

1. ÖZET

Deneyisel İskemi Reperfüzyon Hasarında Ginkgo Biloba Extresi (EGb 761) ve Selenyumun Beyin Dokusu Üzerine Histolojik Etkileri

Dr. Seda Özbal

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A.D. İnciraltı-İzmir

AMAÇ

Beyin dokusu, iskemi-reperfüzyon hasarı ve oksidatif strese yüksek duyarlılık göstermekte ve bu nedenle beyin iskemisi ve ardışık reperfüzyon nöronal hasar ve apoptoz ile sonuçlanmaktadır. Oluşturduğumuz deneysel modelde ginkgo biloba ekstresi (G) ve selenyumun (S) prefrontal korteks ve hipokampustaki tedavi edici etkilerini yapısal, immunhistokimyasal ve biyokimyasal olarak incelemeyi amaçladık.

YÖNTEM

Sham grubunda 4, diğer gruplarda 14 sıçan olacak şekilde 5 çalışma grubu oluşturuldu. I. Sham, II. İskemi-reperfüzyon (İR), III. İR+G, IV. İR+S, V. İR+G+S. Sham grubu dışında tüm deneklere 45 dakika tek taraflı arteria carotis communis oklüzyonu uygulandı. G, S ve G+S tedavileri iskemi-reperfüzyon oluşturulduktan sonra 14 gün süreyle intraperitoneal yoldan yapıldı. Ginkgo biloba ekstresi 50 mg/kg/gün, Selenyum 0.625 mg/kg/gün verildi. Işık mikroskopik incelemeler için elde edilen kesitler Crezyl-violet ile boyandı. Apoptozisi saptamak için Apostain boyası ve Kaspaz-3 immun işaretleme uygulandı. Serumda TNF- α ve IL-1 β , prefrontal korteks ve hipokampus doku homojenatlarında ise TNF- α , IL-1 β ve NGF düzeyleri ölçüldü.

BULGULAR

İR grubunda nöronlarda belirgin büzülme, hücre ve çekirdek sınırlarında düzensizlik, çekirdek kromatininde yoğunluk, nöron sitoplazmasında dansite artışı, perinöronal ve perikapiller ödem gözlenirken tedavi gruplarında bu bulgular oldukça azalmış olarak izlendi. Hücre sayımlarında İR grubunda azalan hücre sayılarının tedavi gruplarında korunduğu saptandı. Apostain ve kaspaz-3 ile boyanan kesitlerde apoptoza giden nöronlar belirgin olarak işaretlenirken tedavi gruplarında bu tür hücrelere rastlanmadı.

İR grubunda artan serum ve doku TNF- α ve IL-1 β düzeyleri ve azalan NGF düzeyleri tedavi gruplarında sham grubuyla uyumlu bulundu.

SONUÇ

Histolojik ve biyokimyasal sonuçlar açısından G, S ve G+S tedavisi uygulanan gruplar değerlendirildiğinde, iskemi-reperfüzyon hasarına karşı tedavi gruplarının her birinin anlamlı olarak farklı derecelerde olumlu etki gösterdiği gözlemlendi.

Anahtar Sözcükler: Beyin, iskemi, reperfüzyon, ginkgo biloba, selenyum

ABSTRACT

The Histological Effects of Ginkgo Biloba Extract (EGb 761) and Selenium on Brain Tissue in Experimental Ischemia-Reperfusion Injury

Dr. Seda Özbal

Histology and Embryology Department, Faculty of Medicine, Dokuz Eylül University, Inciralti, İzmir, Turkey

AIM

The brain tissue exhibits high sensitivity to ischemia-reperfusion injury and therefore, brain ischemia and consecutive reperfusion result in neural damage and apoptosis. We aimed to investigate the therapeutic effects of ginkgo biloba extract (G) and selenium (S) on the prefrontal cortex and hippocampus structural, immunohistochemically and biochemically in our experimental model.

MATERIAL AND METHOD

5 study groups were formed with 4 rats in the Sham group and 14 rats in each of the remaining four groups. I. Sham, II. Ischemia-reperfusion (IR), III. IR+G, IV. IR+S, V. IR+G+S. Unilateral common carotid artery occlusion was applied 45 minutes except sham. The G, S and G+S treatments were carried out for 14 days after ischemia-reperfusion, intraperitoneally. Ginkgo biloba extract was administered at a dose of 50 mg/day and selenium was administered at a dose of 0.625 mg/kg/day. The sections obtained were stained with Crezyl-violet for light microscopical examination. Apostain and Caspase-3 immune staining were used to detect apoptosis. TNF- α and IL-1 β were measured in serum and TNF- α , IL-1 β and NGF levels were measured in prefrontal cortex and hippocampus tissue homogenates.

RESULTS

Marked contraction in the neurons, irregularities in cell and nucleus borders, chromatin condensation in nucleus, an increase in the density of the cytoplasm of neurons and perineural and pericapillary edema were observed in the IR group

whereas these findings were highly decreased in the treatment groups. The cell count revealed that there was a decrease in the number of cells in the IR group while such a decrease was not observed in the treatment groups. While the apoptotic cells were markedly stained in apoptin and caspase-3 sections, these cells were not observed in treatment groups. The increased serum and tissue levels of TNF- α and IL-1 β and the decreased NGF levels were found to be consistent with the sham group.

CONCLUSION

As G, S and G+S treated groups evaluated in terms of histological and biochemical results, it was observed that each treatment group was significantly effective against cerebral ischemia-reperfusion injury in different levels.

Key Words: Brain, ischemia, reperfusion, ginkgo biloba, selenium

2. GİRİŞ VE AMAC

Damar yatağındaki kan akımının azalması ile ortaya çıkan iskemi en sık görülen hücre hasar tipidir. İskemi sonucu hücrede protein sentezi, hücre membranı, hücrenin genetik elemanları ve mitokondrial oksidatif fosforilasyon hasarlanmasına bağlı pek çok histolojik ve biyokimyasal değişiklik meydana gelmektedir. Organ yada dokuların tekrar oksijenlenmesi, bir başka deyişle reperfüzyonu ile hasarlanma daha da artmaktadır (1, 2).

Beyin, enerji oluşturmak için yüksek metabolik gereksinimi olan ve nöronların çoğalma yeteneğine sahip olmaması nedeniyle iskemiye yüksek duyarlılık gösteren bir organdır. Beyin dokusunun O₂ ve glikoz rezervinin düşük olması nedeniyle, beynin fonksiyonel ve yapısal bütünlüğünün korunması için yeterli glikoz konsantrasyonuna sahip oksijenli kana sürekli gereksinimi vardır (3, 4).

Serebral iskemi günümüzde oldukça yaygın görülen, önemli sosyal ve ekonomik problemlere yol açan sağlık sorunlarından biri olan serebrovasküler hastalıkların en sık görülen nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Son on yılda serebrovasküler hastalıklar sayısında azalma görülmesine karşın dünyada kalp hastalıkları ve kanserden sonra üçüncü ölüm nedenidir (5).

Beyin iskemisi ve ardışık reperfüzyon sonrası iskemik bölgede artan Reaktif Oksijen Türlerine (ROS) bağlı olarak gelişen histolojik ve biyokimyasal değişiklikler nöronal hasar ve apopitoz ile sonuçlanmaktadır (6, 7).

Hasara uğrayan dokunun savunma mekanizması, olası patolojilerin önlenmesinde önem taşımaktadır.

Ginkgo biloba extresi (EGb-761)'nin antiapoptotik ve antioksidan özelliklere sahip olduğu çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir. Pek çok iskemik ve dejeneratif olayda nöroprotektif etkisi bilinmektedir. Özellikle içerdiği Ginkgolide B kuvvetli bir platelet-aktivatör faktör (PAF) reseptör antagonistidir ve bu özelliği nedeniyle serebral kan akımının önemli ölçüde artmasını sağlamaktadır (8, 9).

Selenyum ise serbest oksijen radikallerini temizleyen biyolojik fonksiyonuna bağlı olarak antioksidan özelliğe sahiptir. Glutasyon peroksidaz benzeri aktivite ile hidroperoksidaz ve lipoperoksidazları azaltmakta, oksidatif hasara karşı Deoksiribonükleik Asit (DNA), lipid ve proteinleri korumaktadır (10, 11).

Ginkgo biloba ve selenyumun beyin iskemi-reperfüzyon hasarında (İRH) sağaltıcı etkisini karşılaştıran mikroskopik, immunhistokimyasal, biyokimyasal parametrelerle desteklenen çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Bu nedenle oluşturduğumuz deneysel modelde adı geçen antioksidan ajanların etkilerini ve varsa etkinlikleri arasındaki farklılığı histolojik, immunhistokimyasal, biyokimyasal olarak incelemeyi amaçladık.

3. GENEL BİLGİLER

3.1. HÜCRE ZEDELENMESİ

Organizmamız farklı özellikler taşıyan hücrelerin oluşturduğu, değişik doku ve organlardan oluşur. Normal bir hücrenin fonksiyon ve yapısı, metabolizma, differansiasyon, özelleşmedeki genetik programlar, komşu hücre ile ilişkiler ve metabolik maddelerin uygunluğu gibi faktörler nedeniyle oldukça dar bir alanla sınırlıdır.

Hücreler normal koşullarda bile çevrelerindeki değişikliklere uyum sağlamak durumundadırlar. Bu değişiklikler fizyolojik (hamilelik, emzirme, puberte vb) olaylara karşı normal yanıtlar olabileceği gibi, aşırı fizyolojik stres veya patolojik uyarılara karşı da gerçekleşebilir. Bu sırada uyarı faktöre yanıt olarak hücre yaşamını devam ettirirken, fonksiyonunu veya özelliklerini düzenleyerek değişmiş olan yeni duruma uyum sağlar. Eğer adaptasyon sınırını aşan bir uyarı olur yada adaptasyon olamazsa hücre zedelenmesi olarak adlandırılan olaylar zinciri gelişir. Bir noktaya kadar hücre hasarı geri dönüşümlüdür; ancak kalıcı zorlamalarla hücre geri dönüşümsüz olarak zedelenir (12).

Spesifik bir stres şekli ister adaptasyon oluştursun isterse zedelenmeye neden olsun, sonuç sadece stresin özelliğine ve şiddetine değil aynı zamanda hücrenin yaralanmaya karşı duyarlılığına, differansiasyonuna, kan gereksinimine, beslenmesine ve önceki durumu gibi diğer birçok hücreye özel değişkenlere de bağlıdır (13).

Hücre zedelenmesinin nedenleri :

- 1) Oksijen Yetersizliği: hipoksi, iskemi, kanın oksijen taşıma kapasitesinde yetersizlik
- 2) Fiziksel Ajanlar: mekanik travma, aşırı ısı fazlalığı veya azlığı (yanık ve donma) gibi ısı değişiklikleri, atmosfer basıncında ani değişiklikler, radyasyon ve elektrik şoku
- 3) Kimyasal Ajanlar ve İlaçlar: glikoz veya tuz gibi basit kimyasalların yoğun konsantrasyonları, yüksek konsantrasyonlarda oksijen, arsenik, siyanid, cıva tuzları gibi zehirler, çevre ve hava kirliliği, insektisidler ve bitki ilaçları, endüstriyel ve mesleki tehlikeli maddeler (karbonmonoksit ve asbest), alkol veya narkotik maddeler gibi sosyal uyarıcılar ve tedavide kullanılan bazı ilaçlar

- 4) Mikrobiyolojik Ajanlar
- 5) Immunolojik Reaksiyonlar
- 6) Genetik Defektler: Down sendromu, orak hücre anemisi gibi
- 7) Beslenme Bozukluğu: tek yönlü beslenme, az yada aşırı beslenme
- 8) Yaşlılık

İskemi en sık görülen hücre hasar tipidir. Belirli dokuların damar yatağındaki kan akımının azalması ile ortaya çıkar. Glikolitik enerji üretiminin devam edebildiği hipoksiye zıt olarak iskemi, glikoliz için gerekli maddelerin ulaşımını da içine alır. İskemik dokularda glikolitik maddelerin tükenmesi veya metabolitlerin taşınamaması sonucunda glikolitik aktivite inhibe olur, anaerobik enerji üretimi durur. Bu nedenle iskemi, dokuları hipoksiden daha hızlı hasarlar.

Hipoksinin ilk atak noktası hücrenin aerobik solunumudur. Hücre içinde oksijen azaldığında oksidatif fosforilasyon düşer ve adenosin trifosfat (ATP) üretimi azalır. ATP tüketilmesi hücredeki pek çok sistemde etkilere sahiptir ve pek çok biyokimyasal mekanizmada değişikliklere neden olur.

İskemik dokunun tekrar kanlanması ise reperfüzyondur. İskemik duruma getirilmiş fakat ölmemiş hücredeki kan akımı düzeltildiğinde zedelenme daha da artar. Buna iskemi-reperfüzyon hasarı denir. Hasar artışı hem ortamda artan ROS'a hem de tekrar kanlanma ile gelen kalsiyum (Ca^{+2}) sonucu hücre içi kalsiyum dengesi sağlanamaması, Ca^{+2} etkili yolların aktive olması ve hücre bütünlüğünün kaybolmasına bağlıdır (1, 2, 12).

Hücre zedelenmesi birçok yolla gerçekleşebilir ve herhangi bir nedenle oluşan zedelenmede biyokimyasal olaylar ve sonucunda gelişen belirtiler kompleks olup diğer hücre içi yollarla da iç içe geçmektedir. Ancak incitici ajan ne olursa olsun, dört hücre içi sistem öncelikle yaranır: hücre membran bütünlüğü, aerobik solunum ve bunun sonucunda mitokondrial oksidatif fosforilasyon ve ATP oluşumu, protein sentezi, hücrenin genetik elemanları (12).

3.2. SANTRAL SINIR SİSTEMİ HİSTOLOJİSİ

Sinir sistemi insan vücudunun en karmaşık yapısıdır ve sinir hücrelerinin oluşturduğu bir iletişim ağından kuruludur. Sinir dokusu yapısal olarak hücreler arası madde içermeyen için nöronlar ve glia hücreleri olmak üzere 2 tipten oluşur (14).

3.2.1. Nöron

Sinir dokusunda asıl fonksiyon gören hücrelerdir. Nöronlar, karmaşık yapısal özellik gösteren, bağımsız, anatomik ve fonksiyonel birimlerdir. Uyarıları almak, iletmek ve iletirmek, belli hücrel aktiviteyi başlatmak, nörotransmitterleri ve diğer bilgi moleküllerini salgılamaktan sorumludurlar (14).

Nöronlar boyut ve şekil olarak son derece değişkendir. 150µ çapta olabildiği gibi, 4-5µ çapta nöronlar da bulunmaktadır. Sinir hücrelerinin gövde kısımları da değişik şekiller gösterir. Nöron bir gövde kısmı (perikaryon) ile, sitoplazmik uzantılardan meydana gelir. İki tip sitoplazmik uzantısı bulunur:

- Dendrit: Çevreden gelen uyarıyı alan çok sayıdaki kısa uzantılardır. Geniş alıcı bir yüzey oluşturur. Önce tek bir dala çıkıp daha sonra birçok kez daha küçük dallar verir ve terminale doğru incirler. Dendritlerde çekirdek ve golgi dışında perikaryonda bulunan tüm organeller görülebilir. Distaline doğru organeller azalır ve kaybolur.

- Akson: Akson tepciğinden çıkan tek, uzun uzantıdır. İmpulsu diğer hücrelere (nöron, kas, bez) iletir ve moleküllerin aksonal taşınmasından sorumludur. Akson çapı arttıkça hız da artar (15, 16). Aksonlar sinir hücresinin gövde kısmından çıktıktan sonra kısa bir mesafe çıplak olarak seyrederler. Sonra buldukları yere göre farklı miktarda kılıfla sarılırlar. Kılıflı bu aksonların her birine sinir fibrili adı verilir (17).

Uzantıların sayı ve şekline göre nöronlar 3'e ayrılır :

1. Unipolar: Dendritleri yoktur, uyarıları gövde kısımları ile alıp, aksonu ile iletirler.
2. Bipolar: Bir dendrit ve bir aksonu vardır. Bipolar nöronların diğer tipi olan pseudounipolar nöronlar ise tek bir uzantıya sahiptir, uzantı perikaryondan çıktıktan kısa bir süre sonra T şeklini alır. Uzantılardan biri dendrit biri akson görevi görür. Alınan uyarı perikaryona uğramadan doğrudan aksona iletilir.
3. Multipolar: En sık görülen tipidir. Çok sayıda uzantısı bulunur. Bunlardan biri akson, diğerleri dendrittir (15).

Nöron gövdesi, nöronun çekirdek ve çevresindeki sitoplazmadan meydana gelir. Hücre zarı ile çevrelenmiş nöron gövdesinde tüm hücre organelleri gözlenir. Membransal organellerden yana çok zengindir ve hücrenin besleyici merkezidir.

