİBRONEKTİN	r	-,062	,494	-,529	-,150	,595	1,000
	p	,896	,260	,222	,749	,159	,

Bu tabloda yer alan p ve r değerlerine göre Grup I’de değişkenler arasında doğrusal bir ilişki olmadığı görüldü.

Grup II için yapılan korelasyon analizinin sonuçları Çizelge 4.8’de verilmiştir.

Çizelge 4.8: Grup II'de Değişkenler Arası Korelasyon Analizi Sonuçları

		NN	MDA	TGFB1	TGFB2	AKTİVİN A	FİBRONEKTİN
NN	r	1,000	-,251	,367	-,540	,562	,768*
	p	,	,548	,371	,167	,147	,026*
MDA	r	-,251	1,000	-,074	-,325	-,694	-,498
	p	,548	,	,862	,432	,056	,209
TGFB1	r	,367	-,074	1,000	-,321	,705	,531
	p	,371	,862	,	,439	,051	,176
TGFB2	r	-,540	-,325	-,321	1,000	-,064	-,438
	p	,167	,432	,439	,	,879	,277
AKTİVİN A	r	,562	-,694	,705	-,064	1,000	,846*
	p	,147	,056	,051	,879	,	,008*
FİBRONEKTİN	r	,768*	-,498	,531	-,438	,846*	1,000
	p	,026*	,209	,176	,277	,008*	,

Bu tabloda yer alan p ve r değerlerine göre Grup II'de Nitrit-nitrat ve fibronektin, ayrıca Aktivin A ve fibronektin değişkenleri arasında doğrusal bir ilişki olduğu görüldü.

Grup III için yapılan korelasyon analizinin sonuçları Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9: Grup III'de Değişkenler Arası Korelasyon Analizi Sonuçları

		NN	MDA	TGFB1	TGFB2	AKTİVİN A	FİBRONEKTİN
NN	r	1,000	,014	-,130	,686	-,366	-,081
	p	,	,975	,758	,060	,373	,848
MDA	r	,014	1,000	,082	,349	,311	-,323
	p	,975	,	,848	,396	,453	,435
TGFB1	r	-,130	,082	1,000	-,177	-,330	,387
	p	,758	,848	,	,675	,425	,343
TGFB2	r	,686	,349	-,177	1,000	-,281	-,582
	p	,060	,396	,675	,	,501	,130
AKTİVİN A	r	-,366	,311	-,330	-,281	1,000	-,381
	p	,373	,453	,425	,501	,	,351
FİBRONEKTİN	r	-,081	-,323	,387	-,582	-,381	1,000
	p	,848	,435	,343	,130	,351	,

Çizelge 4.9’da yer alan p ve r değerlerine göre Grup III’de değişkenler arasında doğrusal bir ilişki olmadığı görüldü.

Grup IV için yapılan korelasyon analizinin sonuçları Çizelge 4.10’da verilmiştir.

Çizelge 4.10: Grup IV’de Değişkenler Arası Korelasyon Analizi Sonuçları

		NN	MDA	TGFB1	TGFB2	AKTİVİN A	FIBRONEKTİN
NN	r	1,000	,852*	,576	-,551	,030	,618
	p	,	,007*	,135	,157	,943	,103
MDA	r	,852*	1,000	,712*	-,460	-,096	,229
	p	,007*	,	,048*	,251	,821	,586
TGFB1	r	,576	,712*	1,000	,124	,296	,473
	p	,135	,048*	,	,771	,477	,237
TGFB2	r	-,551	-,460	,124	1,000	,212	-,127
	p	,157	,251	,771	,	,614	,765
AKTİVİN A	r	,030	-,096	,296	,212	1,000	,521
	p	,943	,821	,477	,614	,	,186
FIBRONEKTİN	r	,618	,229	,473	-,127	,521	1,000
	p	,103	,586	,237	,765	,186	,

Çizelge 4.10’da yer alan p ve r değerlerine göre Grup IV’de nitrit-nitrat ve MDA, ayrıca MDA ve TGF β1 değişkenleri arasında doğrusal bir ilişki olduğu görüldü.

Grup V için yapılan korelasyon analizinin sonuçları Çizelge 4.11’de verilmiştir.

Çizelge 4.11: Grup V’de Değişkenler Arası Korelasyon Analizi Sonuçları

		NN	MDA	TGFB1	TGFB2	AKTİVİN A	FIBRONEKTİN
NN	r	1,000	,720*	,008	,124	-,483	,576
	p	,	,044*	,986	,770	,225	,135
MDA	r	,720*	1,000	,403	-,030	-,522	,579
	p	,044*	,	,323	,943	,184	,133
TGFB1	r	,008	,403	1,000	,131	-,559	-,224
	p	,986	,323	,	,758	,150	,593
TGFB2	r	,124	-,030	,131	1,000	,096	-,201
	p	,770	,943	,758	,	,820	,632
AKTİVİN A	r	-,483	-,522	-,559	,096	1,000	-,500
	p	,225	,184	,150	,820	,	,207
FIBRONEKTİN	r	,576	,579	-,224	-,201	-,500	1,000
	p	,135	,133	,593	,632	,207	,

Çizelge 4.11’de yer alan p ve r değerlerine göre Grup V’de nitrit-nitrat ve MDA değişkenleri arasında doğrusal bir ilişki olduğu görüldü. Ayrıca bu sonuçla Grup IV’de gözlenen ilişkinin tekrarlandığı izlendi.

Grup VI için yapılan korelasyon analizinin sonuçları Çizelge 4.12’de verilmiştir.

Çizelge 4.12: Grup VI’da Değişkenler Arası Korelasyon Analizi Sonuçları

		NN	MDA	TGFB1	TGFB2	AKTİVİN A	FİBRONEKTİN
NN	r	1,000	,189	-,174	-,297	-,198	,478
	p	,	,654	,680	,475	,639	,231
MDA	r	,189	1,000	-,365	,293	,215	,135
	p	,654	,	,373	,481	,610	,750
TGFB1	r	-,174	-,365	1,000	,269	-,168	,348
	p	,680	,373	,	,520	,691	,399
TGFB2	r	-,297	,293	,269	1,000	,439	-,268
	p	,475	,481	,520	,	,277	,521
AKTİVİN A	r	-,198	,215	-,168	,439	1,000	-,629
	p	,639	,610	,691	,277	,	,095
FİBRONEKTİN	r	,478	,135	,348	-,268	-,629	1,000
	p	,231	,750	,399	,521	,095	,

Çizelge 4.12’de yer alan p ve r değerlerine göre Grup VI’da değişkenler arasında doğrusal bir ilişki olmadığı görüldü.

Grup VII için yapılan korelasyon analizinin sonuçları Çizelge 4.13’de verilmiştir.

Çizelge 4.13: Grup VII'de Değişkenler Arası Korelasyon Analizi Sonuçları

		NN	MDA	TGFB1	TGFB2	AKTİVİN A	FİBRONEKTİN
NN	r	1,000	-,392	,455	-,035	,625	,815*
	p	,	,337	,257	,934	,097	,014*
MDA	r	-,392	1,000	-,640	-,024	,003	-,714*
	p	,337	,	,088	,955	,995	,047*
TGFB1	r	,455	-,640	1,000	-,059	,444	,790*
	p	,257	,088	,	,890	,270	,020*
TGFB2	r	-,035	-,024	-,059	1,000	-,239	,191
	p	,934	,955	,890	,	,569	,650
AKTİVİN A	r	,625	,003	,444	-,239	1,000	,414
	p	,097	,995	,270	,569	,	,308
FİBRONEKTİN	r	,815*	-,714*	,790*	,191	,414	1,000
	p	,014*	,047*	,020*	,650	,308	,

Çizelge 4.13'de yer alan p ve r değerlerine göre Grup VII'de Nitrit-nitrat ve fibronectin, MDA ve fibronectin, TGF β 1 ve fibronectin değişkenleri arasında doğrusal bir ilişki olduğu görüldü.

Grup VIII için yapılan korelasyon analizinin sonuçları Çizelge 4.14'de verilmiştir.

Çizelge 4.14: Grup VIII'de Değişkenler Arası Korelasyon Analizi Sonuçları

		NN	MDA	TGFB1	TGFB2	AKTİVİN A	FİBRONEKTİN
NN	r	1,000	,134	,387	,232	,039	,234
	p	,	,751	,344	,580	,926	,577
MDA	r	,134	1,000	,392	-,205	,687	-,611
	p	,751	,	,337	,626	,060	,108
TGFB1	r	,387	,392	1,000	-,727*	,061	-,034
	p	,344	,337	,	,041*	,886	,937
TGFB2	r	,232	-,205	-,727*	1,000	-,197	,178
	p	,580	,626	,041*	,	,640	,674
AKTİVİN A	r	,039	,687	,061	-,197	1,000	-,752*
	p	,926	,060	,886	,640	,	,032*
FİBRONEKTİN	r	,234	-,611	-,034	,178	-,752*	1,000
	p	,577	,108	,937	,674	,032*	,

Çizelge 4.14’de yer alan p ve r değerlerine göre Grup VIII’de , Aktivin A ve fibronektin, TGF β 1 ve TGF β 2 değişkenleri arasında doğrusal bir ilişki olduğu görüldü.

Grup IX için yapılan korelasyon analizinin sonuçları Çizelge 4.15’de verilmiştir.

Çizelge 4.15: Grup IX’da Değişkenler Arası Korelasyon Analizi Sonuçları

		NN	MDA	TGFB1	TGFB2	AKTİVİN A	FİBRONEKTİN
NN	r	1,000	,088	-,297	-,043	,179	,212
	p	,	,836	,476	,920	,671	,615
MDA	r	,088	1,000	-,511	,210	,133	-,374
	p	,836	,	,196	,617	,753	,361
TGFB1	r	-,297	-,511	1,000	,116	,304	-,111
	p	,476	,196	,	,785	,465	,794
TGFB2	r	-,043	,210	,116	1,000	,251	,050
	p	,920	,617	,785	,	,548	,906
AKTİVİN A	r	,179	,133	,304	,251	1,000	-,151
	p	,671	,753	,465	,548	,	,721
FİBRONEKTİN	r	,212	-,374	-,111	,050	-,151	1,000
	p	,615	,361	,794	,906	,721	,

Çizelge 4.15’de yer alan p ve r değerlerine göre Grup IX’da değişkenler arasında doğrusal bir ilişki olmadığı görüldü.

5. TARTIŞMA

Deneysel olarak beyin ve kalpte iskemik etkiler kolayca oluşturulabilmektedir. İskeminin ve özellikle son yıllarda da reperfüzyonun olumsuz etkileri çeşitli deneysel model ve incelemeler ile ortaya konmaktadır (104,105). Periferik sinirler ise beyin dokusuna göre oldukça dirençlidir; bunun nedeni enerji gereksinimlerinin düşük olması, ekstra ve intranöral yaygın vasküler anastomozlar içermesi ve anaerobik metabolizma ile yaşayabilme yeteneğidir (106-108). Bu nedenle önceki yıllarda yapılan periferik sinirde deneysel iskemi oluşturma çalışmaları başarısız olmuştur. Periferik sinirde iskemi ve sonrasında ortaya çıkan reperfüzyon hasarının etkilerinin gösterilebilmesi için tama yakın ve reversibl iskemi oluşturabilecek model arayışları sürmektedir (66, 109-111). Korthals, kedilerde oluşturduğu modelde , aynı anda aorta ve femoral arter ligasyonu ile siyatik sinir distali, tibial ve peroneal sinirlerin alt kısımlarında aksoplazmik yavaşlama, organellerin birikimi ve santral fasiküler nekroz gibi iskemik değişiklikler ortaya çıktığını göstermiştir (112). Hess ise, tavşanlarda oluşturduğu modelde, internal ve eksternal iliak arterlerin ayrı ayrı ya da birlikte ligasyonunun siyatik sinirde, sinirin dallarında ve kaslarda iskemik lezyonlar oluşturduğunu ortaya koymuştur (113). Schmelzer ve arkadaşlarının geliştirdiği 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 (114). 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 bloku ortaya çıkmaktadır. Reperfüzyon yetmezliği 1 saatlik iskemiden sonra belirlemekte ve 3 saatlik iskemi sonrası belirginleşmektedir (114).

Periferik sinirde iskemi ve reperfüzyon hasarlarını araştırma amacıyla ratlarda yapılan çalışmaların ortak yönü standart bir model ortaya konulamamış olmasıdır (13, 113, 114). Bu nedenle, bu deneysel çalışmanın amaçlarından biri de kolay uygulanabilir ve amacına uygun bir periferik sinir iskemi-reperfüzyon modelinin ortaya konulmasıdır. Bunun için damar anevrizma klipsleri kullanılarak femoral arter ve venin kan akımı 3 saat süreyle engellenmiştir. İskemi süresinin 3 saat olarak seçilmesinin nedeni önceki

çalışmalarda rat siyatik sinirinde patolojik değişikliklerin ortaya çıkmaya başladığı kritik iskemi sınırının 3 saat olarak bulunmuş olmasıdır (115, 116, 117).

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. İskemi ve reperfüzyon süreleri kritik değeri aşınca ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri öncelikle hücre membranlarını hedef seçerek intranöral mikrosirkülasyonun yapı ve bütünlüğünü bozmaktadır (118, 119). Çalışmamızda 3 saat süreyle total iskemiye maruz bırakılan ve iskemi sonrası değişen sürelerde reperfüzyona bırakılan periferik sinirlerde oksidatif stres ve lipid peroksidasyon ürünleri, adezyon molekülleri, ve sitokinler biyokimyasal olarak incelenmiş ve değerlendirilmiştir.

Çalışmada incelenen tüm biyokimyasal parametrelerin düzeylerinin yalnızca iskemi uygulanan grupta (Grup II), iskemi ve reperfüzyon uygulanmamış gruba (Grup I, kontrol) göre yüksek düzeylerde olduğu gözlenmiştir. İskemik periyotta oksidatif stresin bir göstergesi olan nitrik oksit son ürünleri olan nitrit ve nitrat düzeylerindeki artış özellikle belirgindir. Bu artışın nedeni iskeminin yol açtığı doku kanlanmasındaki azalmaya karşı koruyucu bir yanıt olarak vazodilatasyonun sağlanması olabilir. NO vasküler tonusun önemli bir modülatörüdür, guanil siklaz aktivasyonu yoluyla vazodilatasyon yapmaktadır (120). NO son yıllarda üzerinde sıklıkla çalışılmakta olan bir moleküldür. Kan basıncının düzenlenmesi ve normal aralıklarda sürdürülebilmesi gibi pek çok fizyolojik durumda hücre sinyal molekülü olarak rol almaktadır. İskemik hasarda ise doku perfüzyonunun sağlanması yoluyla hasarı sınırlayıcı etkisi bulunmaktadır. Burada NO ya direkt olarak iskemik duruma yanıt olarak üretilmekte, ya da daha geç dönemde nöroenflamatuar yanıtın bir parçası olarak ortaya çıkmaktadır (121). Çalışmada iskemik grupta TGF β 1 ve 2 düzeylerinde de kontrol grubuna göre bir artış izlenmiştir. Yine NO'ye benzer şekilde TGF β aktivitesi de iskemik koşullar altında artmaktadır ve bunun da iskemik hasara karşı adaptif bir yanıt olduğu düşünülmektedir (96). Aktivinin de infant ratlarda invitro olarak iskemik beyin hasarını azaltarak, nöronların yaşam süresini uzattığı ve nöronları toksik hasardan koruduğu gözlenmiştir (122). Çalışmamızda da Aktivinin iskemi grubundaki düzeylerinin, reperfüzyon gruplarına göre daha düşük olmasına rağmen, kontrol grubuna göre yükselmiş olduğu izlenmektedir. NO sentazın iskemiye yanıt olarak NO yapımını arttırmak amacıyla

aktivitesinin artmasına paralel olarak fibronektinin ekstrasvazasyonu artmaktadır (84,85). Bu da çalışmamız sırasında izlenen NO'e paralel şekilde artan fibronektin düzeylerini açıklayabilir. İnsan kas dokusunda yapılan bir çalışmada ise NO'in iskemi süresince arttığı ve reperfüzyon sırasında ise normal düzeylere kadar indiği gözlenmiştir. Lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan malondialdehit iskemiden daha çok reperfüzyon sırasında artmaktadır ki bunun nedeni reperfüzyon sırasında meydana gelen peroksidatif reaksiyonlar olabilir (123). Bizim çalışmamızda da MDA değerleri özellikle reperfüzyon sırasında belirgin artış göstermektedir.