Sinir hücrelerinde çekirdek genellikle iri, yuvarlak ve ökromatiktir. Tek ve sentrik yerleşimlidir. Sempatik ve duyu ganglionlarında iki çekirdekli sinir hücreleri de bulunabilir. Bol miktarda dağılmış soluk renkli kromatin granülleri içerir. Kromatin ince taneciklidir, bu da hücrelerin yoğun aktivitesini yansıtır (14). Çekirdekçik de iri, yuvarlak ve soluk boyalı çekirdek içinde koyu görünüşü ile çok belirgindir. Çekirdekçiğin büyük olması protein sentezinin yüksek hızına bağlıdır. Çekirdek zarı çift katlıdır; çekirdeğin içine ve dışına doğru diffüzyonun olabileceği ince porlar içerir. (18).

Hücre gövdesi, paralel sisterna kümeleri şeklinde düzenlenmiş, oldukça geniş granüllü endoplazmik retikulum içerir. Sitoplazmada sisternalar arasında bulunan çok sayıda poliribozom, bu hücrelerin hem yapısal hem de taşıyıcı proteinlerini sentezlediğini düşündürmektedir. Uygun boyama yapıldığında granüllü endoplazmik retikulum (GER) ve serbest ribozomlar ışık mikroskobu altında Nissl cisimcikleri denen bazofilik granüler alanlar şeklinde görülür (15). Bu granüller kaplan sırtı görünümü verdiği için Tigroid cisim de denir. Bunlar perikaryon ve dendritte görüldüğü halde aksonun çıkış yerinde ve akson içinde bulunmazlar. Nissl cisimciklerinin sayısı nöron tipine ve fonksiyonel duruma göre değişir. Motor nöron gibi büyük sinir hücrelerinde sayıca fazladır (14). Nöronlarda ribonükleik asidin (RNA) bol oluşu ve nukleusun yapısı protein sentezinin fazla olduğunu göstermektedir. Nissl cisimciği protein sentezinden sorumludur; akson ve dendritler boyunca akarak seyrederek ve hücresel aktivite sırasında parçalanarak proteinlerin yer değiştirmesini sağlar. Yorgunluk ya da nöronal hasarlar, Nissl cisimciğinin hareket etmesine ve sitoplazmanın periferinde yoğunlaşmasına neden olurlar (18).

Granülsüz endoplazmik retikulum bir çok nöronda bol miktarda görülür. Bunlar dendrit ve aksonlarda plazmalemma altında geniş, yassı ve pencereci sisterna yapısı gösterir. Hücre gövdesinde GER ile devam eder. Transport ve sinaptik veziküller için kaynaklık yaptıkları, proteinleri hücre boyunca dağıttıkları ve kalsiyum tuttukları bilinmektedir (17).

Golgi kompleksi nukleusa yakın yerleşir ve çok iyi gelişmiştir. Çekirdek çevresinde sıralanmış, çok sayıda paralel düz sisternalar içerir. Aynı zamanda salgı ve transfer veziküllerine karşılık gelen biraz daha küçük ve küresel veziküller vardır. Sentezlenen proteinlerin geçici olarak depolanması dışında lizozom üretiminde ve hücre membran sentezinde de oldukça aktiftir.

Nöronlarda özellikle aksonun sonlanma kısımlarında iri ve bol miktarda mitokondri bulunur. Dendrit ve perikaryonda da bulunan mitokondriler, hücre gövdesinde küçük ve az sayıdadır (18).

Nöron hücre iskeletinde 3 farklı flaman yapısı görülür: mikrotübüller, nöroflamanlar ve mikroflamanlar.

Nöroflamanlar denen 10 nm. çapında ana flamanlar perikaryonda ve hücre uzantılarında bol miktarda bulunurlar. Belli fiksatiflerin etkisi ile nöroflamanlar, gruplar yaparlar ve gümüşle impregne edildiğinde ışık mikroskobu ile görülebilen nörofibrilleri oluştururlar. Bu oluşumlar hücreyi desteklemekle ve madde iletimi ile görevlidirler (14).

Mikrotubüller 20-30 nm çapındadırlar ve mikroflamanların arasına serpilmişlerdir. Hücrenin gövdesi ve uzantıları boyunca uzanırlar. Hücre gövdesinden hücre uzantılarının distal uçlarına doğru madde transportu ile görevli oldukları düşünülmektedir (18).

Sentrioller, bölünmekte olan olgunlaşmamış sinir hücrelerinde bulunan küçük, çift yapılardır. Sentrioller olgun sinir hücrelerinde de bulunurlar, mikrotubüllerin yapılandırılması ile ilişkili olduklarına inanılır.

Nöronlarda çeşitli inklüzyonlar da bulunur :

- Melanin granülleri: Beynin belli kısımlarındaki nöron sitoplazmalarında bulunur (örn, mesencephalonun substansia nigrası). Bu pigmentin prekürsörü olan dihidroksifenilalanin ve metildopa aynı zamanda nörotransmitterlerden dopamin ve noradrenalinin de prekürsörüdür. Melanin granüllerinin varlığı, nörotransmitterleri dopamin olan bu nöronların katekolamin sentez etme kabiliyeti ile ilişkilidir.

- Lipofuskin pigmenti: Düzensiz biçimli pigment granülüdür. Sinir hücrelerinde primer lizozomlar bol olarak bulunmaktadır. Yaşla birlikte sekonder lizozomlar artarken, primer lizozomlar biraraya gelerek sitoplazmada sarımsak-kahverengi granüller olarak gözlenen lipofuskin pigmentini oluştururlar. Lizozomal enzimatik

aktivite artıkları oldukları düşünölmektedir. Çekirdek ve organelleri bir tarafa iterek hücresef fonksiyonlara etki edebilirler.

- Lipid damlacıkları: Nöron sitoplazmasında bozuk metabolizma sonucu görölebilir. Bunların enerji depoladıkları düşünölmektedir.

- Sekresyon granöleri: Nörosekretuar hücrelerde görölür. Çoğu sinyalleyci moleköller içerirler (16, 17).

3.2.2. Glia hücreleri

Nöronlar sinir dokusunun esas hücreleri olmalarına karşın, glia hücreleri nöronlara metabolik ve mekanik destek sağlayan hücrelerdir. Bu hücrelerin sayısı beyinde nöronlardan 10 kat daha fazladır; beyin ve medulla spinalisin total hacminin yarısı kadarını oluştururlar. Nöron aralıklarında yerleşerek hem sinir hücresinin gövdesini, hem de akson ve dendrit uzantılarını sararlar. Sinir dokusunun hücreler arası matriksi yoktur, glia hücreleri nöron etkinliği için gereken uygun mikroçevreyi sağlar (18).

Santral sinir sisteminde 4 tip nöroglia hücresi vardır :

• **Astrositler** nöroglia hücrelerinin en büyükleridir. Çok sayıdaki uzantıları nedeni ile yıldız şeklinde izlenen hücrelerdir. Glial fibriller asit proteininden yapılmış ara flamanlar bu hücrelerin yapılarını güçlendirir. Astrositler nöronları kapilerlere ve pia mater`e bağlar. 2 farklı tipi vardır :

- Protoplazmik astrositler Santral sinir sisteminde (SSS) gri maddede daha fazla bulunurlar. Yıldız şekilli, bol sitoplazmalı, çok sayıda kısa uzantıları vardır. Hücre gövdesi ve uzantılar sitoplazmalarında fibröz astrositlerinkinden daha az filament içerir.

- Fibröz astrositler ise SSS`de beyaz maddede daha fazla bulunurlar. Uzantıları daha düz ve uzundur. Hücre gövdesi ve uzantılar sitoplazmalarında çok sayıda filament içerir.

Astrositler nöronların iyonik ve kimyasal ortamını kontrol ederler. Santral sinir sistemi ile kan damarları arasında kesintisiz bir bariyer, yani kan-beyin bariyerini (KBB) oluştururlar.

Ayrıca santral sinir sistemi hasar gördüğünde astrositler proliferasyon olarak glia yaması olarak tanımlanan hücresef nedbe dokusunu oluştururlar.

SSS`nin pek çok işlevinin düzenlenmesinde rol oynarlar. Astrositler, üzerlerinde in vitro adrenerjik reseptörler, aminoasit ve peptid reseptörleri bulundurlar ki bu özellik de astrosite pek çok uyarıya yanıt verme yeteneği kazandırır.

Astrositler nöronun canlılığı ve aktivitesini de etkileyebilirler. Bunu sadece hücre dışı çevredeki etkileri düzenleyerek değil, vazoaaktif endotelinler, opioid prekürsörleri ve nörotrofik somatostatin gibi metabolik substratları ve nöroaktif molekülleri salgılayarak da gerçekleştirirler.

Birbirleriyle gap junctionlar aracılığı ile doğrudan temas halindedir ve bu şekilde bilgi uzak mesafeler arasında bir noktadan başka bir noktaya akabilmektedir (17).

- **Oligodendrositler** astrositten daha küçüktür. Az sayıda, az dallı uzantıları vardır. Hem beyaz hem de gri maddede bulunur. SSS nöronların elektriksel uyarı dağıtımını bağlayan miyelin kılıfı yaparlar. Bu hücrelerin aksonların etrafına sarılan bir kaç küçük uzantısı bulunmaktadır (14).

- **Ependim hücreleri** SSS`deki boşlukları döşeyen alçak prizmatik silialı epitel hücreleridir. 3 gruba ayrılabilirler:

- Ependimositler, beyin ventrikülleri ve medulla spinalisin canalis centralisini döşerler. Silyaların hareketi ile beyin-omurilik sıvısının dolaşımına yardım eder. Aynı zamanda serbest yüzeyindeki mikrovilluslar absortif bir fonksiyonları olduğunu göstermektedir.

- Tanisitler, hipotalamusun eminentia medialisini örterek 3. karıncık döşemesini kaplarlar. Beyin-omurilik sıvısındaki kimyasal maddeleri hipofizeoportal sisteme taşıdığı düşünülmektedir.

- Koroidal epitel hücreleri, plexus choroideusların yüzeyini örterler. Burada beyin-omurilik sıvısı üretimi ve salgılanması ile ilgilidir (18).

- **Mikroglia** nöroglial hücrelerin en küçükleridir. Kısa uzantılara sahip, uzamış, hücrelerdir. Diğer glia hücrelerinin küre şeklindeki çekirdeklerinin aksine yoğun ve uzun şekilli çekirdekleriyle ayrılırlar. Sinir dokusunda mononükleer fagositik sistem kapsamına giren fagositik hücrelerdir ve kemik iliğindeki öncül hücrelerden köken alırlar. Nötral proteazlar ve oksidatif radikaller üretilip salgılayarak inflamasyon ve onarımda görev alırlar (14).

3.2.3. Sinir dokusunun dejenerasyonu ve rejenerasyonu

Nöronlar bölünmez ve dejenerasyonları kalıcı kayıplara yol açar. Sinir hücrelerinin aksine SSS'nin nöroglia hücreleri mitozla bölünme yeteneğine sahiptir. SSS'deki hastalık ya da hasar sonucu oluşan hücre kayıplarındaki boşlukları nöroglia hücreleri doldurur (14).

Fiziksel travma veya damarsal tıkanmaların neden olduğu yaralanmaya karşı nöroglia hücrelerin yanıtı astrositlerin hiperplazisi ve hipertrofisi şeklinde olur. Önceki morfolojisi ne olursa olsun fibröz yapı kazanırlar. Astrositlerin çoğalması astrositozis veya gliozis olarak tanımlanır. Büyüyen astrositlerin sitoplazması çok sayıda fibril ve glikojen granülleri içerir. Oligodendrositler ise yaralanmaya, büyüyerek ve sitoplazmalarında vakuolizasyon göstererek yanıt verirler; çekirdekleri piknotik duruma geçer. Daha ileri hasarları ise demiyelinizasyonla sonuçlanır (18).

3.2.4. Prefrontal Korteks

Serebral hemisferleri dıştan saran korteksin kalınlığı 1,5-4 mm. arasında değişmektedir. Gri cevherdeki nöronların sayısı değişik alanlarda ve tabakalarda farklıdır. Beyin korteksinde yaklaşık 14 milyar nöron bulunur (15, 16).

Prefrontal korteks hemisferlerin lateral yüzünde premotor sahanın (Brodmann'ın 6-8. alanları) önünde yer alan frontal lob kısmıdır. Gyrus frontalis superior, gyrus frontalis medius ve gyrus frontalis inferiorun büyük bir kısmı ile gyri orbitales ve gyrus cingulinin ön yarısını (Brodmann'ın 9, 10, 11, 12. alanları) kapsar (19).

Kotekste değişik tipte nöronlar bulunur :

1. Piramidal nöron: Nöron gövdesi piramit biçimlidir. Hücre gövdelerinin çoğunluğu 10-15 µm uzunluğundadır. Apikal dendrit yukarı dışa uzanırken, lateral dendrit horizontal uzanır. Akson ise gövdenin bazalinden çıkarak içe derinlere doğru uzanır, bir kısmı ak cevhere geçer, bir kısmı ak cevherden yeniden kortekse girerek assosiasyon fibrillerini oluşturur. Gövde uzunluğu 120 µm olan en büyüklerine ise **Betz'in dev piramidal hücreleri** denir. Bunlar lobus frontalis'in motor gyrus precentralisinde bulunurlar.

2. Stellat (Granüler) nöron: Uzantıları nedeniyle yıldız biçiminde olan, 8 µm çaplı küçük nöronlardır. Aksonu çok kısadır ve korteks içinde kalarak yakınındaki piramidal hücrelerin dendritleri çevresinde pleksus yapar.

3. Fuziform nöronlar: Modifiye stellat nöronlardır. Genellikle korteksin en derin tabakasında bulunurlar. Dendritler hücre gövdesinin her bir kutbundan çıkarlar. Yüzeysel dendrit, korteksin yüzeyine doğru uzanıp yüzeysel tabakalarda dallanırken, alttaki dendrit aynı hücre tabakası içinde dallanır. Akson, hücre gövdesinin alt bölümünden çıkar ve beyaz cevhere bir projeksiyon, assosiasyon veya komissural lif olarak girer.

4. Horizontal nöron (Cajal`ın horizontal hücreleri): Yüzeyle yerleşmiş horizontal konumdaki küçük, füziform nöronlardır.

5. Martinotti nöronları: Küçük multipolar, tersine dönük piramidal nöronlardır. Hücre kısa dendritlere sahiptir. Akson ise korteksin yüzeyine doğrudur; çoğunluğu en yüzeysel tabakada olmak üzere daha yüzeysel bir tabakada sonlanır. Akson seyri boyunca, az sayıda kısa kollateral dallar verir.

Histolojik olarak beyin, yüzeye paralel 6 tabakadan meydana gelir. Tabaka kalınlıkları, hücre sayıları hemisferin değişik kısımlarında farklılık gösterir. Dıştan içe doğru:

1. Stratum moleculare: En ince tabakadır. Az sayıda horizontal hücre ve çok sayıda horizontal seyirli nöron uzantısı (alt tabakalardaki nöron dendritleri, stellat hücre ve martinotti nöronlarının aksonları) bulunur. Bu sinir fibrilleri arasında tek tük Cajal`ın yassı horizontal hücreleri bulunur. Korteksin bu en yüzeysel tabakası, farklı nöronlar arasında çok sayıda sinapsın olduğu yerdir.

2. Stratum granulare eksternum: Küçük piramidal nöronlar ve stellat (granüler) nöronlar bulunur. Komşu tabakalardan gelen akson ve dendritlerle bu tabakadaki akson ve dendritler yoğun bir ağ oluşturur. 5 tabakadaki piramidal nöronların apikal dendritleri ile assenden afferent fibriller arasında çok sayıda sinaps vardır.

3. Stratum pyramidalis: Orta çapta piramidal hücreler ve 2 tabakaya yakın yerleşmiş küçük piramidal nöronlar ile horizontal ve vertikal konumdaki fuziform nöronlar yer alır. Apikal dendritler moleküler tabakaya girerken, aksonlar projeksiyon, assosiasyon veya komissural lifler olarak beyaz cevhere girerler.

4. Stratum granulare internum: Moleküler tabakadan sonra en ince tabakadır. Başlıca stellat nöron, nadiren küçük piramidal nöronlar bulunur. Hücreler yoğun yerleşimlidir. Horizontal seyirli fibrillerin yoğunlaşmasıyla **Bailinger`in dış bandı** diye

bilinen fibriller alan ortaya çıkmıştır. Bunlar komşu tabakalarda, subkortikal bölgede, korteksin diğer kısımlarında yerleşik nöronların horizontal seyirli nöritleridir.

5. Stratum ganglionare: En büyük piramidal nöronlar ve az sayıda da stellat hücreler vardır. Piramidal nöronların büyüklüğü değişik alanlarda farklılık gösterir. Gyrus precentralisin motor korteksinde bu tabakanın piramidal hücreleri çok büyüktür ve *Betz hücreleri* olarak adlandırılırlar. Bu hücreler traktus piramidalis veya traktus kortikospinalisin projeksiyon liflerinin yaklaşık %3`ünü teşkil eder. Bu tabakada da 4. tabakadaki gibi horizontal seyirli fibrillerin yoğunlaşmasıyla **Bailinger'in iç bandı** oluşmuştur.