Grup III'den IX'a kadar sırasıyla 1 saat, 2 saat, 24 saat, 7 gün, 14 gün, 21 gün ve 28 gün olarak reperfüzyon uygulanan gruplarda da çalışılan biyokimyasal parametrelerde reperfüzyon süresine bağlı olarak artış ve azalışlar izlenmekle birlikte, yine bu serum değerleri de Grup I'deki kontrol değerlerine göre yüksek olarak bulunmuştur. Serum düzeylerindeki reperfüzyon sürelerine bağlı olarak izlenen bu dalgalanmaların nedeni reperfüzyonla birlikte tekrar başlayan kan akımındaki dalgalanmalar olabilir. Zollman ve daha sonra da Kihara reperfüzyon sırasında periferik sinir kan akımındaki artışla birlikte dalgalanmalar olduğunu göstermişlerdir (117, 124).

Nitrik oksit, pek çok dokuda vasküler ve nöral aktiviteleri tetiklemektedir. Ayrıca nörogenezde de önemli bir rol oynamaktadır (125). NO kısa ömürlü bir molekül olması nedeniyle son ürünleri olan nitrit ve nitrat düzeyleri ile değerlendirilmektedir. Çalışmamızda nitrit-nitrat değerleri yalnızca iskemi yapılan grupta oldukça yüksek olarak izlenmektedir. Bu düzey 1 ve 2 saatlik reperfüzyon periyodunda bir miktar düşmekte, ve 24. saatte pik yapmaktadır. Sırasıyla 1,2, ve 3 haftalık reperfüzyon periyodunda biraz azalma izlenen serum düzeylerinde 4. haftada ikinci bir pik izlenmektedir. Iwamoto ve arkadaşlarının farklı dokuda yaptıkları benzer bir çalışmada bu bifazik yükselmelere 10 ve 32. saatlerde rastlanmaktadır (126). Pik görülen sürelerdeki değişiklikler deney modelindeki farklılıktan, iskemi reperfüzyon modelinin uygulandığı dokunun farklı oluşundan veya NO metabolitlerinin ölçümünde kullanılan metodolojik farktan ileri geliyor olabilir. Aynı değişkenin grup içi karşılaştırmasında tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA ve Tukey post- hoc testleri) uygulanmış olup (102), nitrit-nitrat değerlerinde meydana gelen bu değişiklikler istatistiksel olarak incelendiğinde değişik reperfüzyon sürelerine göre ayrılan gruplar arasında fark olduğu gözlenmiştir ($p=0,000$). Çalışma grupları, nitrit-nitrat sonuçları açısından birbirleriyle

karşılaştırıldığında 1. grup ile 2., 5., 9. gruplar arasında, 2. grup ile 3., 4., 6., 7. ve 8. gruplar arasında, 3. grup ile 5. ve 9. gruplar arasında, 4. grup ile 5. ve 9. gruplar arasında, 5. grup ile 6. grup arasında , 6. grup ile 9. grup arasında anlamlı fark bulunmuştur.

Serbest oksijen radikallerinin lipidler ile olan reaksiyonu sonucu meydana gelen lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan malondialdehit düzeyleri ise çalışmamız sırasında 24. saat ve 2. haftada pik yapmakla birlikte, tüm reperfüzyon sürelerinde kontrol grubuna göre yüksek kalmıştır. Nagamatsu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada iskemi reperfüzyon sonrasında lipid peroksitlerin arttığı ve bu artışın 3. saatte en fazla olduğu gösterilmiştir (13). Değerlerdeki yükseklik daha sonra hafif düşüş ve yükselişler göstererek 4 hafta boyunca devam etmiştir (13). Yine Iwamoto ve arkadaşlarının yaptığı bir başka doku çalışmasında ise lipid peroksidasyonu 2. saatte artmaya başlamakta , 8-10. saatlerde pik yapmakta ve 32. saatte kontrol seviyesine inmektedir (126). Ratlarda çeşitli dokularda uygulanan I/R modellerinde genel olarak lipid peroksidasyon ürünlerinin arttığı izlenmekle beraber bu artışların görüldüğü reperfüzyon periyodları değişiklik göstermektedir. Yine burada gözlenen farklılıklarda nitrit-nitrat ölçümlerinde gözlendiği gibi metodolojik farklılıklardan ve reperfüzyon sırasında kan akımında gözlenen dalgalanmalardan ileri geliyor olabilir. MDA değerlerinde görülen bu reperfüzyon grupları arasındaki değişiklikler istatistiksel olarak incelendiğinde gruplar arasında fark olduğu izlenmiştir ($p=0,000$). Çalışma grupları, malondialdehit sonuçları açısından birbirleriyle karşılaştırıldığında 1.grup ile 5. ve 7. gruplar arasında, 2.grup ile 5. ve 7. gruplar arasında, 3. grup ile 7. grup arasında, 4. grup ile 7. grup arasında, 5.grup ile 8. ve 9. gruplar arasında, 7.grup ile 8. ve 9. gruplar) arasında anlamlı fark bulunmuştur.

Bir adezyon molekülü olan ve özellikle periferik sinir iyileşmesinde önemli rol oynayan fibronektin düzeyleri de çalışmamız sırasında incelenmiş olup, NO'e benzer şekilde hem iskemi hem de tüm reperfüzyon periyodlarında kontrol grubuna göre yüksek olarak bulunmuştur. Bu yükselmeler özellikle 24 saat ve 4 haftalık reperfüzyon periyodlarında pik değerlerine ulaşmaktadır. Nitrik oksitle aynı sürelerde görülen serum değerlerindeki bu artış ve azalışlar I/R hasarında kan sinir bariyerinin yıkımıyla meydana gelen NO artışına paralel bir fibronektin ekstrasvazasyonu olduğunu ve her iki parametrenin de nöral hasarı düzeltici rolleri olduğuna işaret etmektedir

(84,85,125).Yapılan bir başka deneysel çalışmada ise fibronektinin veya onun üçlü tripeptit dizisinin (RGD peptit) integrinlere bağlanması ile NOS aktivitesinin arttığı ve NO salınımının gerçekleştiği gösterilmiştir (127). Bir başka hayvan çalışmasında ise, fibronektinin kardiyak infarkt/reperfüzyon modelinde koroner arterin sürekli olarak bağlanması modeline göre çok daha hızlı bir şekilde biriktiği gösterilmiştir. Plazma fibronektininin serebral infarkt sonrasında olduğu gibi myokardiyal infarktta da koruyucu etkisinin olduğu belirtilmektedir (128). Fibronektin değerleri de istatistiksel olarak incelendiğinde çalışma grupları arasında fark olduğu izlenmiştir ($p=0,000$). Çalışma grupları, fibronektin sonuçları açısından birbirleriyle karşılaştırıldığında 1. grup ile 5. ve 9. gruplar arasında, 2. grup ile 5. ve 9. gruplar arasında, 3. grup ile 5. ve 9. gruplar arasında, 4. grup ile 5. ve 9. gruplar arasında, 5. grup ile 6. ve 7. gruplar arasında, 6.grup ile 9. grup arasında, 7. grup ile 9. grup arasında, 8. grup ile 9. grup arasında anlamlı fark bulunmuştur.

Multifonksiyonel büyüme faktörleri olan sitokinler de nöroprotektif ve nörotropik özellikleri nedeniyle çalışmamızda yer almışlardır. Pek çok akut beyin hasarı modelinde Aktivin A regülasyonunun artışı izlenmektedir (129). Periferik sinirde I/R hasarı uyguladığımız deney modelimizde ise Aktivin A hem iskemi , hem de tüm reperfüzyon periyodları süresince kontrol değerlerine göre yüksek olarak tespit edilmiştir. Bu değerler özellikle 1. saat ve 2. hafta olmak üzere iki kez pik yapmaktadır. Çalışmamızda elde edilen bu Aktivin A düzeyleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde tüm deney grupları arasında anlamlı bir farkın olduğu görülmektedir ($p=0,000$). Çalışma grupları, aktivin A sonuçları açısından birbirleriyle karşılaştırıldığında 1. grup ile 3. ve 7. gruplar arasında , 2.grup ile 7. grup arasında, 6. grup ile 7. grup arasında, 7. grup ile 8. grup arasında anlamlı fark bulunmuştur.

TGF β süper ailesinin Aktivin dışındaki diğer bir üyesi TGF β 'nın I/R hasarına karşı farklı organ sistemlerinde koruyucu olduğu gösterilmişse de TGF β aktivitesinin bu olaydaki regülasyonu hakkındaki bilgiler azdır (96). Farklı dokuda yapılmış olan bir çalışmada iskemi reperfüzyonu takiben tüm büyüme faktörlerinde, özellikle de TGF β düzeylerinde artış izlenmiştir. Bu artış 6 saatlik reperfüzyonda kontrol değerine göre oldukça yüksek bulunmuştur (130). Hasarlı sinirlerde TGF β regülasyonunda artış olduğu ise bir başka çalışmada izlenmektedir (131). Bu çalışmada da TGF β 1 ve TGF β 2 yine tüm deney gruplarında çalışılmış olup, her iki parametrenin de hem iskemi hem

de tüm reperfüzyon periyodları süresince kontrollere göre daha yüksek değerlere ulaştığı izlenmiştir. Yine her iki parametre de 2 saat ve 1 haftalık reperfüzyonda pik değerlerine ulaşmışlardır. Bu değişiklikler istatistiksel olarak incelendiğinde TGF $\beta 1$ düzeyleri deney grupları arasında farklı bulunmuştur ($p=0,000$). Çalışma grupları, TGF $\beta 1$ sonuçları açısından birbirleriyle karşılaştırıldığında 1. grup ile 2., 3., 4., 6. ve 8. gruplar arasında anlamlı fark bulundu. Ayrıca 2.grup ile 9. grup arasında, 3.grup ile 9. grup arasında, 4. grup ile 5., 7. ve 9. gruplar arasında , 5. grup ile 6. ve 9. gruplar arasında, 6. grup ile 7. ve 9. gruplar arasında, 7. grup ile 9. grup arasında ve 8. grup ile 9. grup arasında da anlamlı fark bulunmuştur. TGF $\beta 2$ düzeyleri ise iskemi ve tüm reperfüzyon gruplarında kontrol değerlerine göre yükseklik izlenmesine karşın, deney grupları arasında istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır ($p= 0,074$). TGF $\beta 1$ de gözlenen değişikliklerle paralellik gösteren TGF $\beta 2$ düzeylerindeki farkın istatistiksel olarak anlamsız olarak gözlenmesinin nedeni normal ratlardaki TGF $\beta 2$ konsantrasyonunun TGF $\beta 1$ 'e oranla oldukça düşük olması olabilir. Çalışmamız sonrasında elde edilen TGF $\beta 2$ düzeyleri çok dar limitler içinde artış ve azalış göstermiş olduğundan, bu değişiklikler TGF $\beta 1$ 'deki değişikliklere benzer olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Aynı grup içindeki farklı parametreler arasındaki ilişkilerin değerlendirilmesinde korelasyon analizi yapıldığında reperfüzyon sürelerine bağlı olarak bazı parametreler arasında doğrusal ilişkiler olduğu görülmektedir. Kontrol grubu olarak alınan Grup I içinde deney sırasında çalışılan parametreler arasında bir ilişki gözlenmezken ($r<0,50$), iskemi uygulanan Grup II'de nitrit-nitrat ve fibronektin arasında ($r=0,768$), yine benzer şekilde Aktivin-A ve fibronektin arasında ($r=0,846$) ilişki olduğu görülmektedir. NO I/R hasarının şiddetini önlemede önemli bir rol üstlenmektedir. Bunu ise postkapiller venüllerde nötrofil adezyonunu inhibe ederek, ve mikrovasküler konstrüksiyonu önleyerek yapmaktadır (120). Ayrıca ek bir koruyucu etkisi de süperoksit radikallerini inhibe etmesidir. Bu etkisini ise ya direkt olarak süperoksit anyonlarını bir çöpçü gibi temizleyerek ya da membran NADPH oksidaz enzimi üzerinden nötrofil süperoksit anyon üretimini inhibe ederek yapmaktadır (120,132). İskemi reperfüzyon kavramı, periferik sinirler açısından değerlendirildiğinde hasar oluşumunun temel mekanizmalarından serbest oksijen radikallerinin rolü dikkat çekmektedir. Serbest radikal oluşumunda ksantin oksidaz yolu önemli iken, diğer bir kaynak da lökositlerce

üretilen süperoksit anyonudur. İskemi sonrası ortaya çıkan azalmış kan akımıyla reperfüzyon fenomeni'ne lökositlerin persistan adezyonunun yol açtığı düşünülmektedir (133,134). Lökositlerin büyük miktarlarda süperoksit radikali oluşturduğu bilinmekle birlikte, I/R hasarında oynadıkları rol tartışmalıdır. Diğer dokularda yapılan çalışmalarda lökositlerin oynadığı rol üzerine hem lehine, hem de aleyhine yayınlar vardır (10,135). İskemik dokulardaki reperfüzyon sırasında ortaya çıkan mikrovasküler disfonksiyon sonrasında arteriollerde endotel bağımlı bir dilatasyon olmaktadır. Sıvı filtrasyonu meydana gelmekte, kapillerlerde lökosit tıkaçları oluşmaktadır. Postkapiller venüllerden de lökosit ve plazma proteinleri ekstravaze olur (136). Lökositler sitokinlerle etkileşerek endotel hücreleri gibi çeşitli hücrelerdeki adezyon moleküllerinin sentezini arttırmaları. Böylece hasarlı dokuda inflammatuar yanıt başlar (137). Sinir inflammatuar cevabı için de adezyon moleküllerinin ekspresyonunun artması ve lökositlerin sinire olan infiltrasyonunun artması gerekmektedir (16). Bu nedenlerle lökositler bir yandan sinir inflammatuar yanıtında rol üstlenirken , diğer yandan da süperoksit anyonu üreterek I/R hasarını tetiklemektedirler. NO'in ise bu hasarı önlemek amaçlı postkapiller venüllerdeki nötrofil adezyonunu, iskemi sırasında oluşan süperoksit radikallerini, nötrofil süperoksit anyon üretimini inhibe ederek ve ayrıca vazodilatatör etkiyle kan akımını artırarak etki göstermekte olduğu söylenebilir. NO 'in nöral hasarı iyileştirici yöndeki bu etkisine benzer şekilde fibronektinin de sinir iyileşmesinde önemli rolü mevcuttur. Yapılan bir sinir iyileşme modeline göre mükemmel bir periferik sinir iyileşmesi için proksimal ve distal sinir uçlarında asellüler fibrin köprüsü olmalıdır. Fibrin non-nöronal hücrelerin yani Schwann hücreleri ve fibroblastların bu alana migrasyonunu tetikler. İşte bu tamir esnasında asellüler matrikste fibronektin bulunmaktadır. Fibronektin tek başına veya kendisi gibi bir başka ECM adesiv proteini olan lamininle birlikte Schwann hücrelerinin migrasyonunu artırır (138). Fibronektinin sinir tamir sürecinde rol alışı ile kan sinir bariyerinin yıkımıyla sentezi artan NO etkisinin gözlenmesi aşağı yukarı benzer zamanlara rastlamaktadır (84,85). Aktivin de fibronektine benzer şekilde etki eden bir sitokindir. Aktivin A yara iyileşmesinde rolü olan potent bir stimulatördür. Nöronal hasardaki erken hücreyel yanıtta da önemli rol oynamaktadır. Hasardan sonraki birkaç saat içinde Aktivin mRNA ve protein ekspresyonu belirgin olarak artmaktadır (91). Aktivinlerin yara iyileşmesinde keratinosit proliferasyonu ve fibroblast fenotipinin regülasyonu gibi görevleri mevcuttur