6. Stratum multiforme: Değişik nöron tipleri ve uzantılarında oluşan en derindeki tabakadır. Martinotti nöronları en belirginleridir. Hücrelerin çoğu fuziform şekilli olduğu halde, birçoğu hücre gövdeleri üçgen veya oval olan piramidal hücrelere değişmiştir. Alttaki beyaz cevhere giren veya çıkan çok sayıda sinir lifi bulunur.

2-3. tabakaya beraberce Supranükleer Tabaka, 5-6. tabakaya İnfragranüler Tabaka denmektedir. İnsanda supragranüler tabaka en son gelişir ve en ileri farklanma gösteren tabakadır.

Serebral korteksin tüm alanları bu 6 tabakaya sahip değildir. 6 esas tabakanın tanımlanamadığı korteks alanları **heterotipik**; aksine 6 tabakaya sahip olanlar **homotipik** olarak adlandırılır (15,16, 17).

Çok sayıda kognitif fonksiyonu bulunan prefrontal korteks subkortikal yapıların aktivite ve hiyerarşik kontrolünü sağlamaktadır.

Prefrontal alan, bireyin kişiliğinin oluşması ile ilgilidir. Çoğu kortikal ve subkortikal kaynaklardan gelen uyarıların sonucu olarak, kişinin duyuşal derinliğini düzenler. Ayrıca bireysel girişim, karar verme ve yorumunda da etkilidir (18).

Bu bölge, kuramsal fikirler, yargı, emosyonel duygu ve kişiliğın oluşması için gerekli olan deneyimlere yardım etme yeteneğinde olan bir korteks alanıdır. Prefrontal korteksin tümörleri veya travmatik tahribi kişinin tessebbüs ve yargı yeteneğini kaybetmesi ile sonuçlanır.

Prefrontal assosiasyon alanı, düşüncelerin işlenmesi ve olgunlaştırılması için önemli bir yapı olarak tanımlanmaktadır. Her yeni bilginin beyne ulaşması ve bu bilginin analizi için gerekli plan çalışan belleğın oluşturulmasında rolü olduğu düşünölmektedir.

Prefrontal alanların dikkatin sürdürülmesi, yazılan sözcüklerin tanınması, planlama ve kontrol etme gibi değişik kognitif fonksiyonları vardır. Zihinsel faaliyetlerin amaca yönelik sıralanmasında önemli rol oynar. Bu faaliyetler arasında geleceği tahmin etme, gelen duyuşal cevabı geciktirerek en iyi olduğuna karar verilen cevabın hazırlanması, motor hareketlerin uygulanmadan sonucunun kestirilmesi, komplike matematik ve karmaşık soyut problemlerin çözülmesi, işlevlerin toplumsal kurallara göre denetlenmesini içerir (19, 20, 21).

3.2.5. Hipokampus

Hipokampus; lateral ventrikülün alt boynuz tabanı boyunca uzanan, yaklaşık 5-8 cm. uzunluğunda bir gri cevher bölgesidir. Aslında temporal lob korteksinin bir bölümünün, yan ventrikülün lateral yüzünü oluşturmak üzere içeriye doğru katlanmasından ibarettir (19, 21).

Filogenetik olarak beynin en eski bölümlerinden olan hipokampus, koronal kesitlerde C harfi şeklinde görülür. Deniz atına benzediğinden dolayı anatomist Arantius tarafından hipokampus adı verilen bu yapı, cornu ammonis adı ile de anılmıştır (19, 20).

Ventriküle bakan yüzü endim hücreleri ile örtülüdür. Bunun altındaki beyaz cevher kısmına alveolus hipokampi adı verilir. Bu yapının fibrilleri mediale uzanarak fimbria hipokampi'yi oluştururlar.

Ramony Cajal isimli araştırmacı, hipokampus içinde yedi tabaka belirlemiştir. Ancak bu farklı tabakalar üç ana tabaka olarak incelenmektedir.

- 1. Stratum oriens (Polimorfik tabaka):** Piramidal hücrelerin bazal dendritleri ile internöronların yerleştiği tabakadır. Buradaki çoğu nöron aksonları alveolus liflerine katılır. Diğer hücre aksonları ise moleküler tabakaya kadar uzanır.
- 2. Stratum pyramidalis:** Bu tabakada piramidal hücreler çoğunluktadır. Hipokampusa asıl şeklini veren buradaki piramidal hücrelerin dizilimidir.
- 3. Stratum moleculare:** En içte yer alan tabakadır.

Piramidal hücrelerin daha yoğun bulunduğu hipokampus kısmına superior bölüm, daha az bulunduğu kısmına inferior bölüm denir.

Cornu Ammonis'in baş harflerini temsilen CA olarak da ifade edilebilen hipokampus, hücre yapısındaki değişikliklerden dolayı kendi içinde CA1, CA2, CA3, CA4 gibi alanlara bölünmüştür.

CA1 insanda en büyük alan olup subikuluma en yakın olan alandır. Sommer'in alanı olarak da tanımlanan bu alan, anoksi ve iskemiye duyarlılığı nedeniyle çok önemlidir. Ayrıca temporal lob epilepsilerinin bazıları için "tetikleyici alan" olarak kabul edilir. CA2 ve CA3 hipokampusun inferior bölümünde yer alırlar. Direçli alan olarak anoksiye karşı az duyarlıdırlar. CA4 (Bratz alanı) ise hipokampus ile gyrus dentatus arasında yer alır. Hipoksiye duyarlılığı orta derecededir (20).

Hipokampusun hem yapısının karmaşıklığı, hem de beyindeki birçok bölge ile yakın ilişkisi, foksiyonunun açıklanmasını güçleştirmektedir. Hemen her türlü duysal uyarı hipokampusun çeşitli bölümlerinin aktivasyonuna neden olur. Bundan dolayı gelen duysal sinyalleri içerisinden geçiren ek bir kanal görevi görür (21).

Hipokampusun hafıza, özellikle kısa süreli hafıza ile ilgili olduğu bilinmektedir. Sağ hipokampus görsel, sol hipokampus ise sözel hafıza ile ilgili fonksiyonlarda daha fazla aktivite göstermektedir.

Kısa süreli belleği uzun süreli belleğe çevirir. Yeni bilgilerin kalıcı bilgi olarak depolanması amacıyla sinyaller ürettiği ileri sürülmektedir. Hipokampusu etkileyen lezyonu olan hastalarda kısa süreli hafızanın uzun süreli hafızaya dönüştürülemediği gözlenmiştir (19, 20, 21).

Heyecan uyandıran reaksiyonlar veya heyecanın kontrolü, iç organlara ait aktivitenin düzenlenmesi ve serebral korteks üzerine olan retiküler aktivitenin ayarlanması gibi fonksiyonlara da katıldığı kabul edilmektedir.

Değişik alanlarının uyarılması ile hiddet, edilgenlik ve aşırı seks güdüsü gibi davranışların görülmesine sebep olur (20).

3.3. SEREBRAL İSKEMİ

Normal bir erişkin beyninden bir dakikada geçen kan miktarı 750-900 ml. dolaylarındadır. Beyin, total vücut ağırlığının %2'si kadar bir ağırlığı olmasına karşın kalpten atılan kanın % 15'ini ve vücut tarafından tüketilen oksijenin % 20'sini kullanır. Bu durum beyin dokusunun bol kanla beslendiğini ve metabolizmasının yüksek olduğunu göstermektedir (22, 23, 24).

Gri ve ak cevherin aldıkları kan miktarı da farklıdır. Gri cevherin çok yoğun bir kapiller ağı olup ak cevhere kıyasla 3-5 kat fazla kanla sulanmaktadır. Bunun nedeni hücre gövdelerinin gri cevherde bulunmasıdır (22).

Beynin kanlanması iki arter sistemiyle sağlanmaktadır. 1- Karotis sistemi, 2-Vertebro-baziler sistem. Kan akımının büyük bir bölümü karotis sistemince sağlanır . Bu kanın taşıdığı glikoz ve oksijen, beyin metabolizması için temel gereksinim maddeleridir (23).

Beyin enerji oluşturmak için yüksek metabolik gereksinim gösteren bir organdır. ATP formundaki yüksek enerjili fosfat, hücrenin pek çok yapım ve yıkım reaksiyonları için gereklidir. Bunlar hücre membranından taşıma, protein sentezi, lipogenez ve fosfolipid döngüsü için gerekli reaksiyonlardır (12).

Diğer organlardan farklı olarak enerji metabolizmasında sadece glikoz kullanır. CMB glu (glikoz metabolizma hızı) 5mg/100gr/dak, 75-100 mg/dak ya da 125gr/gün'dür (24, 25).

Glikoz beyinde iki yol ile metabolize olur:

- Aerobik metabolizma ile 36 ATP kazanılır.
- Anaerobik metabolizma ile de 2 ATP + laktik asit elde edilir (26).

Santral sinir sisteminin metabolik ihtiyaçları ve bunun için gerekli olan kan akımı arasında hassas bir denge vardır ve bu denge beyinde otoregülasyon mekanizması ile sağlanmaktadır.

Serebral kan akımı (SKA) 100 gr beyin dokusu için dakikadaki kan hacmi olarak tanımlanır. Bazal şartlar altında SKA 50-55 ml/100 gr/dakikadır ve serebral perfüzyon basıncının (SPB), serebrovasküler rezistansa (SVR) oranıyla belirlenir.

$$SKA = SPB / SVR \text{ (24, 25).}$$

SPB ise kanı serebral sirkülasyona yollayan arterial basınçla geri dönen venöz basınç arasındaki farktır ve normal koşullarda sabittir. Serebral otoregülasyon arterial basıncın 60-160 mmHg arasında kaldığı durumlarda çalışmaktadır.

Otoregülasyonu bozan durumlar:

- Düffüz serebral iskemi
- İskemik inme
- Kafa travması
- Vazospazm
- Karotis stenozu ya/ya da oklüzyonu
- paCO₂'nin yüksek olması (23, 24, 25)

Beyin kendisindeki kan akımı değişikliklerine karşı son derece duyarlıdır. Bu nedenle SKA`da değişikliklerin gelişim süreci, yaygınlığı ve miktarına bağlı olarak, çok kısa zamanda irreversibl parankimal hasar oluşabilir. Serebral iskemi kan akımının doku canlılığının devamı için gerekli olan seviyenin altına düşmesi ile gelişir. Bu değer 30 ml`ye kadar düşmesi serebral otoregülasyon mekanizmalarının devreye girmesi sonucu herhangi bir nörolojik iskemik semptom oluşturmazken, 30-20 ml`ye düşmesi ile geçici iskemik ataklar meydana gelir (27). Serebral fonksiyonun korunması için gerekli SKA 18-20 ml/100gr/dk. dır. SKA`nin bu eşik değer aşığına düşmesi ve bu düzeyde 5 dakika ya da daha fazla devamlılık göstermesi kalıcı nörolojik kayıplar ile birlikte serebral infakta yol açar (23, 24). Kısa sürede geriye dönüşsüz hasarın görüldüğü dens bir **iskemik merkez** (iskemik çekirdek) meydana gelir. Bu bölgenin etrafında kan akımının azaldığı ancak kalıcı bir hasarın meydana gelmediği daha az dens bir alan bulunur. Hücrenin elektriksel aktivitesinin durup, membran potansiyelinin korunduğu bu alana **iskemik penumbra** denir. Burası kısa sürede reperfüzyon gerçekleşirse kurtarılabilir beyin dokusudur (5, 23).

Santral sinir sisteminde belirli bölgeler ve hücre grupları hipoksik-iskemik incinmeye diğerlerinden daha hassastırlar. Nöronlar en duyarlıdır ve bunları astrositler, oligodendroglialar ve endotelial hücreler takip eder. Nöronlar arasında da duyarlılık farklıdır. Hipokampal CA1 piramidal hücreler, neokorteksin III, V, VI. tabakalarındaki nöronlar, serebellar purkinje hücreleri ve neostriatumdaki küçük ve orta boyutlu nöronlar en duyarlıdır (27).

3.3.1. İskemik Depolarizasyon

İskemi sonucu vasküler yatakta otoregölasyonun bozulması ve perfüzyon basıncının düşmesi, dokulara yeterli glikoz ve oksijen sağlanamamasına, dolaylı olarak da enerji yetersizliği ve ATP depolarında azalmaya neden olur (12, 28, 29). Oksijen seviyesi düştüğünde mitokondrilerdeki oksidatif fosforilasyon sona erer. Hücre canlılığının devamı için gerekli olan enerji (ATP), glikojen depolarından glikoliz yoluyla yani anaerobik olarak üreilmeye başlar. Sonuçta glikojen depoları hızla azalır. Glikoliz, laktik asit ve inorganik fosfatların artımı ile sonuçlanır, laktik asidoz oluşur ve hücre içi pH'ı düşer. Bu durumda yüksek düzeyde ATP ihtiyacı gösteren iyon kanallarının aktivitesi, Na pompası ve buna bağlı membran stabilizasyonu bozulur. Potasyum hücre dışına çıkarken, sodyum, klor ve su hücre içine girerek membran depolarizasyonu oluşur. İyon dengesinin bu şekilde değişmesi akut hücre şişmesine neden olur (12, 13). İskemik nöronlardan K⁺ ve glutamatın ekstrasellüler aralığa geçmesi ile komşu hücrelerde de periinfakt depolarizasyon denilen depolarizasyon dalgası meydana gelir ve lezyon gittikçe genişler (28).

3.3.2. Glutamat Eksitotoksitesi ve Kalsiyum Sitotoksitesi

İskemi sırasında ATP azalması sonucu Na-K pompası gibi enerjile çalışan sistemler bozulmaktadır. Bu da membran potansiyelinin bozulmasına ve nöronlarla glial hücrelerin depolarize olmasına neden olmaktadır. Bunun sonucunda presinaptik uçtan ekstrasellüler aralığa aşırı bir glutamat salınımı olur (23, 30).

Glutamat güçlü etkileri olan ve merkezi sinir sisteminde oldukça yüksek konsantrasyonlarda bulunan bir eksitatör aminoasittir (EAA). Öğrenme, hafıza, hareket, duyuusal bağlantıların sağlanması gibi pekçok nörolojik fonksiyonda görev alır (30, 31, 32). Etkilerini reseptörleri üzerinden gösterir:

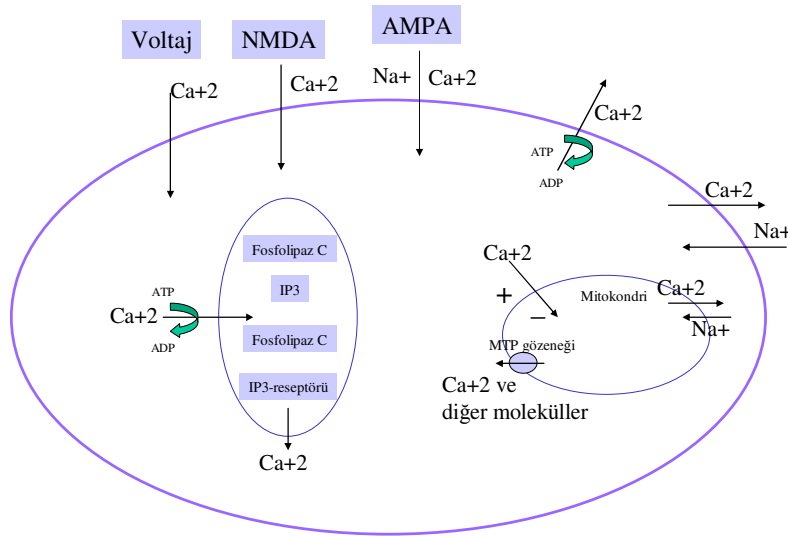
1) İyonotropik Glutamat Reseptörleri: İyon kanalları üzerinden etkilerini gösteren reseptörlerdir.

- N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörleri
- alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propionik asit (AMPA) reseptörleri

2) Metabotropik Glutamat Reseptörleri: Transmembran proteinlerine bağlıdır. Uyarılmaları sonucu guanin nükleotid bağlayıcı protein (G protein) üzerinden etki gösteren reseptörlerdir (33, 34).

İskemide bir yandan aşırı miktarda glutamat salınımı meydana gelirken, bir yandan da enerjiye bağımlı presinaptik geri alım mekanizmalarının bozulması ekstrasellüler aralıkta glutamatın yüksek miktarda artışına neden olur. Bu yolla NMDA ve AMPA reseptörleri aktivasyonu ile şiddetli ve devamlı depolarizasyon meydana gelir. İskemik beyinde aşırı miktarda salınan eksitator aminoasitlerin meydana getirdiği bu nöronal hasar “eksitotoksisite” olarak tanımlanır (23, 30, 35, 36). Hem NMDA reseptörleri ve AMPA reseptörleri aracılığı ile hem de depolarizasyon sonucu voltaj kapılı kalsiyum kanallarının aktivasyonu ile bol miktarda Ca^{+2} hücre içine girer.