(91). Tüm bu nedenler çalışmamızda gözlediğimiz fibronektin ve NO, ve yine fibronektin ve Aktivin A ilişkisini açıklayabilmektedir. Çalışmamızda yer vermiş olduğumuz her üç parametrenin de I/R hasarı tedavisinde yer alabileceğine ait çalışmalar vardır (87,88). IR hasarı tedavisinde sentetik fibronektin peptitleri kullanılması denenmektedir. Etki mekanizması tam olarak anlaşılmasa da erken dönemde kullanıldığında lökosit birikiminin azaldığı, infarkt alanının küçüldüğü ve nörolojik disfonksiyonun azaldığı izlenmiştir (87,88). IR hasarında yine NO inhalasyon ve İV olarak denenmiştir ve oksijenlenmenin düzeldiği gözlenmiştir. Adezyon molekül salınışını, nötrofil aktivasyonu ve kemotaksisini inhibe edici etkisi nedeniyle IR hasarında denenmektedir (61,73,74,75). Benzer şekilde ekzojen yolla verilen Aktivin A'nın da nöronları akut hücre ölümüne karşı koruyabileceği yolunda çalışmalar vardır (91). I/R hasarının nedenleri henüz tam anlaşılammış olduğundan ve bu konu üzerindeki çalışmalar devam ettiğinden dolayı hasarın tedavisi de henüz hipotezler aşamasında kalmaktadır.

Çalışmamızda 1 saat reperfüzyona bıraktığımız grupta da parametreler arasında bir ilişki gözlenmezken ($r < 0,50$), 2 saatlik reperfüzyon grubunda NO ve MDA ($r = 0,852$), yine MDA ve TGF $\beta 1$ arasında ($r = 0,712$) bir ilişkiye rastlanmaktadır. I/R hasarında mikrosirkülasyonun tüm segmentlerindeki aktive endotel hücreleri reperfüzyonun başlangıç periyodunda fazla miktarda serbest oksijen radikali üretir ama NO düzeyleri bu aşamada çalışmamızda da gözlendiği gibi düşüktür. Süperoksit radikali ve NO arasındaki bu dengesizlik adezyon molekülleri ve sitokinler gibi inflamatuvar moleküllerin salınışına yol açar (134). Reperfüzyonun ilerleyen aşamasında ise süperoksit anyonlarını temizlemek amacıyla NO düzeyi giderek artmaktadır. Lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan malondialdehit düzeyleri, I/R hasarında yüksek düzeydeki serbest oksijen radikali varlığında bunların lipidlerle olan reaksiyonu sonucu artmaktadır. Lipid peroksidasyonunda gözlenen bu artış da ek olarak hasara neden olmaktadır (61,68). NO ise serbest oksijen radikallerini temizlemek suretiyle bunların lipid peroksidasyonu yoluna gitmesini ve dolayısıyla MDA düzeylerini azaltmaktadır. Çalışmamızda da MDA düzeyleri reperfüzyonun başlangıcındaki yüksek SOR nedeniyle yüksek bulunmuştur. NO ile olan ilişkisi nedeniyle serum MDA düzeyleri dalgalanmalar göstermektedir. Multifonksiyonel sitokinlerden olan TGF $\beta 1$ ve 2 özellikle nöron yaşam süresinde önemli regülatörlerdir (139). Sitokinler

nörodejenerasyonda rol alırlar ve TGF β primer olarak nöroprotektif etkilidir (98). Bu nedenlerle reperfüzyonun ilerleyen aşamalarında TGF β olaya katılarak I/R hasarına karşı bir koruyucu olarak ortaya çıkmaktadır (96).

Çalışmamızdaki bir diğer grup olan 24 saatlik reperfüzyon uygulanan grupta ise daha önceki grupta izlenen NO- MDA arasındaki ilişkinin devam ettiği gözlemlendi ($r=0,720$). 1 haftalık reperfüzyon uygulanan grupta yine parametreler arasında bir ilişki gözlenmezken ($r<0,50$), 2 haftalık reperfüzyon periyodunda NO- fibronektin ($r=0,815$), MDA- fibronektin ($r=-0,714$) ve TGF $\beta 1$ - fibronektin ($r=0,790$) arasında bir ilişki olduğu görüldü. 2 haftalık reperfüzyon periyodunda daha önce azalmaya başlayan MDA değerleri yeniden pik yapmaktadır. Bu durum sinir kan akımındaki dalgalanmalardan kaynaklanıyor olabilir. Bu dönemde NO, fibronektin ve TGF $\beta 1$ ise hasarı önlemek amacıyla yer almış olabilirler. 3 haftalık reperfüzyon grubunda da TGF $\beta 1$ ve TGF $\beta 2$ arasında ($r=-0,727$), ayrıca fibronektin ve aktivin arasında ($r=-0,752$) bir ilişki olduğu izlenmektedir. Adezyon molekülleri ve sitokinler reperfüzyonun ileri aşamasında tamamen tamire yönelik olarak rol almış olabilirler. Bu durum da tıpkı fibronektin ve aktivinde olduğu gibi TGF $\beta 1$ ve TGF $\beta 2$ 'nin de I/R hasarı tedavisinde yer alabileceği sonucunu ortaya çıkarabilmektedir. Son çalışma grubumuz olan 4 haftalık reperfüzyon periyodunda ise yine parametreler arasında bir ilişki gözlenmemektedir ($r<0,50$), ve bu durum da bize hasarın artık iyileşme sürecine girdiğini gösterebilir. Çünkü periferik sinirde nöronal iyileşme 21. günde tamamlanmaktadır. Yapılan bir çalışmada 3 saatlik iskemiye takiben motor sinir ileti hızında 3 haftada düzelme olduğu gösterilmiştir (yayınlanmamış, 140).

Sonuç olarak, bu model çerçevesinde elde edilen bulgular, periferik sinirlerde çeşitli nedenlerle ortaya çıkabilecek I/R durumlarında lipid peroksidleri, nitrik oksit, adezyon molekülleri ve sitokinlerin düzeylerinin etkilendiğini, birbirleri ile etkileştiğini ve bu moleküllerin hasarın oluşumu ve/veya onarım sürecine katılmakta olduklarını göstermektedir. Aktivin, TGF β , ve fibronektinin iyi planlanmış deneysel çalışmalarda periferik sinir hasarlarında tedavi amacıyla kullanılması ve olası verimli sonuçların elde edilmesi durumunda klinik kullanımlarının tartışmaya açılabilmesi yararlı olacaktır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1-Nitrik oksit iskemi-reperfüzyon hasarında serbest oksijen radikallerinin yarattığı hasarı önleyebilmekte, lipid peroksidasyonunu dolayısıyla malondialdehit oluşumunu azaltmaktadır.

2-Adezyon moleküllerinden biri olan fibronektin ve sitokinlerin transforming growth faktör süper ailesinin üyelerinden olan aktivin ve transforming growth faktör β 1 ve β 2 iskemi-reperfüzyon hasarının onarım sürecinde rol almaktadırlar.

3-İskemi-reperfüzyon hasarının kesin tedavisi bilinmemekle birlikte, yapılan çeşitli deneysel çalışmalarda nitrik oksit ve fibronektinin tedavide kullanıldığında hasarı önleyebildiği gösterilmiş olup aktivin A ve TGF β gibi çeşitli sitokinlerin de tedavide önleyici etkileri olabileceği düşünülebilir.

4-İskemi-reperfüzyon modeli üzerinde yapılacak çeşitli çalışmalar bu deneme aşamasındaki tedavi seçeneklerinin klinik kullanıma sokulabilmesi için yol gösterici olacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. **Erlanger J, Schoepfle GM.** A study of nerve degeneration and regeneration. *Am J Physiol*, 1946; 147 : 550-581.
2. **Lundborg G.** Ischemic nerve injury. Experimental studies on intraneural microvascular pathophysiology and nerve function in a limb subjected to temporary circulatory arrest. *Scand J Plast Reconstr Surg*, 1970; 6: 1-113.
3. **Gilliatt RW, Hjorth RJ.** Nerve conduction during Wallerian degeneration in the baboon. *J Neurol Neurosurg and Psychiat*, 1972; 35: 335-341.
4. **Lundborg G.** Ischemia and nerve injury. *Arch Surg*, 1972; 104: 631-632.
5. **HeissWD, Rosner G.** Functional recovery of cortical neurons related to degree and duration of ischemia. *Ann Neurol*, 1983; 14: 294-301.
6. **Weisfeldt ML.** Reperfusion and reperfusion injury. *Clin Res*, 1987; 35: 13-20.
7. **Greene HL, Weisfeldt ML.** Determinants of hypoxic and post-hypoxic myocardial contracture. *Am J Physiol*, 1997; 232: H526-H533.
8. **Shine KI, Douglas AM.** Low calcium reperfusion of ischemic myocardium. *J Moll Cell Cardiol*, 1983; 15: 251-260.
9. **Di Bona DR, Powell WJ.Jr.** Quantitative correlation between cell swelling and necrosis in myocardial ischemia in dogs. *Circ Res*, 1980; 47: 653-665.
10. **Romson JL, Hook BG, Kunkel SI, Abrams GD, Schork MA, Lucchesi BR.** Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation*, 1983; 67: 1016-1023.
11. **Rowe GT, Manson NH, Caplan M, Hess ML.** Hydrogen peroxide and hydroxyl radical mediation of activated leucocyte depression of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Circ Res*, 1983; 53: 584-591.
12. **Arnes A, Wright RL, Kowada M.** Cerebral ischemia, II: the no-reflow phenomenon. *Am J Pathol*, 1968; 52: 437-447.
13. **Nagamatsu M, Schmelzer JD, Zollman PJ, et al.** Ischemic reperfusion causes lipid peroxidation and fiber degeneration. *Muscle Nerve*, 1996; 19 (1): 37-47.

14. Yanaka K, Camarata PJ, Spellman SR, et al. Synthetic fibronectin peptides and ischemic brain injury after transient middle cerebral artery occlusion in rat. *J Neurosurgery*, 1996; 85 (1): 125-130.
15. Vogelesang MG, Scherer SS, Fawcett JV, et al. Regulation of fibronectin alternative splicing during peripheral nerve repair. *J Neuroscience Res*, 1999; 56 (4): 323-333.
16. He K, Nukada H, Mc Morran PD, et al. Protein carbonyl formation and tyrosine nitration as markers of oxidative damage during ischemia reperfusion injury to rat sciatic nerve. *Neuroscience*, 1999; 94 (3): 909-916.
17. Takahashi M, Ikeda Y, Masuyama JI, et al. Nitric oxide attenuates adhesion molecule expression in human endothelial cells. *Cytokine*, 1996; 8 (11): 817-821.
18. Munz B, Hübner G, Tretter Y, Alzheimer C, Werner S. A novel of activin in inflammation and repair. *Journal of Endocrinology*, 1999; 161: 187-193.
19. Luisi S, Florio P, Reis FM, Petraglia F. Expression and secretion of activin A: possible physiological and clinical implications. *European Journal of Endocrinology*, 2001; 145: 225-236.
20. Steiner MS. Role of peptide growth factors in the prostate: A review. *Urology*, 1993; 42 (1): 99-110.
21. Sankar S, Mahooti-Brooks N, Bensen L, McCarthy TL, Centrella M, Madri JA. Modulation of TGF β receptor levels on microvascular endothelial cells during in vitro angiogenesis. *J Clin Invest*, 1996; 97 (6): 1436-1446.
22. Terzis JK, Smith KL. Repair and grafting of the peripheral nerve. In: McCarthy JG (Ed). *Plastic Surgery*, vol I. Philadelphia: W.B. Saunders, 1997: 644-659.
23. Lundborg G, Rydevik B. Nerve entrapments and hands with paresthesia-the biological background. *Lakartidningen*, 1981; 78: 3478-3482.
24. Lundborg G. Intraneural microvascular pathophysiology as related to ischemia and nerve injury. In: Daniel RK and Terzis JK (Eds). *Reconstructive Microsurgery*, Boston: Little, Brown & Company, 1977: 334.
25. Lundborg G. The nerve trunk: Microvascular system. In: Lundborg G. (Ed). *Nerve Injury and Repair*; Edinburg: Churchill and Livingstone, 1988: 42-63.

26. **Kline DG, Hudson AR.** Acute injuries of peripheral nerves. In: Youmans JR (Ed). *Neurological Surgery*, Vol IV, 3th Ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1990: 2423-2511.
27. **Yormuk E.** Elin periferik sinir yaralanmaları. *Plast Rekonstr Cer Der IV-V*, 106: 1982-1983.
28. **Quenu J, Lejars F.** Etude anatomique sur les vaisseaux sanguins des nerfs. *Arch Neurol*, 1892; XXIII; 67: 1-33.
29. **Salmon M.** Les arteres de la peau. Paris: Masson, 1936.
30. **Taylor GI, Gianoutsos MP, Morris SF.** The neurovascular territories of the skin and muscles: Anatomic study and clinical implications. *Plast Reconstr Surg*, 1994; 94 (1): 1-36.
31. **Lundborg G.** The intrinsic vascularization of human peripheral nerves, Structural and functional aspects. *J Hand Surg*, 1979; 4: 34-41.
32. **Taylor GI, Palmer JH.** The vascular territories (angiosomes) of the body: experimental study and clinical implications. *Br J Plast Surg*, 1987; 40: 113.
33. **Taylor GI, Tempest M.** *Salmon's arteries of the skin*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1988.
34. **Del Pinal F, Taylor GI.** The venous drainage of nerves: Anatomical study and clinical implications. *Br J Plast Surg*, 1990; 43: 511-520.
35. **Best TJ, Mackinnon SE.** Intraneural vascular investigative techniques. *J Reconstr Microsurg*, 1991; 7 (3): 245-246.
36. **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.
37. **Thomas PK, Landon DN, King RHM.** Disease of peripheral nerves. In: Adams JH, Corsellis JAN, Duchon LW (Eds). *Greenfield's Neuropathology*, 4th Ed. London: Edward Arnold, 1984; 807-921.
38. **Smith DR, Koblinc AI, Rizzoli HV.** Blood flow in peripheral nerves. *J Neurol Sci*, 1977; 33: 341-346.
39. **Lundborg G, Branemark PI.** Microvascular structure and function of peripheral nerves: Vital microscopic studies of the tibial nerve in the rabbit. *Adv Microcirc*, 1968; 1: 66-68.
40. **Lundborg G.** Intraneural microvascular pathophysiology as related to ischemia and nerve injury. In: Terzis JK (Ed). *Reconstructive Microsurgery*, Philadelphia: W.B. Saunders, 1984: 334-340.

41. **Lundborg G.** Intraneural circulation. *Ortop Clin North Am*, 1988; 19 (1): 1-11.
42. **Özer T, Saray A, Erdemli E, Özbek MR.** Ani gerilmeye periferik sinirin verdiği histolojik yanıt. *Ank Üniv Tıp Fak Mecm*, 1995; 48 (3): 355-364.
43. **Nobel W, Black D.** The microcirculation of peripheral nerves: Techniques for perfusion and microangiographic, macrophotographic and photomicrographic recordings in animals. *J Neurosurg*, 1974; 41: 83-91.
44. **Greene EG.** *The anatomy of the rat.* New York: Hafner Publications, 1968.
45. **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.
46. **Bell MA, Weddell AGM.** A morphometric study of intrafascicular vessels of mammalian nerve. *Muscle and Nerve*, 1986; 9: 212-215.
47. **Miyamoto Y, Watari S, Tsuge K.** Experimental studies on the effects of tension on intraneural microcirculation in sutured peripheral nerves. *Plast Reconstr Surg*, 1979; 63: 398-403.
48. **Siu S, Fahrner M.** Microsurgical anatomy of the sciatic nerve in the rat. *J Anat*, 1974; 118: 394-395.
49. **Okada E.** Experimentaelle untersuchungen uber die vasculature trophik des peripheran nerven. *Arb Neurol Inst*, 1905; 12: 59-85.
50. **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.
51. **Durward A.** Blood supply of nerves. *Postgrad Med J*, 1948; 24: 11-14.
52. **Blunt M.** Ischemic degeneration of nerve fibres. *Arch Neurol*, 1960; 2: 528-536.
53. **Hess K, Eames RA, Darveniza P, Gilliatt RW.** Acute ischemic neuropathy in the rabbit. *J Neurol Sci*, 1979; 44: 19-43.
54. **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.
55. **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.