Normal koşullarda ekstrasellüler Ca^{+2} konsantrasyonu intrasellüler kompartımana oranla 10 000 kat yüksektir. Konsantrasyon fazlalığında Ca^{+2} , voltaj gradyanıyla ya da ATP kullanarak endoplazmik retikulum ve mitokondriye girmekte ve bu organellerde birikmektedir. Aşırı birikim halinde, ER (endoplazmik retikulum) içindeki Ca^{+2} glutamatın metabotropik reseptör aktivasyonu ile, mitokondri içindeki Ca^{+2} da MPT (mitokondrial permeabilite transit) gözenekleri aracılığı ile organel dışına, hücre içine gönderilmektedir. Hücre içindeki Ca^{+2} da, Na-Ca değiştirici sistem ve ATP kullanarak Ca^{+2} u hücre dışına çıkaran Ca pompası ile hücre dışına atılmakta ve böylelikle hemostazın devamı sağlanmaktadır (Şekil 1) (29, 37).

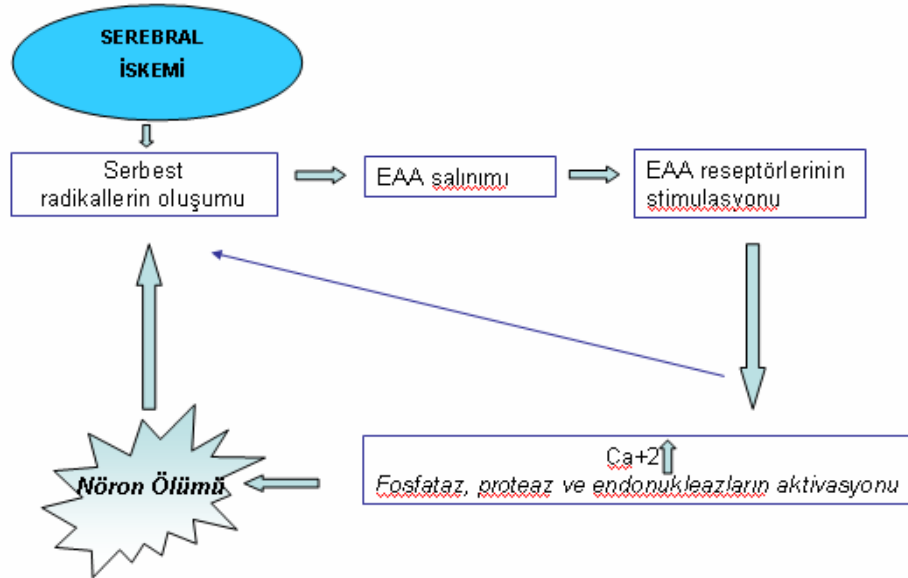


Şekil 1: Ca^{+2} hemostaz şeması

İskemik koşullarda ise Ca^{+2} aşırı birikim sonucu ER ve mitokondriden hücre içine gönderilmekte, ancak ATP'ye bağımlı sistem ve pompaların bozulması nedeniyle hücre dışına gönderilememektedir. Tüm bunların sonucunda Ca^{+2} 'un hücre içindeki konsantrasyonu aşırı şekilde artar (29, 37, 38, 39).

Glutamat reseptörleri aktive olduklarında en çok NMDA reseptörleri Ca^{+2} 'un hücre içine girmesine yol açar. NMDA reseptörlerinden Ca^{+2} geçişi olurken, AMPA reseptörleri Ca^{+2} dışında tek değerlikli katyonların da geçişine izin verir ve Ca^{+2} 'un yanısıra Na^+ da hücre içine girer. İntrasellüler Na^+ miktarının artması suyun hücre içine pasif geçişine neden olur. Bu şekilde oluşan hücre şişmesi, perfüzyonu kötü etkilemekte, intrakranial basıncı arttıran vasküler kompresyon ve herniasyon yaratan beyin ödeminin ilk basamaklarından biri olarak karşımıza çıkmaktadır (32) .

Sellüler hasar sürecinin başlamasında kalsiyum iyon hemostazının bozulması en kritik noktadır. İskemi sırasında intrasellüler kalsiyum hızla çoğalmaktadır. Hücre içinde kalsiyumun artması hücrede potansiyel çok sayıda enzimi aktif hale geçirir. Sonuçta kalsiyumun aktive ettiği fosfolipaz, proteaz, ATP'az ve endonükleaz aktivasyonu hücre hasarına neden olur (Şekil 2) (3, 4, 5, 6, 30).



Şekil 2 : EAA etki mekanizması

3.3.3. Lipaz Aktivasyonu

Kalsiyumun aktive ettiği fosfolipazlar, membran lipidlerini araşidonik asit ve diğer vazoaktif metabolitlere dönüştürürler. Endotelial ksantin dehidrogenaz, ksantin oksidaza dönüşür ki bu enzim reperfüzyon esnasında serbest radikal üretiminde rol alan önemli bir ajandır.

Hücre içi kalsiyum artışı ile plazma membranında bulunan fosfolipaz A2 aktive olur. Fosfolipazlar membran fosfolipidlerini yıkarak araşidonik asit oluşumuna neden olurlar. Araşidonik asit lipooksijenazlar ve siklooksijenazlar ile yıkılır. Lipooksijenazlar ile yıkıldığında lökotrienler, siklooksijenazlar ile yıkıldığında ise prostoglandinler (PGE_2 , PGF_2), prostasiklin (PGI_2) ve tromboksan A2 (TxA2) meydana gelir. Bu araşidonik asit ürünlerine "eikasonoidler" adı verilir (26).

Lökotrien B₄ (LTB₄) polimorfonükleer lökositlerde kemotaksis artışına ve beyaz kan hücrelerinin endotele adhezyonuna neden olmaktadır. Nötrofilleri aktive ederek nötrofillerin hidrojenperoksit (H_2O_2) ve proteolitik enzim salgılanmasına neden olmaktadır (38, 39, 40).

TxA2 ise vazokonstriksiyon ve trombosit agregasyonundan sorumludur. Aynı zamanda nötrofilleri aktive ederek H_2O_2 üretimine neden olurlar.

Hücre yapı taşlarından özellikle lipid membranların yıkımıyla ortamda serbest yağ asitleri ve lipid radikaller birikir. İskemi sonrası araşidonik asit ürünlerinin neden olduğu vazokonstriksiyon ve trombosit agregasyonu serbest radikal oluşumunu artırır ve lipid peroksidasyonu hasarını daha da derinleştirir (26).

3.3.4. Proteaz Aktivasyonu

İskemik beyinde hem ekstrasellüler, hem de intrasellüler proteazlar aktive olması hedef proteinlerin fonksiyonlarının bozulması ile sonuçlanır. İki tip proteaz bulunmaktadır:

1- İntrasellüler Proteazlar

- Kalpainler: Sistein proteazlardır.

İki izoformu bulunur: kalpain I ve kalpain II. Her ikisi de aktivasyon için Ca^{+2} a bağımlıdır. Fizyolojik koşullarda kalpain, geçici hücre içi Ca^{+2} artışı ile aktive olur ve spesifik bir inhibitör olan kalpastatin ile regüle edilir. İskemi sonucu hücre içi Ca^{+2} düzeyinin çok yükselmesi ile bu regülasyon mekanizmasının durmasına neden olur.

Bunun sonucunda da kalpain patolojik olarak artar. Kalpainlerin artışı ise çok sayıda proteinin fonksiyonunu bozarak, hücre ölümüne katkıda bulunurlar (23).

- Kaspazlar: İnflamasyon ve apoptozda rol alan sistein proteazlardır.

Kaspaz-1 daha çok inflamasyonda rol oynarken kaspaz-3,7,8,9 apoptoza giden yolda görev alırlar. Kaspaz-3 hem intrinsek ve hem de ekstrinsek apoptotik yolda rol oynayan önemli bir anahtar enzimdir (43, 44, 45, 46, 47).

2- Ekstrasellüler Proteazlar

- Matrix metalloproteinazlar (MMP)
- Ekstrasellüler serin proteazlar

Her ikisi de plazminojeni plazmine çevirir. Plazminin hem fibrinoliz yapıcı etkisi varken hem de matrix metaloproteinaz gelatinaz B (MMP-9) aktivasyonu sağlamaktadır. İskemi sonrası aktiviteleri artan MMP-9 ve diğer metalloproteinazlar, bazal lamina proteinlerinin yapısını bozmakta bunun sonucunda da KBB'de kırılma, ödem artışı ve nekrotik dokuda hemorajik transformasyon meydana gelmektedir (23).

3.3.5. Mitokondrial Disfonksiyon

Mitokondri, hücre ölümüne doğru bir dizi reaksiyonun başlamasında önemli rollerden birine sahiptir. Kalsiyumun hücre içinde aşırı birikmesiyle mitokondri zarar görür. Membran iç yüzeyindeki lipid çatısı bozulur ve mitokondride yüksek iletimli MPT gözeneği ortaya çıkar. Kalsiyumu mitokondri dışına çıkarmak amacıyla açılan bu gözenekten, moleküler ağırlığı 1,5 kD`a kadar olan diğer iyon ve moleküller de geçer. Bunun sonucunda mitokondride osmotik şişme meydana gelir.

Postiskemik nöronlarda MPT gözeneğinin açılmasını tetikleyen faktörler; ATP azalması, intrasellüler Ca^{+2} artışı, serbest radikaller ve diğer reseptör aracılıklı sinyallerdir. MPT gözeneğinin açılması, membran iç yüzünü depolarize eder ve aşırı süperoksit yapımına neden olur. Sitokrom c ve AIF (apoptotik indükleyici faktör) serbest kalır. Bunlar da, apoptotik kaspazları (başlıca kaspaz-3 olmak üzere) aktive ederler (23).

3.3.6. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, dış orbitalinde bir veya birden fazla sayıda çiftlenmemiş tek elektron taşıyan atom veya moleküllerdir. Tek elektronlu olan bu moleküller oldukça reaktif özelliktedir. Herhangi bir molekül ile etkileşime girerek bu molekülden ya bir elektron alır veya ona bir elektron verirler.

Serbest radikal reaksiyonları, normal metabolik yolların işleyişi sırasında da gözlenen doğal bir süreçtir. Normal fizyolojik koşullarda hücre sinyali iletiminde, biyolojik olaylarda rol oynarlar. Hücresel enzim ve elektron taşıma sistemlerinde de ara ürün olarak sınırlı miktarlarda oluşurlar (48, 49).

Vücutta serbest oksijen radikali (SOR) oluşumu:

- Eksojen kaynaklar
 - İyonizan ışınlar
 - Ksenobiyotikler
 - Hava kirliliği, sigara, UV ışınları
- Endojen kaynaklar
 - Mitokondrial elektron transport zinciri
 - ER elektron transport zinciri
 - Bazı enzimatik reaksiyonlar
 - Fagositoz
 - Prostaglandin sentezi ile meydana gelmektedir.

Oluşan bu serbest radikaller normal fizyolojik koşullarda organizmada bulunan antioksidan sistemler tarafından etkisizleştirilerek bir denge halinde tutulurlar. Biyokimyasal açıdan en önemli serbest radikaller oksijen kökenlidir. Bunlardan özellikle süperoksit ve hidroksil radikali çok reaktiftir.

Antioksidan savunma sistemleri

1. Enzimatik
 - Süperoksit dismutaz (SOD)
 - Katalaz
 - Glutatyon peroksidaz (GPx)

2. Non-enzimatik

- Membran yerleşimli (lipofilik)
 - Alfa-tokoferol
 - Beta-karoten
- Membran dışı yerleşimli (hidrofilik)
 - Askorbik asit
 - Ürik asit
 - Transferrin
 - Serüloplasmin
 - Haptoglobin
 - Albumin

Ancak serbest radikaller belli bir düzeyin üzerinde oluşur ve/veya antioksidanlar yetersiz kalırsa hücrenin yapı elemanlarını bozarak zararlı etkilere yol açarlar.

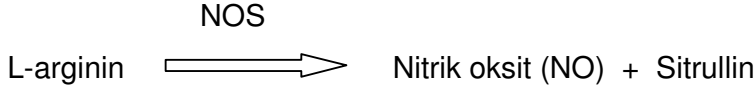
Serbest radikallerin zararlı etkileri:

- Lipid peroksidasyonu
- Proteinlere etki
 - Enzim denatürasyonu
 - Yapısal proteinlerde zararlanma
- Nükleik asidlere etki
 - DNA`da hidroksilasyon, çapraz bağlanma, kırılma vb (48, 49, 50)

İskemi sırasında serbest radikalleri temizleyen enzimlerin ve okside glutatyonun seviyesi düşer. İskemiye izleyen reperfüzyon sırasında da doku oksijene fazla miktarda maruz kalarak, serbest radikal yapımı daha da artmaktadır. Reperfüzyon fazında meydana gelen serbest radikallerin meydana getirdiği vazodilatasyon sonucu normal endotel yanıtı bozulduğundan KBB geçirgenliği artmakta, bunun sonucunda da ödem ve intrakranial basınçta yükselme meydana gelmektedir. Endotele yapışan ve beyin dokusuna giren enflamatuvar hücreler de zengin bir oksijen radikal kaynağıdır. Oluşan serbest radikaller; DNA, protein ve lipid yapılarının yıkımı ile endotel lezyonlarına neden olurlar (23, 30).

3.3.7. Nitrik Oksit

Nitrik oksit (NO), dokularda yaygın olarak bulunan gaz yapısında bir mediatördür. Vasküler endoteliumda kan akımı ve kan basıncının regülasyonunda, geçirgenlik ve sinaptik transmisyon gibi fizyolojik fonksiyonlarda rol oynamaktadır. Esansiyel bir aminoasit olan L-arginin`den nitrik oksit sentaz (NOS) aracılığı ile sentezlenir ve diffüzyon ile çevre hücrelere yayılır (51).



NOS`un 3 izoformu bulunmaktadır:

- nNOS (nöronal nitrik oksit sentaz)
- eNOS (endotelial nitrik oksit sentaz)
- iNOS (indüklenebilir nitrik oksit sentaz)

nNOS ve eNOS aktivitesi Ca/Kalmoduline bağımlıdır ve hücre içindeki kalsiyum artışı ile aktive olurken, iNOS ise kalsiyumdan bağımsızdır. iNOS, makrofaj, mikroglia ve başka hücrelerden de kaynaklanır (30).

Bunlardan eNOS, endotel hücreleri içinde NO yapımını artırır. Oluşan NO guanilat siklaz enzimini aktive ederek GTP`den c-GMP oluşumuna neden olur. Meydana gelen c-GMP de inaktif protein kinazları aktive ederek düz kas hücrelerinde relaksasyon yaparak vazodilatasyon oluşturur. Bu da beyin kan akımı artışını sağlar. Sonuç olarak, eNOS aracılığı ile oluşan NO`un iskemik hasarı azaltıcı etkisi vardır (23).

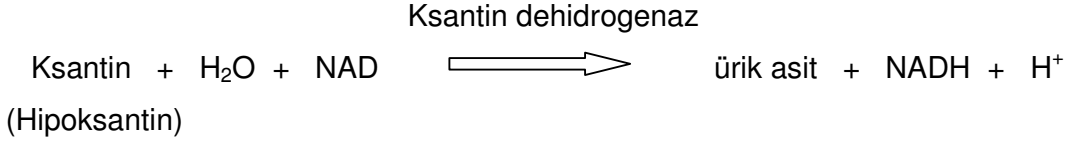
Nöronlardan nNOS aracılığı ile sentezlenen NO ile, iskemi ve sepsis gibi patolojik durumlarda iNOS aracılığı ile glial hücrelerden salıverilen NO ise toksiktir. Komşu nöronlara difüze olarak, iskemik hasarı ağırlaştırır.

NO ribonükleotid redüktaz aktivitesini baskılayarak DNA sentezini inhibe eder. Ayrıca DNA yapısını zedeleyerek, DNA tamir enzimi olan poly (ADP-ribose) polimeraz (PARP) enziminin de aktive olmasına neden olur.

İskemi-reperfüzyon fazla miktarda süperoksit oluşturduğu gibi, nitrik oksit yapımını da tetiklemektedir. NO ile süperoksitin birleşerek oluşturduğu peroksinitrit, KBB yıkımındaki esas faktörlerden biridir (23, 51).

3.3.8. Ksantin

Ksantin oksidaz endotel hücresinde önemli bir serbest radikal kaynağıdır. Normal koşullarda ksantin ve hipoksantin NAD varlığında ksantin dehidrogenaz enzimini kullanarak, ürik asit ve NADH`a çevrilir.



İskemi sırasında yüksek enerjili bir fosfat bileşiği olan ATP metabolizması sonucu hipoksantin ve ksantin gibi pürin metabolitlerinin konsantrasyonu yükselir ve dokuda aşırı miktarda hipoksantin birikir. ATP`nin yıkımının artışı sırasında hücre içine Ca^{+2} girişi ile kalsiyum proteazın artışına bağlı olarak ksantin dehidrogenaz ksantin oksidaz enzimine dönüşmektedir.

Reperfüzyon sırasında aniden ve çok miktarda oksijen sisteme dahil olur. Sisteme giren oksijen pürinlerin çok süratli bir şekilde okside olmalarına neden olur. Ürat ve süperoksit anyon radikali oluşur.