56. Sladky JT, Greenberg JH, Brown MJ. Regional perfusion in normal and ischemic rat sciatic nerves. *Ann Neurol*, 1985; 17: 191-195.
57. Grace PA. Ischemia-reperfusion injury. *Br J Surg*, 1994; 81: 637-647.
58. Andreoli SP. Mechanisms of endothelial cell ATP depletion after oxidant injury. *Ped Res*, 1989; 25 (1): 97-101.
59. Hyslop AP, Hinshaw DB, Halsey WA, Schraufstatter IU, Sauerheber RD. Mechanisms of oxidant mediated cell injury. *J Biochem*, 1988; 263 (4): 1655-1675.
60. 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.
61. Anonim. Reperfusion injury. Erişim: <http://www.isat.jmu.edu>
62. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. *Temel Patoloji*. 2. baskı, İstanbul: Nobel tıp kitapevi, 1995: 4-8.
63. Chaumoun 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.
64. Saray A, Can B, Akbıyık F, Askar I. Ischemia-reperfusion injury of the peripheral nerve: An experimental study. *Microsurgery*, 1999; 19 (8): 374-380.
65. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen radicals and the nervous system. *Trends Neurosci*, 1992; 8: 22-26.
66. Moslen MT. Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis. In. Armstrong D (Ed). *Free radicals diagnostic medicine*, New York: Plenum Press, 1994.
67. Li Y, Bickel KD, Im MJ, Hu L, Dellon AL, VanderKolk CA, Manson PN. Effects of deferoxamine on ischemia/reperfusion injury after peripheral nerve compression. *Ann Plast Surg*, 1996; 36: 365-369.
68. Tamer L, Polat G, Eskandari G, Ercan B, Atik U. Serbest radikalier. *Mersin Üniv Tıp Fak Der*, 2000; 1 (1): 52-58.
69. Nelson DL, Cox MM, *Lehninger principles of biochemistry* 3^{ed} New York: Worth publishers, 2000:848.
70. Maxey K, Johnson J. NO: recent developments. *Cayman Currents*, 2002; 11: 1-4.

71. **Chen H, Li D, Saldeen T, Mehta JL.** TGF-beta (1) modulates NOS expression and phosphorylation of Akt/ PKB in rat myocytes exposed to hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 2001; 281 (3): H 1035-9.
72. **Utepergenov DI, mertsch K, Sporberr A, et al.** Nitric oxide protects blood- brain barrier in vitro from hypoxia/reoxygenation- mediated injury. *FEBS Lett*, 1998; 424 (3): 197-201.
73. **Boykin JV.** The nitric oxide connection: hyperbaric oxygen therapy, becaplemin, and diabetic ulcer management. *ADV Ski Wound Care*, 2000; 13: 169-174.
74. **Lefter DJ.** Pharmacology of selectin inhibitors in ischemia/reperfusion states. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 2000; 40: 283-94.
75. **Takahashi M, Ikeda U, Masuyama JI, et al.** Nitric oxide attenuates adhesion molecule expression in human endothelial cells. *Cytokine*, 1996; 8 (11): 817-821.
76. **Ambrosio G, Tritto I.** Reperfusion injury: experimental evidence and clinical implications. *Am Heart J*, 1999; 138 (2): 69-75.
77. **Kelly KJ, Williams WW, Colvin RB, et al.** Intercellular adhesion molecule-1 deficient mice are protected against ischemic renal injury. *J Clin Invest*, 1996; 97 (4): 1056-1062.
78. **Kumar V, Cotran RS, Robbins SL.** *Temel Patoloji*. 2. baskı, İstanbul: Nobel tip kitapevi, 1995: 25-60.
79. **Etzioni A.** Integrins: the molecular glue of life. *Hospital practice (off ed)*, 2000; 35 (3): 102-8,111
80. **Sage EH, Bornstein P.** Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. SPARC, Tenascin and trombospondin. *The J of Biological Chemistry*, 1991; 266 (23): 14831-14834.
81. **Kumar V, Cotran RS, Robbins SL.** *Temel Patoloji*. 2. baskı, İstanbul: Nobel tip kitapevi, 1995: 55-56.
82. **Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts M, Robets K, Watson JD.** *Molecular biology of the cell*. 3th Ed, New York: Garland publishing, Inc, 1994: 950-1006.
83. **Onat T.** Ekstrasellüler matriks proteinleri. *XVI. Ulusal Biyokimya Kongresi*. İzmir, 23-27 Ekim 2000; L-39.
84. **Nag S, Picard P, Stewart DJ.** Increased immunolocalization of nitric oxide synthases during blood- brain barrier breakdown and cerebral edema. *Acta Neurochir*, 2000; 76: 65-68.

85. Nag S, Picard P, Stewart DJ. Expression of nitric oxide synthases and nitrotyrosine during blood- brain barrier breakdown and repair after cold injury. *Lab Invest*, 2001; 81 (1): 41-49.
86. Ahmed Z, Underwood S, Braun RA. Low concentrations of fibrinogen increase cell migration speed on fibronectin/ fibrinogen composite cables. *Cell Mot and The Cytoskeleton*, 2000; 46: 6-16.
87. Yanaka K, Camarata PJ, Spellman SR, et al. Antagonism of leukocyte adherence by synthetic fibronectin V in arat model of transient focal cerebral ischemia. *Neurosurgery*, 1997; 40 (3): 557-564.
88. Magnusson MK, Mosher DF. Fibronectin structure, assembly, and cardiovascular implications. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 1998; 18 (9): 1363-1370.
89. Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature*, 1994; 370: 341-347.
90. Erişim:<http://www.cryst.bioc.cam.ac.uk>
91. Munz B, Tretter YP, Hertel M, et al. The roles of activins in repair processes of the skin and the brain. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2001; 180: 169-177.
92. Munz B, Smola H, Engelhardt F, Bleuel K, et al. Overexpression of activin A in the skin of transgenic mice reveals new activities of activin in epidermal morphogenesis, dermal fibrosis and wound repair. *The EMBO J*, 1999; 18 (19): 5205-5215.
93. Hinck AP, Archer SJ, Qian SV, Roberts AB, et al. Transforming growth factor b1: three dimensional structure in solition and comparison with the x-ray structure of Transforming growth factor b2. *Biochemistry*, 1996,35: 8517-8534.
94. Moustakas A, Souchelyntskyi S, Heldin CH. Smad regulation in Transforming growth factor b signal transduction. *J. Of cell Science* , 2001,114:4359-4369.
95. Adzick NS, Lorenz HP. Cells, matrix, growth factors and the surgeon, the biology of scarless fetal wound repair. *Ann of Surgery*, 1994; 220 (1) : 10-18.
96. Mortazavi- Haghghat R, Taghipour- Khiabani K, David S, Kerrigan CL, Philip A. Rapid and dynamic regulation of TGF- beta receptors on blood vessels and fibroblasts during ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Ceil Physiol*, 2002; 282 (5): C1161-9.
97. Deten A, Holzl A, Leicht M, Barth W, Zimmer HG. Changes in extracellular matrix and in TGF-beta isoforms after coronary artery ligation in rats. *J Mol Cell Cardiol*, 2001; 33 (6): 1191-207.