Ayrıca süperoksit anyon radikali endotelial hücrelerde H_2O_2 , HO, HOCl gibi diğer oksijen metabolitlerinin açığa çıkmasına neden olur (30, 38, 51).

3.3.9. Sitokinler

Sitokinler çeşitli reseptörler aracılığı ile hücreler arasında sinyal taşıyan solubl mediatörlerdir. Tümü büyüklükleri 8-30 kDa arasında değişen polipeptidlerdir. Bu moleküller lenfositlerin büyüme ve farklılaşmasında, antijenlerin eliminasyonunda ve hemapoetik hücrelerin gelişiminde rol oynarlar (54, 55).

Sitokinler etkilerini hedef hücrede spesifik yüzey reseptörlerine bağlanarak gösterirler. Başlıca görevleri hücre dışı bir sinyali alıp hücre içi bir sinyale dönüştürmektir. Bu reseptörler ligandlarına yüksek affinite gösterirler ve çok küçük miktar sitokinler dahi sellüler cevabı veren intrasellüler sinyal kaskadını başlatabilirler (55).

Sitokin reseptörleri transmembran proteinler olup, iki ana birimden oluşmaktadır. Extrasellüler bölge ile spesifik sitokinlerini bağlar, intrasellüler bölgeleriyle de sinyal

iletimini sağlarlar. Hedef hücrelerin membranlarındaki spesifik reseptörlere bağlanır, çoğunlukla hedef hücrelerde gen ekspresyonu ile yarışan sinyal iletim yollarını tetiklerler. Böylece hedef hücreler yeni fonksiyon geliştirebilir veya proliferere olabilir (56).

Serebral iskemi sonrasında, iskemik doku ve çevresinde sitokinler, interlökinler, kemokinler, lökositler, adezyon molekülleri gibi çok sayıda inflamatuvar mediatör gözlenmektedir.

Postiskemik inflamasyonun nöron üzerine olumsuz etkisi vardır. İskemi; mikroglia, endotel hücreleri ve nöronları aktive ederek, sitokinlerden özellikle Tümör Nekroz Faktör-alfa (TNF- α) ve İnterlökin1-beta (IL1- β) ekspresyonuna neden olur. TNF- α ve IL1- β , proinflamatuvar diğer sitokinlerin serbest kalmasını sağlar. Bunlar da endotel hücresi ve lökositlerdeki adezyon moleküllerinden selektin, ICAM-1 (İntersellüler Adhezyon Molekülü-1) , VCAM-1 (Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1) ve integrinleri aktive ederler.

Sonuç olarak; lökositlerin endotel hücrelerine adezyonu ve mikrovasküler tıkanmalar, sekonder iskemik olayları meydana getirir. Bunun yanı sıra, integrinler ve makrofajlar kan-beyin bariyerini geçerek nöronlar üzerine toksik etki gösterirler. İnflamasyonun hücre ölümüne, sekonder perfüzyon bozuklukları ve serbest radikal üretimi yoluyla katkıda bulunduğu düşünülmektedir (23, 54).

3.3.9.1. TNF Ailesi

Üzerinde en fazla çalışılan protein ailesidir. Bir çok sistemde fonksiyonu olan 19 üyesi vardır. Doğal ve kazanılmış bağışıklık, hücre regülasyonu, farklılaşma ve apoptozda önemli rollere sahip polipeptid yapıda bir sitokindir (56).

TNF vücutta başlıca makrofaj, monosit ve nötrofillerden salınır. Bunun dışında astrosit, mikroglia, düz kas hücreleri ve fibroblastlar da TNF sentezlerler (56,57). 2 formu bulunur; TNF- α (kaşektin) ve TNF- β (İenfotoksin). 6. kromozom üzerine lokalize farklı 2 gen tarafından kodlanırlar (55). Başlıca makrofajlardan salınan TNF- α 17 kDa, 157 aminoasitten meydana gelirken, TNF- β 25 kDa'dan meydana gelir (56). Bu iki form birbirleriyle % 35 homolog aminoasit içerir. Buna karşılık reseptörleri ve etki mekanizmaları aynıdır.

İki tip TNF reseptörü (TNF-R) bulunur; p55 (TNF-R1) ve p75 (TNF-R2). Bu reseptörler integral membran glikoproteinleridir. Sisteinden zengin ekstrasellüler bölgeleri birbirleri ile homolog iken, intrasellüler bölgeler küçük ve oldukça farklıdır. p55 reseptörlerinin intrasellüler kısmı apoptozun başlamasından sorumlu olması nedeniyle “ölüm bölgesi” olarak tanımlanır. Ölüm bölgesi, TRADD ve RIP gibi diğer sinyal adaptör molekülleri ile etkileşirler.

Her iki reseptör de TNF'nin iki formuna da affinite gösterir. Sitotoksinite, araziidonik asid salınımı ve gen ekspresyonunun modülasyonu gibi TNF'nin biyolojik aktivitelerinin büyük kısmı p55 reseptörleri tarafından yürütülür. Buna karşın p75 reseptörleri, hücre proliferasyonu kontrolü dahil mikroorganizma ve diğer patolojik faktörlere karşı konak savunmasında kritik bir rol oynamaktadır (55).

TNF, prohormon şeklinde membrana entegre halde bulunur. Uyarılara yanıt olarak 26 kDa'luk membranöz TNF (mTNF), TNF dönüştürücü enzim (TACE) tarafından yıkılır ve 17 kDa'luk matür ve solubl form (sTNF) oluşur, Oluşan moleküllerin üçü biraraya gelerek aktif olan homotrimer yapıyı oluşturur (58).

TNF- α sentezi interferon, bradikinin, immun kompleksler, siklooksigenaz inhibitörleri ve PAF gibi pek çok farklı uyarı ile indüklenmektedir (56).

3.3.9.2. IL-1 Ailesi

IL-1 ateşe neden olduğundan endojen pirojen olarak da isimlendirilen, beyin üzerinde etkileri olduğu tanımlanan ilk sitokindir (59, 60). Sentezlenen IL-1'in ana kaynağı monositlerdir. Aynı zamanda farklı kaynaklardaki aktive makrofajlardan ve periferel nötrofil granüositlerden de üretilirler. Bunların dışında endotelial hücreler, fibroblastlar, düz kas hücreleri, keratinositler, derinin Langerhans hücreleri, osteoklastlar, astrositler, timus ve korneanın epitelial hücreleri de IL üretirler.

Birbirine benzer fonksiyonlar gösteren 2 formu bulunur : IL-1 α ve IL-1 β . Her biri 17 kDa olan ve 2. kromozom üzerinde lokalize olan farklı 2 gen tarafından kodlanan bu sitokinlerden IL-1 α 159 aminoasitten meydana gelirken, IL-1 β 153 aminoasitten oluşur (56). IL'in her iki formu da aynı reseptöre bağlanır; IL-1 reseptör 1 (IL-1RI). IL-1RI sinyal üretimi için bir aksesuar proteine (AcP) ihtiyaç göstermektedir.

Bu ailenin üçüncü üyesi IL-1 reseptör antagonisti (IL-1ra) dır. IL-1`in tüm etkilerini bloke eden yüksek selektif kompetatif antagonisttir. Bu etkileri dışında tanımlanmış bağımsız bir etkisi bulunmamaktadır.

Her üç IL-1 molekülü de prekürsör olarak oluşur. Bunlardan pro- IL-1 α ve pro-IL-1 β biyolojik olarak aktif iken, pro-IL-1 β inaktiftir. Pro-IL-1 β aktif hale geçebilmek için kaspaz-1`in katalizörlüğüne gereksinim duyar (54, 55, 59, 61, 62). IL-1 β salınımı makrofaj veya mikroglia yüzeyindeki pürinerjik P2X₇ reseptörlerinin ekstrasellüler ATP ile aktivasyonu ile gerçekleşir. P2X₇ aktivasyonu hücre yüzeyinde por oluşumu, potasyumun dışa salınımı ve kaspaz-1 aktivasyonuna neden olur. IL-1`in reseptörüne bağlanması transkripsiyon faktör NF-kappa-B`yi aktive eder (59).

IL-1 ailesinin tüm üyeleri sağlıklı SSS`de beyin hücrelerinden düşük dozlarda eksprese edilirler. IL eksprese eden ilk hücre mikroglialardır. Fakat aynı zamanda astrositler, vasküler hücreler ve nöronlar da IL üretirler (54, 59, 62).

3.3.9.3. TNF ve IL`nin SSS`deki Etkileri

Sitokinler periferel dokuda üretilirler. Nöronal ve humoral uyarılar yoluyla beyine sinyal gönderirler. Ancak periferel infeksiyon ve inflamasyonda düzeylerinin yükselmesiyle beyin hücrelerinden de üretilirler (54). TNF ve IL-1 pek çok fonksiyonel ortak özelliği paylaşmaktadır (55).

Glial hücreler TNF ve IL-1 sentezledikleri gibi, aynı zamanda otokrin bir yolla salındıkları glial hücrelere de etki ederler. Her iki sitokin de astrogilozis olarak bilinen astrosit proliferasyonunu indüklerler. İn vivo deneylerde erişkin kemirgen beyinlerine IL-1 uygulamasının astrositozisi stimüle ettiği gözlenmiştir (63). TNF ve IL-1`in intraoküler enjeksiyonları, inflamatuvar hücrelerin vasküler endotelial yapışmasını arttırmakta ve tavşanlarda astrogilozisi uyarmaktadır (64) . SSS hasarı sonrasında astrositler ve reaktif astrositler yara iyileşmesinde de rol alabilirler. Reaktif astrositler hasar alanında ekstrasellüler aralığın moleküler ve iyonik içeriğini regüle ederler ve nörotropik faktörlerin de salgılanmasını indüklerler (65). Özellikle gelişmekte olan farelerde embriyonik beyin, spinal kord ve periferik sinirlerde TNF- α oldukça yüksektir (55).

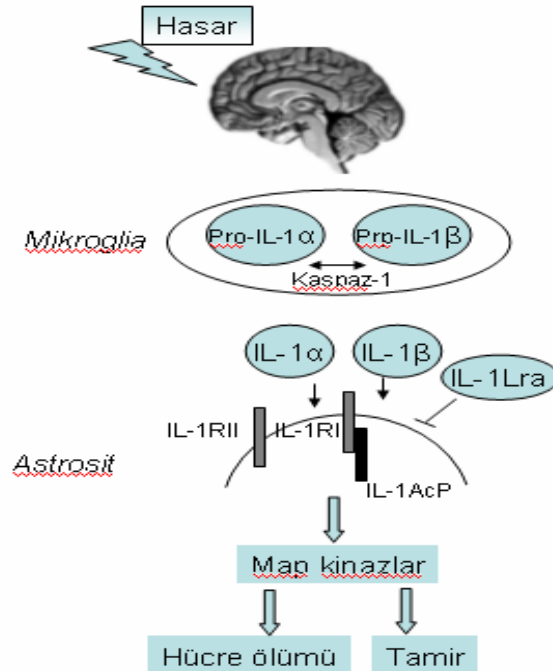
TNF ve IL-1 mikroglial hücreleri de aktive ederek proliferasyonlarını indüklerler. Bu proliferasyonun indüklenmesinde her iki sitokin sinerjistik hareket ederler.

TNF- α in vitro miyelin ve oligodendrosit hasarına aracılık eder, aynı zamanda oligodendrositlere karşı hücre ölümüyle sonuçlanan sitotoksik aktiviteye sahiptir. İn vitro ortamda TNF- β ile inkübe edilmiş oligodendrositlerin apoptoza gittiği gösterilmiştir.

SSS'de TNF- α üretiminin yükselmesi travmatik hasar, iskemi, infeksiyon ya da parankimal dejenerasyonuna bağlı hastalıklarda görülmektedir (55, 66, 67, 68, 69, 70).

TNF ve IL-1 endotelial hücrelerin permeabilitelerini arttırmaktadır. Bunun sonucu olarak adezyon moleküllerinin de salınımı indüklenmektedir. Bu durum SSS'de inflamatuvar reaksiyonu genişletirken, lenfosit ve monositlerin daha etkili adezyon ve proliferasyonuna neden olur. Aynı zamanda TNF endotelial hücrelerin koagülasyon mekanizmasında rol almasını sağlar. TNF protrombik durumda endotelial hücre yüzeyinde dengede anahtar görevi görmekte ve intravasküler koagülasyonu indüklemektedir.

TNF ve IL-1 kan damar gelişimini stimüle eder. Düşük konsantrasyonlarda sitokinler angiogenezi indüklerken, yüksek konsantrasyonlarda angiogenezi inhibe ederler. Revaskülarizasyonun SSS hasarını izleyen doku yaşamı ve fonksiyonel iyileşmesini sağlayan plastisite için gerekli olduğu düşünülmektedir (Şekil 3) (55).



Şekil 3: Sitokinlerin etki mekanizması

3.3.10. Sinir Büyüme Faktörü (NGF)

Serebral iskeminin neden olduğu oksidatif stres sonucu pek çok zararlı madde meydana gelmektedir. Organizmada bir yandan da hasar oluşumunu engellemeye yada oluşan hasarı azaltmaya yönelik faktörler çalışmaktadır. Bu faktörler arasında NGF önemli bir yer tutmaktadır.

NGF, Beyin-derive Nörotropik Faktör (BDNF), Nörotropin-3 (NT-3), Nörotropin-4/5 (NT-4/5) birlikte nörotropin ailesini meydana getirmektedir (71,72). NGF, nörotropin ailesinin ilk ve en iyi karakterize edilen üyesidir (73).

NGF ilk olarak 1950'li yıllarda Rita Levi-Montalcini tarafından fare sarkom doku transplantlarının tavuk embriyosunda spinal ganglia boyutlarında artışa neden olması ile keşfedildi. Daha sonra Stanley Cohen tarafından pürifikasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirildi (1985 yılında her ikisi de Nobel Ödülü ile ödüllendirildi) (74, 75).

Başlangıçta farelerin submaksiller bezlerinden izole edilen NGF'in hipotalamus, hipofiz, tiroid, testis ve epididimiden de sentezlendiği anlaşılmıştır. Aynı zamanda vasküler düz kas hücreleri ve fibroblastlar gibi pek çok hücre tarafından da üretilirler (56).

NGF 305 aminoasitli pro-nörotropin olarak sentezlenir. Prekürsör proteinin N ve C termallerindeki proteoliz sonucu matür form elde edilir. Her iki form da biyolojik olarak aktiftir. 130 kDa olan ve 118 aminoasitten meydana gelen NGF, 1. kromozom üzerinde lokalize olup birbirlerine kovalent bağla bağlanmış 3 alt ünitelerden oluşur; α , β ve γ (56, 71).

α ve γ alt üniteleri yapısal olarak tripsin-benzeri serin proteazlarla ilgili olan kallikrein ailesindedir. Bunlardan α -NGF inaktiftir. Non-disulfid bağlı bir homodimerik polipeptid olan β -NGF, NGF'nin tüm biyolojik aktivitelerinden sorumludur (56, 71). İnsan, fare ve rat β -NGF biyolojik aktivitelerinde yaklaşık %90 homolog özellik gösterirler (76). γ -NGF ise yüksek spesifik aktif proteazdır ve pre-NGF'yi matur formuna dönüştürme kapasitesine sahiptir.

NGF etkilerini iki önemli reseptöre bağlanarak gösterir; trkA (tirozin kinaz reseptör) ve p75 (düşük afiniteli nörotropin reseptör, LANR). NGF'nin pek çok biyolojik aktivitesi trkA'nın ligand bağımlı aktivasyonu ile gerçekleşir. trkA'ya bağlanma hızı hızlı bir tirozin otofosforilasyonu stimüle etmesi yanında, Ras-Erk

yolağı, fosfolipaz Cy1, PI3 kinaz ve SNT gibi pek çok sinyal transdüksiyon kaskadını da aktive etmektedir (56, 71).

p75, diğer nörotropinleri de kendisine bağlayan düşük affiniteli bir glikoproteindir. p75 aynı zamanda tümör nekroz faktör reseptör süperaillesinin bir üyesi olarak bilinmektedir. NF-kB ve c-Jun kinaz (JNK) aktiviteleri ve artan seramid yapımı gibi transdüksiyon yollarında da rol almaktadır (77) .

Pro-nörotropinler p75'e matür nörotropinlerden daha yüksek affinite ile bağlanırken, trk reseptörlerine zayıf olarak bağlanmaktadırlar. NGF nöronal yaşam ve ölüm dengesini idare etmektedir. Pek çok araştırma yaşamı devam ettirici nörotropin sinyallerinin trkA reseptörlerinin aktivasyonu ile, ölüm sinyallerinin ise p75 reseptörlerinin aktivasyonu ile gerçekteğiğini göstermiştir (78, 79).

NGF esas olarak periferik sinir sistemindeki duyusal ve sempatik nöronların yaşamsal, differansiasyon ve fonksiyonel aktivitelerinden sorumludur. Aynı zamanda SSS'deki kolinerjik nöronların gelişimi ve fonksiyonel aktivitesinde, erişkin SSS dokularında hasar tamiri ve nöral rejenerasyonda önemli rol oynamaktadır (56, 71, 84, 85, 86, 87, 88). İn vivo NGF uygulaması, fetal gelişim ve sinir rejenerasyonu üzerine etkilidir.

NGF'nin sinir, immun ve endokrin sistemler arasında belirgin bir dengeleyici role sahip olduğu düşünölmektedir (80).

NGF ekspresyonu SSS'nin korteks ve hipokampus gibi spesifik nöronlarında glutamat aracılığı ile pozitif, GABA ile ise negatif etkilenmektedir. Astrositlerdeki NGF sentezi IL-1, TNF- α ile artmaktadır. Bu faktörler schwann hücrelerindeki NGF sentezini ise etkilemediği gösterilmiştir.

NGF duyusal nöronlarda substans P (SP), somatostatin ve vazoaktif intestinal polipeptid (VIP) gibi pek çok spesifik transmitter benzeri peptid sentezini indökler. NGF sempatik sinirlerde noradrenalin salınımını inhibe eder (56).

Bunların dışında sinir sistemi dışındaki dokularda da oldukça geniş biyolojik aktiviteleri bulunmaktadır. Mast hücreleri NGF'den etkilendiği düşünölen ilk nöron dışı hücredir. NGF aynı zamanda mast hücrelerinin proliferasyonunu promote eder, histamin salınımını artırır ve çeşitli uyarılara karşı cevapta bazofiller tarafından lipid mediatörlerin oluşumuna neden olur (56, 71).

Mast hücreleri dışında insan bazofil, T ve B lenfositleri, monosit/makrofajlarda da tanımlanmıştır. NGF, B-hücrelerinin büyüme ve proliferasyonunu ve T-hücrelerinin büyümesini stimüle eder. Dahası allerjinin anahtar hücreleri olan insan periferik kan eozinofilleri de yapım ve salınımında NGF'den etkilenmektedir. İn vitro insan polimorfonükleer lökositlerin kemotaktik migrasyonunu stimüle eder (81, 82).

NGF çeşitli insan plazma hücreleri ile immunglobulin oluşumunu inhibe eder. İmmun ve inflamatuvar reaksiyonların regülasyonunda aksesuar rol oynar. Sitokinlerden IL-1, IL-6 ve bFGF (Fibroblast Büyüme Faktörü), NGF'nin potent indükleyicileridir. NGF, feokromasitoma hücrelerinde glial hücreler için bir büyüme faktörü gibi hareket eden IL-1 sentezini indükler (56).

Pek çok çalışma SSS dışında Lupus eritamosus, psöriasis, Kawasaki sendromu, skleroderma, romatoid artrit, astım, ürtiker-anjiödem, rinokonjunktivit, Vernal keratokonjunktivit gibi çeşitli otoimmün, inflamatuvar, fibrotik ve allerjik bozukluklarda plazma ve/veya serum NGF düzeylerinin arttığını göstermiştir (83, 89).

3.3.11. Apoptoz

Apoptoz, organizmanın ihtiyaç duymadığı, biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlanmış hücrelerin, zararsız bir biçimde ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür. Bu fizyolojik süreç insanlarda ve pek çok canlıda normal intrauterin gelişme ve erişkin yaşamı için hayati önem taşımaktadır (90).

Hücre ölümüyle ilgili ilk bilgiler 1920 yılında ışık mikroskopunun ve boya yöntemlerinin keşfiyle başlamış ve ilk olarak nekroz tanımlanmıştır (91). Fizyolojik olarak oluşan hücre ölümü uzun yıllardır bilinmesine rağmen "apoptoz" terimi ilk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie adındaki patologlar tarafından kullanılmıştır. 1972 yılında, iskemiyle karşılaşan dokunun etrafında nekrozdaki daha farklı bir hücre ölümü gösterilmiş ve buna ağaç yapraklarının gövdeden ayrılması anlamına gelen "apoptozis" adı verilmiştir (92).

3.3.11.1. Apoptozun İzlendiği Durumlar

Fizyolojik olaylar

- Embriyolojik gelişim sırasında

- intrauterin gelişim sırasında el ve ayak parmakları başlangıçta kapalı iken parmaklar arasındaki hücrelerin apoptoz ile yıkılması (93, 94)
- sinir sistemi ve immun sistemin gelişimi (93)
- embriyonun gelişmekte olan epidermisinin en üst sırasındaki bazı hücrelerin amnion sıvısına atılması (93)
- Hormona bağımlı doku involusyonu
 - prostat, endometrium ve meme dokusu hücreleri (95)
- Sürekli proliferen olan hücre gruplarının azaltılması
 - gastrointestinal sistem hücreleri, deri (92)
- İmmun sistemin düzenlenmesi
 - sitokin yetersizliğine bağlı T ve B lenfositlerin apoptozu (95)
- Metamorfoza uğramış veya yaşlanmış ve bu nedenle fonksiyonlarını kaybetmiş hücrelerin ortadan kaldırılması (91, 96, 97)

Patolojik olaylar

- Tümörlerde hem büyüme hem de regresyonda izlenen hücre ölümü
- Bazı viral hastalıklardaki hücre ölümü
 - HIV-1, HCV, Adenovirus enfeksiyonlarında (95)
 - viral hepatitte kc. de oluşan apoptotik hücreler Councilman cisimleri olarak bilinir (95)
- Pankreas, paratiroid ve böbrek gibi organlarda kanal obstruksiyonuna bağlı gelişen atrofilerde (94)
- Hipertermi, radyasyon, sitotoksik kemoterapi, hipoksi gibi çeşitli fiziksel ya da kimyasal etkenlerle oluşan hücre ölümü (91, 96, 97).

3.3.11.2. Apoptozdaki Morfolojik Değişikler

Apoptozda ışık mikroskopisi ile geç dönem değişiklikler tanımlanabilmekteyse de en iyi elektronmikroskopik görüntüleme ile sonuç alınabilmektedir. Özellikleri:

1) Yüzey organellerinin kaybı: Mikrovilluslar, bağlantı noktaları ortadan kalkar ve hücrenin komşuları ile bağlantısı kesilir.

2) Hücre büzülmesi: Hücre daha küçük boyuttadır, sitoplazma yoğundur, organeller göreceli olarak normal olmalarına rağmen daha sıkı paketlenmiştir.

3) Kromatin kondansasyonu: Apoptozun ışık mikroskopunda da seçilen en karakteristik özelliğidir. Kromatin periferde çekirdek zarının altında çeşitli şekil ve büyüklüklerde, iyi sınırlı, yoğun kitleler olarak kümelenir. Çekirdek ise iki ya da daha fazla parçaya ayrılabilir.

4) Sitoplazmik baloncuklar ya da apoptotik cisimlerin oluşumu: Hücrede membran dışına doğru baloncuklar oluşur. Sonra bu baloncuklar çok sayıda çekirdek parçası içerebilen zarla çevrili sitoplazma ve organel parçacıkları şeklinde hücreden ayrılır.

5) Apoptotik cisimler ve hücrelerin fagositozu: Komşu hücreler, parankimal hücreler ve makrofajlar bu cisimcikleri fagosite eder. Apoptotik cisimler hızla lizozomlar içinde parçalanır, komşu hücreler migrasyonla ya da proliferasyonla olarak apoptotik hücrenin boşluğunu doldurur (4, 90, 95, 97, 99).

Rutin ışık mikroskopik histolojik incelemede hematoksilin eozin ile boyanmış dokularda, apoptoz tek hücreyi veya hücre kümelerini tutar. Apoptotik hücreler yuvarlak veya oval, yoğun eozinofilik sitoplazmalı yoğun çekirdek kromatin parçaları ile birlikte görülür. Hücre küçülmesi ve apoptotik cisimlerin oluşması hızlıdır ve parçalar hızla fagosite edilir, parçalanır veya lümene dökülür. Histolojik kesitlerde görünür olmadan önce dokuda anlamlı apoptoz meydana gelebilir. Ek olarak apoptoz nekrozdan farklı olarak inflamasyon oluşturmaz ve bu da histolojik olarak saptanmasını güçleştirir (95).

3.3.11.3. Apoptoz Mekanizması

Apoptoz değişik olaylarla aktive olur. Başlangıç fazı için ilk önce, hücrenin ilgili genetik mekanizmayı harekete geçirecek bir sinyal ile karşılaşması gerekir. Bu sinyaller hücre içinden veya dışından gelebilir (99, 100, 101).

Bu sinyaller iki ana apoptotik yolu, hücre dışı/hücre ölüm reseptörü ya da hücre içi/mitokondrial yolu harekete geçirirler. Bu her iki yol da kaspazları aktive eder. Aktive olan kaspazlar hedef proteinlerini yıkarak, hücre içi değişikliklere neden olur. Sonuçta hücre parçalanarak apoptotik cisimlere ayrılır. Apoptotik cisimler de fagositoz yoluyla yok edilirler (90).

3.3.11.3.1. Ekstresek Yol

Hücre dışından kaynaklanan ve hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerinin tutulması ile düzenlenen apoptozdur.

Apoptozda rol alan membran ölüm reseptörleri içinde en önemli grup tümör nekroz faktör reseptör (TNFR) ailesidir. Bu reseptör grubunun tüm üyeleri apoptoz oluşturmaz. TNFR içinde apoptoz oluşturan reseptörlerden en önemlileri Fas ve TNFR1`dir. Bu reseptörler sinyalleri hücre içine ölüm zinciri içeren "adaptör protein" adı verilen birtakım başka proteinlerin yardımı ile taşırlar. Reseptörlerin sitoplazmanın iç kısmında kalan kısımları bu reseptörlere ligand bağlandığı zaman apoptotik mekanizmayı uyararak "adaptör proteinlere" bağlanırlar. Adaptör proteinler de apoptoz için başlatıcı olan kaspazlara (örn; prokaspaz 8) etki ederek aktifleşmelerini sağlar (90, 102, 103).

Hücre yüzey reseptörlerinden Fas (CD95, APO-1)'a Fas ligand bağlanır. Bunun sonucunda Fas resptörünün hücre içindeki parçası adaptör proteinlerden Fas adaptör proteinle (FADD) birleşerek ölüm başlatan sinyal kompleksi (DISC) meydana getirir. DISC'in oluşumuyla da prokaspaz 8 aktifleşerek diğer kaspazların aktivasyonunu başlatır (99).

Hücre yüzey reseptörlerinden TNFR1'e ise ligand olarak bir sitokin olan TNF bağlanır. THFR1'in hücre içindeki parçası ise TNFR adaptör proteinle (TRADD), daha sonra da FADD ile birleşerek prokaspaz 8 aktivasyonuna neden olur. Bu da ekstresek ve intrensek yolda ortak tetikleyici olan kaspaz-3'ü aktive eder (3, 91, 104).

3.3.11.3.2. İntrensek (mitokondrial) Yol

Artmış mitokondriyal geçirgenlik ve apoptoz öncüsü moleküllerin sitoplazmaya geçmesi sonucunda olur. İç sinyaller ile oluşan apoptozda mitokondri önemli rol oynamaktadır. Apoptoz ile ilgili pek çok protein mitokondri zarında bulunmaktadır. Gelen sinyaller dış mitokondri zarında geçirgenlik artışına neden olurlar. Bunun sonucunda da mitokondrial proteinler sitoplazma ve/veya çekirdeğe salınırlar (105).

Mitokondri dış zarının geçirgenliğini bazı proteinler ayarlamaktadır. Bunların en önemlisi bcl-2 grubu proteinlerdir. Bcl-2 ailesi, hücrenin apoptozdan korunmasını sağlayan antiapoptotik üyeler ve apoptozu açan pro-apoptotik üyelerden meydana gelir (106).

Bcl-2 proteini antiapoptotiktir. Mitokondri dış membranına ve apoptoz proteaz aktive edici faktör 1 (Apaf 1)`e tutunmuştur. Hücrenin içinden kaynaklanan apoptotik sinyaller Apaf 1`in mitokondriden ayrılmasına neden olur. Bu ayrılma dış mitokondri zarının geçirgenliğini artırır. Geçirgenliğin artması, mitokondrinin iki zarı arasında bulunan sitokrom c`nin sitoplazmaya çıkmasına neden olur. Sitokrom c sitoplazmada apaf 1, kaspaz 9 ve ATP ile birleşir. Oluşan yapıya apoptozom adı verilir. Apoptozom, sonlandırıcı kaspaz olan kaspaz-3`ü aktive ederek apoptoza neden olur (90, 107).

Apoptozda rol oynayan bu proteinlerin dışında mitokondrinin iç membranında bulunan bir flavoprotein olan AIF (Apoptoz indükleyici faktör) kaspazlardan bağımsız olarak mitokondriden çekirdeğe geçer ve kromatin kondansasyonu ile DNA parçalanmasına neden olur. Ayrıca IAP (apoptoz inhibe edici protein) ve FLIP (flice ligand inhibitor protein) proteinleri sitoplazmada önemli antiapoptotik proteinler olarak tanımlanmışlardır (106, 108).

3.3.11.3.3 Kaspazlar

Kaspazlar genellikle sitoplazmada aktif olmayan proenzim şeklinde bulunurlar. Hücre apoptoza başladıktan sonra parçalanır, aktif hale geçerler ve bu aktif kaspazlar proteolitik döngüde değişik hedeflere etki ederler. Bu güne kadar tanımlanan 14 kaspaz bulunmaktadır. Kaspazlar iki gruba ayrılırlar:

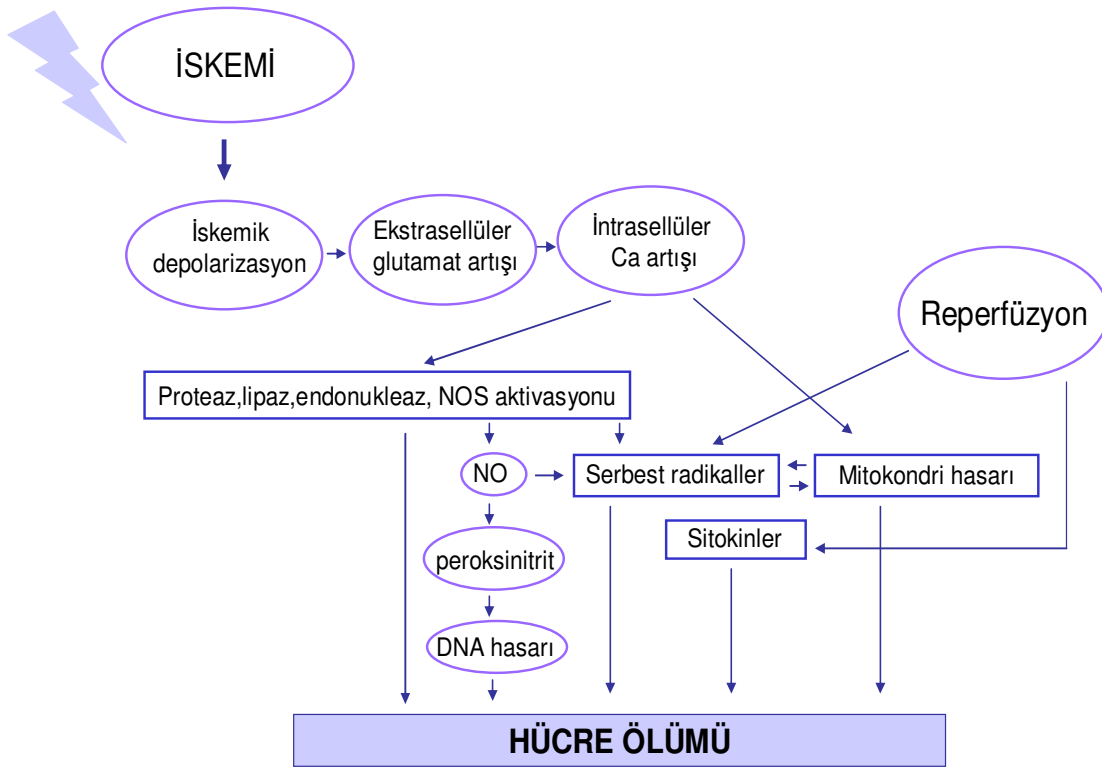
1) Başlatıcı kaspazlar: Apoptotik sinyal yolunun erken safhasında etki gösterirler. Adaptör proteinler veya spesifik bölgelerle etkileşime girerek ölüm sinyallerini ilerletici kaspazlara iletirler. kaspaz-2, kaspaz-8, kaspaz-9, kaspaz-10 kaspaz-12

2) İlerletici kaspazlar: Hedef proteinleri parçalayarak hücrede apoptotik yıkımı gerçekleştirirler. kaspaz-3, kaspaz-6, kaspaz-7

Ölüm reseptörleri adaptör proteinler aracılığı ile, iç sinyaller ise mitokondri aracılığı ile kaspazları aktive eder. Aktive olan başlatıcı kaspazlar da zincirleme olarak diğer kaspazları aktive ederler. Apoptozun bu son fazı proteolitik bir sıralı tepkimedir ve kaskatlı şelaleyi andırır. Bu yüzden de böyle hücre içi sıralı tepkimelere kısaca kaskat denilmektedir. Sonlandırıcı kaspazlar da aktive olduktan sonra sitoplazma ve

çekirdek içindeki hedef proteinleri hidrolizleyerek yıkarlar. Hücre iskeleti ve çekirdek matriks proteinlerini yıkarak hücre iskeletini parçalarlar (109, 110, 111, 112, 113).