98. **Allan SM, Rothwell NJ.** Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*, 2001; 2 (10): 734-44.
99. Erişim: <http://web.mit.edu/beh.460/www/lecture/lecture3.ppt>.
100. **Yagi K.** Simple procedure for spesific enzyme of lipid hydroperoxides in serum or plasma. *Methods Mol Biol*, 1998; 108: 107-10.
101. **Hornbeck P.** Enzyme- linked immunosorbent assays. In: Coico R (ed). *Current protocols in Immunology, Vol I*, New York: John Wiley & sons. Inc. 1994: Unit 2.1.
102. **Dawson B, Trapp RG.** *Basic & Clinical Biostatistics*. 3th Edition. Singapore: Mc Graw- Hill publishing; 2001: Chapter 7: 161-182.
103. **Dawson B, Trapp RG.** *Basic & Clinical Biostatistics*. 3th Edition. Singapore:Lange / Mc Graw-Hill publishing; 2001: Chapter 8: 183-210.
104. **Ogata K, Naito M.** Blood flow of peripheral nerve: Effects of dissection, streching and compression. *J Hand Surg*, 1986; 11B (1). 10-14.
105. **Clark WL, Trumble TE, Swiontkowski MF, Tencer AF.** Nerve tension and blood flow in arat model of immediate and delayed repairs. *J Hand Surg*, 1992; 17A : 677-687.
106. **Kinoshita Y, Monafa WW.** Effect of surgical trauma on regional blood flow in rat sciatic nerve. *Exp Neurol*. 1994; 125: 296-301.
107. **Low PA, Lagerlund TD, McManis PG.** Nerve blood flow and oxygen delivery in normal, diabetic and ischemic neuropathy. *Int Rev Neurobiol*, 1989; 31: 356-438.
108. **Low PA, Ward KK, Schmelzer JD, Brimijoin S.** Ischemic conduction failure and energy metabolism in experimental diabetic neuropathy. *Am J Pathol*. 1985; 248E : 457-462.
109. **Ress AM, Babovic S, Angel MF, Im MJ, Dellon AL, Manson PN.** Free radical damage in acute nerve compression. *Ann Plast Surg*, 1995; 34: 388-395.
110. **Rydevik B, Lundborg G, Bagge U.** Effects of graded compression on intraneural blood flow. *J Hand Surg*, 1981; 6B: 3-12.
111. **Kerrigan CL, Stotland MA.** Ischemia reperfusion injury- a review. *Microsurgery*, 1993; 14: 165-175.
112. **Korthals JK, Wisniewski HM.** Peripheral nerve ischemia. Part I. Experimental model. *J Neurol Sci*, 1975; 24: 65-76.

113. Hess K, Eames RA, Darveniza P, Gilliat RW. Acute ischemic neuropathy in the rabbit. *Neurol Sci*, 1979; 44: 19-43.
114. Schmelzer JD, Zochodne DW, Low PA. Ischemic and reperfusion injury of rat peripheral nerve. *Proc Natl Acad Sci*, 1989; 86: 1639-1642.
115. Mc Manis PG, Low PA. Factors affecting the relative viability of centrifascicular and subperineurial axons in acute peripheral nerve ischemia. *Exp Neurol*, 1988; 99: 84-95.
116. Nukada H, Powell HC, Myers RR. Spatial distribution of nerve injury after occlusion of individual major vessels in the rat sciatic nerves. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1993; 52 (5) : 452-459.
117. Zollman PJ, Awad O, Schmelzer JD, Low PA. Effect of ischemia and reperfusion in vivo on energy metabolism of rat sciatic-tibial and caudal nerves. *Exp Neurol*, 1991; 114: 315-320.
118. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New Eng J Med*, 1985; 312 (3) : 159-163.
119. Nukada H, McMorran PD. Perivascular demyelination and intramyelinic oedema in reperfusion nerve injury. *J Anatomy*, 1994; 185: 259-266.
120. Verhaar MC, Rabelink TJ. Endotelial fonksiyon: Erken girişim için stratejiler. *MN Cronometre*, 1998; 2(1) : 98-110.
121. Strijbos PJ. Nitric oxide in cerebral ischemic neurodegeneration and excitotoxicity. *Crit Rev Neurobiol*, 1998; 12 (3) : 223-243.
122. Wu DD, Lai M, Hughes PE, Sirimanne E, Gluckman PD, Williams CE. Expression of the activin axis and neuronal rescue effects of recombinant activin A following hypoxic-ischemic brain injury in the infant rat. *Brain Res*, 1999; 835: 369-378.
123. Corbucci GG, Lettieri B, Damonti V, Palombari R, Arienti G, Palmerini CA. Nitric oxide in ischemic and reperfused human muscle. *Clin Chim Acta*, 2002; 318 (1-2) : 79-82.
124. Kihara M, Zollman PJ, Schmelzer JD, Low PA. The influence of dose of microspheres on nerve blood flow, electrophysiology, and fiber degeneration of rat peripheral nerve. *Muscle nerve*, 1993; 16: 1383-1389.
125. Chopp M, Zhang R. Nitric oxide and neurogenesis. *Cayman currents*, 2002; 11: 5.
126. Iwamoto A, Egashira T, Takayama F, Yamanaka Y, Noguchi T. Change in free radical-related substances in plasma following ischemia-reperfusion in rat liver. *Pathophysiology*, 2002; 8 (3) : 167-174.

127. Qin XQ, Xiang Y, Luo ZQ, Zhang CQ, Sun XH. Fibronectin or RGD peptide promotes nitric oxide synthesis of rabbit bronchial epithelial cells. *Sheng Li Xue Bao*, 2000; 52 (6) : 519-521(abstract).
128. Mosher DF. A role for fibronectin in self-repair after ischemic injury. *Nature medicine*, 2001; 7 (3) : 290-292.
129. Hübner G, Alzheimer C, Werner S. Activin : a novel player in tissue repair processes. *Histol Histopathol*, 1999; 14 : 295-304.
130. Fu XB, Yang YH, Sun TZ, Gu XM, et al. Effect of intestinal ischemia-reperfusion on expressions of endogenous basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta in lung and its relation with lung repair. *World J Gastroenterol*, 2000; 6 (3) : 353-355.
131. Jiang Y, McLennan IS, Koishi K, Hendry IA. Transforming growth factor-beta 2 is anterogradely and retrogradely transported in motoneurons and up-regulated after nerve injury. *Neuroscience*, 2000; 97 (4) : 735-742.
132. Bagdatoglu C, Saray A, Surucu S, Ozturk H, Tamer L. Effect of trapidil in ischemia/reperfusion injury of peripheral nerves. *Neurosurgery*, 2002 (in press); 51 (1) : 212-220.
133. Schmid-Schonbein GW. Capillary plugging by granulocytes and the no-reflow phenomenon in the microcirculation. *Fed Proc*, 1987; 46 : 2397-2401.
134. Mullane KM, Kraemer R, Smith B. Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. *J Pharmacol Meth*, 1985; 14 : 157-167.
135. Engler R, Covell JW. Granulocytes cause reperfusion ventricular dysfunction after 15-minute ischemia in dog. *Circ Res*, 1987; 61 : 20-28.
136. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *J Pathol*, 2000; 190 (3) : 255-266.
137. Pantoni L, Sarti C, Inzitari D. Cytokines and cell adhesion molecules in cerebral ischemia. *Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biol*, 1998; 18 : 503-513.
138. Dowsing BJ, Hayes A, Bennett TM, Morrison WA, Messina A. Effects of lif dose and laminin plus fibronectin on axotomized sciatic nerves. *Muscle Nerve*, 2000; 23 : 1356-1364.
139. Krieglstein K, Strelau J, Schober A, Sullivan A, Unsicker K. TGF-beta and the regulation of neuron survival and death. *J Physiol Paris*, 2002; 96 (1-2) : 25-30.

140..Bagdatoglu C, Comelekoglu U, Talas DU, Buykakilli B, Sevim S, Saray A, Temiz C, Koksel T. The Effect Of Ischemia-Reperfusion Injury On The Nerve Conduction Parameters: An Experimental Study In The Rat Sciatic Nerve (yayımlanmamış veri, 2002)



**T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI
MILLÎ HAYAT BİLİMİ VE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
NÖROLOJİ VE EPİLEPSİ MERKEZİ**

ÖZGEÇMİŞ

(Dr. Özlen TUBAY BAĞDATOĞLU)

23.11.1969 yılında Ankara'da doğmuştur. İlköğrenimini Ankara Sarar İlkokulunda, ortaokul ve lise öğrenimini Ankara Atatürk Anadolu Lisesinde tamamlamıştır. Daha sonra Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesine girerek 1994 yılında mezun olmuştur. Mezuniyetinin ardından pratisyen hekim olarak T.C. Sağlık Bakanlığına bağlı Ankara ili Bala merkez sağlık ocağı, Mamak Bostancık sağlık ocağı, ve Çayyolu sağlık ocağında, İçel ili Mersin Adnan Özçelik sağlık ocağında görev yapmıştır. Şubat 2000 tarihinde Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başlamıştır, ve halen aynı bölümde araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır. Yabancı dili İngilizce'dir. Evlidir.