Sonuçta ATP düzeylerindeki düşme ile başlayan iskemi pek çok histolojik ve biyokimyasal değişik ile sonuçlanmaktadır. Serebral iskemi sonucu eksitotoksisite ve aşırı kalsiyum yüklenmesi, serbest radikal oluşumu ve lipid peroksidasyonu gibi mekanizmalar birbirleriyle içiçe geçmiş karmaşık bir ilişki içindedir ve tüm bunların sonucunda da hücre ölümü meydana gelmektedir (3, 101, 102, 114, 115, 116) (Şekil 4).



Şekil 4: Serebral iskemi mekanizması

3.4. GINKGO BİLOBA EXTRESİ (EGb-761)

Ginkgo biloba (GB) antik bir Çin ağacıdır. Sağlığa yararlı etkileri nedeniyle yetiştirilmiş ve korunmuştur (9). 5.000 yıldan fazla zamandır meyve ve tohumları geleneksel Çin tıbbında astım, öksürük ve enüresis tedavisinde kullanılmaktadır (10). EGb-761, Ginkgo biloba ağacının yapraklarından elde edilen patentli bir extredir. 1964'te geliştirilmesinden sonra çok sayıda hastalık ve bozuklukta etkileri araştırılmıştır (9).

EGb-761'in hazırlanması için GB yaprakları henüz yeşilken toplanıp kurutulur ve 15 adımlı ekstraksiyon işlemine alınır. Ekstraksiyon işlemine aseton-su karışımıyla başlanır, sonra lipofilik yapılar çıkartılır ve aktif bileşenler konsantre edilir (9, 10).

EGb-761 ekstresinde standart olarak %24 flavonoid glikozidler ve %6 terpenoid laktonlar bulunur. Flavonoidler esas olarak quersetin, kamferol ve isorhamnenitin glikozdur. Terpenoid fraksiyonu diterpenler (ginkgolid A,B,C ve J) ve bilobalid'den oluşur. Ayrıca EGb-761, ekstrenin suda çözünürlüğünde rol oynadığı bildirilen kinürenik asit, hidroksikinürenik ve vanilik asit dahil organik asitleri içerir (9, 10, 117, 118).

Oral alım sonucu gastrointestinal sistemden hızla emilmektedir. Ginkgolid A, ginkgolid B ve bilobalid komponentlerinin biyoyararlılığı oldukça iyidir. Ginkgolid A için %100, ginkgolid B için %93, bilobalid için %72 biyoyararlanım mevcuttur. Maksimum plazma konsantrasyonu ginkgolid A için 15 ng/ml, ginkgolid B için 4 ng/ml, bilobalid için ise 12 ng/ml'dir. Yarılanma ömrü ise 3,2-7 saat arasında değişmektedir (9).

EGb-761'in pek çok biyokimyasal ve farmakolojik aktiviteleri bulunmaktadır:

- Antioksidan etkileri: Özellikle terpenoid fraksiyonları etkiler (9, 119, 120).
 - Normal metabolizmanın oksidan yan ürünleri mitokondri tarafından devamlı üretilir. Bu reaktif oksijen türleri DNA, protein ve lipidlerde oksidatif hasara neden olabilir. Terpenoidlerin antioksidan özelliklerinin serebral ve lipid metabolizması ve farklı nörotransmitterler üzerine etkilerine bağlı olduğu düşünülmektedir (120).
 - Peroksid radikal çöpçüsüdür (121).
 - EGb-761'in süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi olduğu bilinmektedir (9, 10).
 - İskemi-reperfüzyon sırasında superoksit anyonları ksantin oksidaz sistemiyle oluşur. Meydana gelen superoksit anyonlarını ortadan kaldırmaktadır (9).

- ROS'un doku düzeylerini düşürerek, membran lipid peroksidasyonunu önleyerek NO'i ortadan kaldırma kapasitesi vardır (122, 123).
- Nitrik oksid oluşumunda inhibisyona neden olur (122).
- Nöroprotektif etki
 - Özellikle beyin dokusunda olmak üzere hipoksiye toleransta artışa neden olur. Bu etki fosfodiesterazlar ve Na-K-ATPazlara bağlı olduğu düşünülmektedir (117).
 - Travmatik veya toksik nedenlerle oluşan beyin ödeminin gelişmesinde inhibisyon ve regresyonun hızlanmasına yol açar (124).
 - Kortikal infakt hacmini azaltır (124, 125, 126).
 - Serebral korteksin periferal benzodiazepin reseptör (PBR) seviyesinde azalmaya neden olmaktadır (123).
- PAF (Platet aktivasyon faktörü) antagonizmi etki: Özellikle ginkgolid fraksiyonu sorumludur. PAF hücre membranında yapılan bir otokoiddir, fosfolipid yapısındadır ve başlıca inflamatuvar hücreler olmak üzere pek çok hücre tarafından salgılanır. Akut iskemik olaylarda hücre dejenerasyonunda önemli bir mediatör olarak karşımıza çıkmaktadır. Ekstre içindeki çeşitli terpen türevleri PAF'ın hedef hücrelerde kendine özgü reseptörlerini antagonize ederek etki gösterir. PAF iskemi sonucu dokularda vasküler permeabiliteyi arttırmakta ve hücre iskeletinde bozulma ve endotel hasarına neden olmaktadır (9, 127).
- Kanın akışkanlık özelliklerinin iyileşmesini sağlar. Eritrosit hiperagragasyonu ve deformitesi üzerindeki etkileri sayesinde kan viskozitesini anlamlı ölçüde azaltır (9, 10).
- Özellikle mikrosirkulatuar alanda olmak üzere kan akımının düzelmesine yol açar. Beyin ve ekstremiteler için gerekli olan oksijen ve kan akımını sağlar. Beyne giden kandaki oksijen miktarını artırır. Kan damarları ve kapiller duvarların elastisite ve dayanıklılığını artırır. Kan-beyin bariyerinden glikoz alımını artırır (118).
- Antiapoptotik etki: Antiapoptotik etki mitokondrial bütünlüğü korumada önemli rol oynamaktadır. Apoptotik kaspaz şelalesinin başlamasına öncülük eden apoptozom oluşumunda kritik bir basamak olan mitokondriden sitokrom c salınımını azaltmaktadır. Antiapoptotik bcl-2 benzeri protein transkripsiyon regülasyonunu arttırmakta, endoplazmik retikulumda spesifik bir stres proteini olan pro-apoptotik kaspaz-12 transkripsiyonunu azaltmaktadır. Apoptozda anahtar rol oynayan kaspaz-

3 aktivasyonunu ve sonuçta da nükleer DNA fragmantasyonunu inhibe etmektedir (124, 128).

- Nöronal plastisiteyi artırır (123).
- Hipokampusta kolin alınımında düzelmeye birlikte muskarinik kolin reseptörleri ve alfa 2-adrenoreseptörlerin yaşa bağlı azalmasının inhibisyonuna neden olur (129).
- Retina ödeminin ve retina hücrelerinde lezyonların azaltır.
- Hafıza, dil, oryantasyon ve öğrenme kapasitesinin gelişmesine neden olur (9, 10).
- Nöroblastoma hücrelerinde amiloid β agregasyonunda inhibisyona yol açar (117).

3.5. SELENYUM

Selenyum önemli bir eser elementtir. Bir eser element olduğu 1957 yılının sonlarında bulunmuştur (130). Selenyum bileşikleri pek çok hücre siklusundaki regulatuar proteinler, sinyal molekülleri, proteazlar, mitokondri ile ilişkili faktörler, transkripsiyonel faktörler, tümör supressor genler, poliamin ve glutatyon seviyelerinin ekspresyonları ve/veya aktivitelerini düzenlerler (131).

Kimyasal özellikleri yönünden kükürte benzer. Karbona kovalent bağlarla bağlanabilir. Kükürt atomuna göre 10.000 kat daha fazla nükleofiliktir. Glutatyon peroksidaz enziminin aktif bölgesinde yer alan ve peroksit metabolizmasında aktif bir katalisttir. Selenyumun GSH peroksidazın aktif bölgesinde olduğuna dair ilk bilgiler Rotruck ve arkadaşları tarafından selenyum eksikliği bulunan sıçan eritrositlerinde peroksitin yol açtığı hemolizin ileri derecede şiddetlendiğinin gösterilmesi ile saptanmıştır (10, 131).

Glutatyon peroksidaz enzimi molekül başına 4 atom selenyum içerir. Glutatyon peroksidaz enziminin aktif merkezinde çok nadir bir aminoasit olan selenosistein bulunmaktadır. Enzimin molekül ağırlığı 84.000 moldür. Bu enzim herbiri bir atom selenyum kapsayan ve yaklaşık 21.000 mol ağırlıklı 4 alt birimden oluşmaktadır (131, 132).

GSH peroksidaz karaciğer, böbrek, eritrosit, damar endotel tabakası, gözün lensi başta olmak üzere birçok hücrede bulunmakta ve hücre membranı ile hücrenin fonksiyonel proteinlerini oksidan ajanlara karşı koruduğu kabul edilmektedir. Eritrositlerde H_2O_2 ve lipid hidroperoksitlerinin yıkımını, indirgenmiş glutatyonu ile katalizler. Antioksidan mekanizmada önemli bir rol oynamaktadır (130, 133, 134).

Yetişkin bir insan için selenyum ihtiyacı 55 µg/gün olarak kabul edilmiştir. Bunun 10-30 katı toksik etkilere neden olur. Selenyum bileşiklerinin akut toksisitesi ana olarak santral sinir sistemini etkilemektedir. Yaygın nekroz ve hemoraji, akciğerlerde bu lezyonlara sekonder olarak hipoksi ve ölüm görülebilir (130, 134, 135).

Eritrosit, kalp, karaciğer, böbrek, duodenum, testis, pankreas gibi çok sayıda dokuda selenyum bağlayan proteinlerin çoğu 58 K ve 26 K dalton alt birimlerinden oluşmuştur. Selenyumun biyolojik fonksiyonları selenoproteinler tarafından yürütülür.

30 çeşit selenyum bağlayan protein bulunmaktadır. İlk kez selenoprotein P'nin selenyum için bir taşıyıcı protein olduğu tesbit edilmiştir (10, 11, 136).

Gastrointestinal sistemden absorbe olan selenyum emilim mekanizması ve emilim yeri henüz belli değildir. İnsanlarda selenyum emilimi % 40 oranlarında olduğu gözlenmiştir. Miktarları; tüm kan 18,2 µg/100 ml, eritrosit 23,6 µg/100 ml, plazma 14,4 µg/100 ml, semen 54 µg/100 bulunmaktadır. Yaş ilerledikçe plazma ve hücre selenyum içeriğinin azaldığı öne sürülmüştür. Selenyum fazlası dimetil selenid olarak akciğerler yoluyla veya trimetil selenid olarak idrarla yoluyla vücut dışına atılır (130).

Sinir sisteminde iskemi sonucu glutamat salınımı ve Ca^{+2} artışına bağlı olarak ortaya çıkan oksidatif stresi ile glial aktivasyon artışına neden olarak doku hasarını azaltmaktadır. Eksitotoksisiteyi önlemekte, glutatyono-mimetik etki ile nöroprotektif özellik göstermektedir (137, 138, 139).

Kanser ve perkanseröz lezyonlarda kuvvetli bir kemoprevantif ajandır. Özellikle özefagus, akciğer, ovaryum, pankreas, tiroid, melanom, prostat ve kolon kanserlerine karşı koruyucudur (140, 141).

Mitokondrinin ATP sentezinde, koenzim biosentezinde ve immunolojik olaylarda büyük rol oynamaktadır.

Testiküler dejenerasyon, spermde hassasiyet ve motilite azalmasına neden olmaktadır. Eksikliğinde tiroid hormon metabolizmasının etkilendiği, ayrıca testesteron hormon sekresyonunun azaldığı görülmüştür (130).

4. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Birimi'nden (DETFAB) temin edilen 200-300 g. ağırlığında Wistar-Albino erkek sıçanlar kullanıldı. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında Wistar Albino suşunun bulunması ve literatürle uyumlu olması nedeniyle bu tür denek tercih edildi. Deneklerin çalışma süresince barındırılması ve bakımları bu ünite tarafından yapıldı. Denekler araştırma başlangıcına kadar 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamda $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ oda sıcaklığında barındırıldı ve standart pellet yem, musluk suyu ile beslendi.

Sham grubunda 4, diğer gruplarda 14 denek olacak şekilde 5 çalışma grubu oluşturuldu. Her gruptaki hayvanların yarısı histolojik ve immunhistokimyasal incelemeler için diğer yarısı da kan ve doku antioksidan enzim aktivitesi için kullanılmak üzere ayrıldı. Deney grupları aşağıdaki şekilde düzenlendi;

- Grup I. Sham. Arteria carotis communis açığa çıkartıldıktan sonra herhangi bir işlem yapılmayan grup.
- Grup II. İskemi - reperfüzyon (İR) uygulanıp salin (SF) verilen grup.
- Grup III. İskemi- reperfüzyon uygulanıp ginkgo biloba ekstresi verilen grup.
- Grup IV. İskemi- reperfüzyon uygulanıp selenyum verilen grup.
- Grup V. İskemi- reperfüzyon uygulanıp ginkgo biloba ekstresi ve selenyumun birlikte verildiği grup.

Deneysel iskemi-reperfüzyon modelinde kullanılan deney hayvanları (n=56) deneyin bir gece öncesinden aç bırakıldı. Anestezileri intraperitoneal (i.p.) 80 mg/kg ketamin ile yapıldı. Deneklere, sırt üstü pozisyon verildikten sonra steril şartlar altında deneklerin boyunları hiperekstansiyona getirilerek orta hattan vertikal olarak 0.5-1 cm'lik cilt, cilt altı insizyonu yapıldı. Trakea bulunarak sağ arteria carotis communis 45 dakika boyunca kleplendi (Resim 1). 45 dakika sonra klemp açılarak reperfüzyon sağlandı ve insizyon kapatıldı. Sham grubuna ise anestezi uygulandıktan sonra sağ arteria carotis communis açığa çıkarıldı ve klemp uygulanmadan tekrar insizyon kapatıldı.

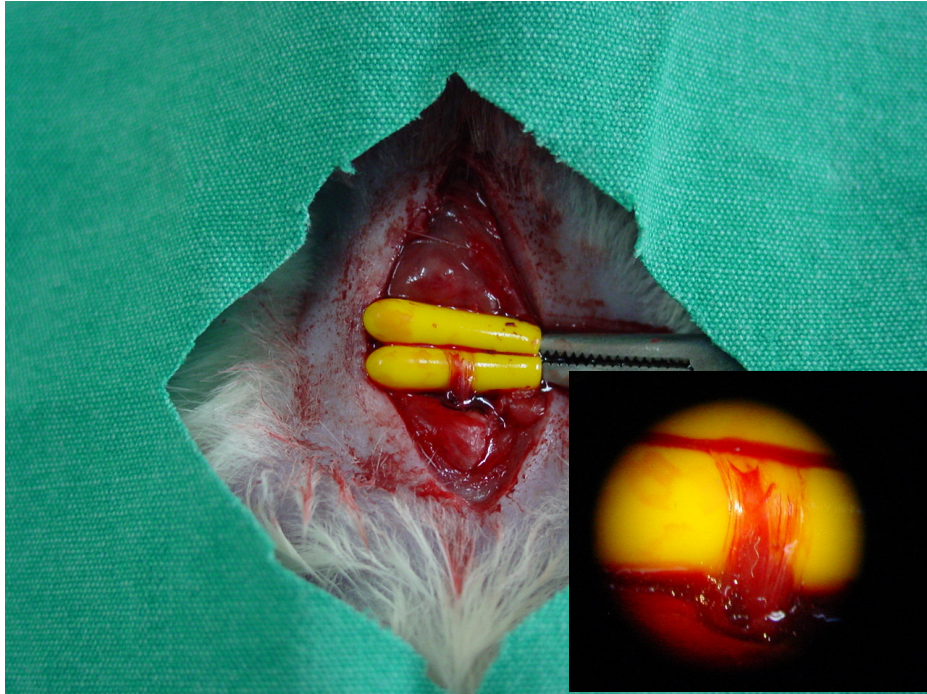
Ginkgo biloba, selenyum veya salin tedavileri iskemi oluşturulduktan sonra 14 gün süreyle yapıldı. Ginkgo biloba ekstresi (Schwabe Extracta GmbH & Co. KG,

Almanya) 50 mg/kg/gün, selenyum (Na_2SeO_3 %98 toz, S1382 Merck) 0.625 mg/kg/gün i.p. olarak verildi. Bu süre içinde herhangi bir nedenle deneye devam edemeyen ya da deney bitmeden yaşamı sonlanan denekler, grup sayıları korunarak deney ve istatistik kapsamından çıkarıldı.

14 günlük tedavi süresinin sonunda histolojik ve immunhistokimyasal incelemeler için ayrılan denekler, eter anestezisi altında %10'luk tamponlanmış nötral formalin ile transkardiak perfüze edildi. Ratlar servikal dislokasyon ile sakrifiye edildikten sonra beyin dokuları çıkartıldı ve %10'luk tamponlanmış nötral formaldehid içinde fikse edildi.

Biyokimyasal incelemeler için ayrılan deneklerden ise yine eter anestezisi altında vena cava caudalisten 3-4 cc. kan alındıktan sonra serum fizyolojik ile transkardiak perfüze edildi. Ratlar servikal dislokasyon ile sakrifiye edildikten sonra beyin dokuları çıkartılarak buzla soğutulmuş ortamda prefrontal korteks ve hipokampus bölgeleri mikrodiseksiyonla ayrıldı.

Çalışma sonunda ortaya çıkan atıklar Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları biriminin kurallarına göre yok edildi.



Resim 1: Deney sırasında iskemi oluşturmak için arteria carotis communise klemp uygulanması.

4.1. Işık Mikroskopik Doku Takip Protokolü

Beyin dokuları %10'luk tamponlanmış nötral formalin içerisinde 48 saat tespit edilerek rutin doku takip işlemi başlatıldı. Tespit maddesinin uzaklaştırılması için 1 gece akar su altında yıkandıktan sonra, 60°C de etüvde 20'şer dakika sırasıyla %70, %80, %96'ya artan etil alkol serilerinden geçirildi. Daha sonra 60°C de etüvde 20'şer dakika dört değişim asetonda dehidrate edildi. Ardından şeffaflandırma amacıyla 60°C de etüvde 30'ar dakika iki değişim ksilolde bekletildi. 60°C'lik etüvde iki değişim halinde 1'er saat parafin ile immersiyonu sağlanarak ince doku dilimleri parafin bloklar içerisine gömüldü. Rotary mikrotom (1130 Biocut, Reichert-Jung) aracılığı ile 5 µ'luk koronal kesitler alındı. Kesitler rat beyin atlasına (142) göre prefrontal korteks için 11, 12. düzlemler, hipokampus için 21, 23, 25. düzlemlerden alındı.

Kesitlerin bir kısmı doku histolojisini incelemek amacıyla crezyl-violet ile boyandı, diğer kesitler polilizinli lamlara yerleştirilerek apoptotik hücreleri işaretlemek amacıyla indirekt immunohistokimyal yöntemle apostain ve kaspaz-3 uygulandı.

4.1.1. Crezyl-violet boyaması

Alınan parafin kesitler 3 gün 37° de etüvde bekletildi. 20 dakika 60°C de etüvde, 20 dakika da iki değişim halinde oda ısısında olmak üzere üç değişim ksilolde bekletildi. Ardından %96'dan %60'a azalan alkol serilerinden geçirilerek hidrate edildi. Distile suda yıkandıktan sonra 0,2 gr Crezyl-violet boyası (61123 Fluka, Chemika) 150 ml. distile suda çözülerek STOK solusyon yapıldı. 30 ml STOK solusyon 100 ml 0,1M, pH 3,5 asetat tampon ile sulandırılarak %30'luk çalışma solusyonu hazırlandı. Kesitler çalışma solusyonu içerisinde 20-30 dakika bekletildikten sonra %96'lık alkolle çalkalandı. 3 kez 20 dakika ksilol ile şeffaflandırma yapıp entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı.

4.1.2. Hücre sayımı

Crezyl-violet ile boyanan kesitlerin görüntüleri, ışık mikroskobu (Olympus BH-2 Tokyo, Japonya) ve yüksek rezolüsyon video kamera (JVC TK-890E, Japonya) içeren bilgisayar destekli görüntü analiz sistemi kullanılarak elde edildi. Prefrontal korteks ve hipokampal CA1 nöron sayıları 20x Olympus lensle görüntülenen monitörde yaklaşık 6000

μm^2 lik sayım çerçevesi yardımıyla sayıldı. Sayım çerçevesi görüntü analiz sistem monitörü üzerine randomize olarak 5 kez yerleştirildi. Prefrontal korteks nöronları ile hipokampal CA1 nöronları sayıldı ve elde edilen sonuçların ortalamaları alındı ve istatistiksel olarak değerlendirildi.

4. 2. İmmunohistokimyasal Analizler

Genel İlke;

İmmunohistokimyasal analizler, hücre ve dokulardaki var olan özel proteinlerin belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Aşağıda belirtilen üç temel adım uygulanır: 1) Primer antikor özel antijene bağlanır, 2) Antijen-antikor kompleksi, bir konjugasyon enzimi yardımıyla ikinci bir antikorla bağlanır, 3) Substrat ve kromojen varlığında, bu enzim antijen-antikor bağlanma bölgesinde renkli bir depozite dönüşür. Görünüm ışık mikroskopunda histopatolojik olarak değerlendirilir.

4.2.1. Apoptoz Analizi

Apostain yöntemi (Mab to ssDNA (F7-26))

Genel İlke;

Yukarıda belirtilen ve diğer immunohistokimyasal analizlerde uygulan ilkeler Apostain yöntemi için de geçerlidir. Ancak bu analizde diğer ilkelere ek olarak, hedef antijen olan apoptotik DNA, yüksek ısıda ve formamid varlığında denatüre edilir. Tek zincir DNA'ya özel monoklonal antikor (F7-26) ile boyanır.

Uygulama basamakları;

- 1- Lizinli lamlara alınan 5 μ 'luk kesitler 56–60 °C da bir gece etüvde bekletildi.
- 2- Deparafinizasyon işlemleri için 30'ar dakika iki değişim ksilole tabi tutuldu.
- 3- Sırasıyla %95, %80, %70 alkol serilerinden geçirilip hidrasyon sağlanarak 5 dakika distile suda bekletildi.
- 4- Kesit çevresi, lam kalemi (DAKO PEN) ile sınırlandırıldı.
- 5- Lamlara 100 er μ l saponin (0.2 mg/ml PBS içinde) ilave edilerek oda sıcaklığında 20 dk bekletildi. PBS ile yıkandı.

- 6- 20 dakika oda ısında proteinaz K (20 µg/ml PBS içinde) ile inkübe edildi. PBS ile yıkandı.
- 7- Üç defa 5'er dakika distile su ile yıkandı.
- 8- Önceden 56-60°C ye ısıtılmış %50 formamid solüsyonu içinde 20 dakika etüvde, daha sonra da 5 dakika soğuk PBS içinde bekletildi.
- 9- Daha sonra %3'lük hidrojen peroksidge, endojen peroksidge inhibe etmek amacı ile 5 dakika bekletildi.
- 10- PBS ile yıkanan kesitler non-spesifik bağlanmayı engellemek için yağsızlaştırılmış süt tozunda 37°C da inkübe edildi. PBS ile yıkandı.
- 11- 30 dakika 100 µl önceden hazırlanmış monoklonal antikor F7-26=Apostain (Chemicon- ABD& Kanada) ile inkübe edildi. PBS ile yıkandı.
- 12- 1/100 dilüsyonunda peroksidge-conjugated anti-mouse IgM ile 60 dakika inkübe edildi. PBS ile yıkandı.
- 13- Reaksiyonunun görünürlüğünü saptamak amacıyla 100 µl diaminobenzidine (DAB) ile boyandı. Distile su ile yıkandı.
- 14- Mayer hematoksilin ile art alan boyaması sağlandı.
- 15- %80 ve %96'lık alkollerde dehidratasyon yapıldı.
- 16- 3 kez 20 dakika ksilol ile şeffaflandırma yapıldı.
- 17- Entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı.

4.2.2. Kaspaz Analizi

Caspase 3 (CPP32) Ab-4

Genel İlke;

Yukarıda belirtilen ve diğer immunohistokimyasal analizlerde uygulan ilkeler Caspase 3 yöntemi için de geçerlidir.

Uygulama basamakları;

- 1- Lizinli lamlara alınan 4 µ'luk kesitler 56-60 °C da bir gece etüvde bekletildi.
- 2- Şeffaflandırma amacıyla 15'şer dakika iki değişim ksilole tabi tutuldu.
- 3- Sırasıyla %96, %80, %70 alkol serilerinden geçirilip hidratasyon sağlanarak 5 dakika iki değişim distile suda bekletildi.
- 4- Kesitler sitrat solusyon içine konularak mikrodalgada 650 W'a şoklandı.

- 5- 20 dakika kapakları açılarak çözeltinin içinde soğutuldu. Distile su ile yıkandı.
- 6- Kesit çevresi, lam kalemi (DAKO PEN) ile sınırlandırıldı. PBS ile yıkandı.
- 7- Endojen peroksidazı inhibe etmek amacı ile 15 dakika %3'lük hidrojen peroksid uygulandı. PBS ile yıkandı.
- 8- Kesitler 1 saat bloklama solusyonu (TA-125-UB, Lab Vision, Fremont, CA) ile inkübe edildi.
- 9- Bloklama solusyonu dokudan uzaklaştırılıp, önceden hazırlanmış 100 µl primer antikor (RB-1197 Neomarkers, Fremont, CA) ile 60 dakika inkübe edildi. PBS ile yıkandı.
- 10- Kesitler anti-mouse biotin sekonder antikor (TA-125-UB, Lab Vision, Fremont, CA) ile 20 dakika muamele edildi. PBS ile yıkandı.
- 11- Kesitler anti-mouse streptavidin sekonder antikor (TA-125-UB, Lab Vision, Fremont, CA) ile 20 dakika boyandı. PBS ile yıkandı.
- 12- Reaksiyonunun görünürlüğünü saptamak amacıyla 100 µl diaminobenzidine (DAB) ile boyandı. Distile su ile yıkandı.
- 13- Harris hematoksilen ile art alan boyaması sağlandı.
- 14- %80 ve %96'lık alkollerde dehidratasyon yapıldı.
- 15- 3 kez 20 dakika ksilene ile şeffaflaştırma yapıldı.
- 16- Entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı.

4.3. Biyokimyasal Analizler

4.3.1. Rat TNF- α (Tumor Necrosis Factor- Alpha) Analizi

Serum ve doku TNF- α ölçümünde, BIOSOURCE standart rat TNF- α immunoassay kiti (KRC3011C, Biosource, USA) kullanıldı.

Genel İlke;

Test kantitatif olarak ölçülen "sandwich Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay" (ELISA) temeline dayanır. Anti-rat TNF- α kaplı mikrotitrasyon kuyucuklarına örnek/standart uygulanır. İnkubasyon yapılır. Biotinlenmiş antikor ve streptavidin HRP, antijene bağlanır (İmmun reaksiyonun 1. basamağı). Sonuçta peroksidaza

bağlı immun kompleks, TMB substratı ile fotometrik olarak ölçülebilen renk reaksiyonu verir. Renk yoğunluğu, rat TNF- α konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Testin duyarlılığı; 4 pq /ml dir.

Test içeriği;

TNF standardı, standart dilüenti, inkubasyon solüsyonu, rat TNF- α yüksek ve düşük kontrolleri, biotinlenmiş antikör reaktifi, biotinlenmiş antikör konsantresi, HRP solüsyonu, HRP konsantresi, yıkama konsantresi, kromojen (TMB), sonlandırma solüsyonu.

Standartlar kullanımdan hemen önce hazırlanır. 2,43 ml. standart diluent solüsyonu ile şişe içerisindeki standart eritilir. (5000 pq/ ml) 100 μ l bu konsantrasyondan alınan standart 400 μ l diluent ile 1000 pq/ ml konsantrasyona getirilir. 250 μ l diluent konmuş tüplerden ilkinde 250 μ l konarak seri standart dilusyonlar ardışık olarak hazırlanır.

Uygulama basamakları;

- 1- Çalışmada sıçan serumları ve sıçan beyin (hipokampus ve prefrontal bölüm) doku homojenatları kullanıldı.
- 2- Çalışma solüsyonları kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi.
- 3- 100'er μ l standart ve kontroller kuyucuklara duplike olarak yerleştirildi.
- 4- 50'şer μ l standart dilüenti her kuyucuğa ilave edildi. Üzerlerine örnekler 50'şer μ l, yine duplike olarak yerleştirildi.
- 5- Herbir kuyucuğa 50 μ l biotin konjugat ilave edilerek 90 dakika oda ısısında inkübe edildi.
- 6- Aspire edilen kuyucuklar 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkandılar.
- 7- 100'er μ l taze hazırlanmiş Steptavidin-HRP Solüsyonu ilave edildi.
- 8- Oda ısısında 45 dakika inkübe edildi.
- 9- Aspire edilen kuyucuklar 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkandılar.
- 10- 100'er μ l TMB renklendirme çözeltisi ilave edildi.
- 11- Oda ısısında 30 dakika ışıktan korunarak inkübe edildi.
- 12- 100'er μ l durdurucu çözelti ilave edildi.
- 13- Otuz dakika içinde mikropate okuyucuda 450 nm. de okundu.

14- Sonuçlar standart konsantrasyonlarına karşılık okunan absorbands değerleri ile oluşan lineer eğri üzerinde pg/ml olarak değerlendirildi.

4.3.2. Rat IL-1 β (Interleukin 1- Beta) Analizi

Serum ve doku IL-1 β ölçümünde, BIOSOURCE standart rat IL-1 β immunoassay kiti (KRC0011C, Biosource, USA) kullanıldı.

Genel İlke;

Test “sandwich **Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay**” (**ELISA**) temeline dayanır. Spesifik antikor kaplı mikrotitrasyon kuyucuklarına örnek/standart uygulanır. Biotinlenmiş antikor ve streptavidin HRP, antijene bağlanır. Sonuçta peroksidaza bağlı immun kompleks, TMB substratı ile fotometrik olarak ölçülebilen renk reaksiyonu verir. Renk yoğunluğu, rat IL-1 β konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Testin duyarlılığı; 3 pq /ml dir.

Test İçeriği;

Rat IL-1 β standardı, standart dilüenti, rat IL-1 β kaplı kuyucukları, inkübasyon solüsyonu, rat IL-1 β biotinlenmiş antikor konsantresi, HRP solüsyonu, HRP konsantresi, yıkama konsantresi, kromojen (TMB), sonlandırma solüsyonu. Standartlar kullanımdan hemen önce hazırlanır. 0,86 ml. standart diluent solüsyonu ile şişe içerisindeki standart eritilir (10 000 pq/ ml). 120 μ l bu konsantrasyondan alınan standart 480 μ l diluent ile 2000 pq/ ml konsantrasyona getirilir. 300 μ l diluent konmuş tüplerden ilkine 300 μ l konarak seri standart dilüsyonlar ardışık olarak hazırlanır.

Uygulama basamakları;

- 1- Çalışmada sıçan serumları ve sıçan beyin (hipokampus ve prefrontal bölüm) doku homojenatları kullanıldı.
- 2- Çalışma solüsyonları kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi.
- 3- 100'er μ l standartlar kuyucuklara duplike olarak yerleştirildi.
- 4- 50'şer μ l standart dilüenti her kuyucuğa ilave edildi. Üzerlerine örnekler 50'şer μ l, yine duplike olarak yerleştirildi.

- 5- Oda ısısında 3 saat inkübe edildi.
- 6- Aspire edilen kuyucuklar 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkandılar.
- 7- Her bir kuyucuğa 100 µl biotin konjugat ilave edilerek 60 dakika oda ısısında inkübe edildi.
- 8- Aspire edilen kuyucuklar 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkandılar.
- 9-100'er µl taze hazırlanmış Steptavidin-HRP Solüsyonu ilave edildi. 30 dakika inkübe edildi.
- 10- Aspire edilen kuyucuklar 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkandılar.
- 11-100'er µl TMB renklendirme çözültisi ilave edildi.
- 12- Oda ısısında 30 dakika ışıktan korunarak inkübe edildi.
- 13-100'er µl durdurucu çözülti ilave edildi.
- 14- Otuz dakika içinde mikropate okuyucuda 450 nm. de okundu.
- 15- Sonuçlar standart konsantrasyonlarına karşılık okunan absorban değerleri ile oluşan lineer eğri üzerinde pg/ml olarak değerlendirildi.

4.3.3. Rat NGF (Nerve Growth Factor) Analizi

Genel İlke;

NGF E_{max}[®] (G7631, Promega,USA) immunoassay sistemle sensitif ve spesifik olarak NGF antikorunun sandoviç formatta tayin edilmesi esasına dayanır. Bu yöntemde kuyucuklar, anti- NGF poliklonal antikor ile kaplanır. Çözünür fazda NGF bağlanır. Bağlı NGF spesifik ikinci bir monoklonal antikor ile karşılaştırılır. Spesifik bağlı antijene, HRP üçüncü reaktant olarak bağlanır. Sonuçta peroksidaza bağlı immun kompleks, TMB substratı ile fotometrik olarak ölçülebilen renk reaksiyonu verir. Renk yoğunluğu, NGF konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Testin duyarlılığı; 7,8–500 pq /ml dir.

Test İçeriği;

NGF standardı, örnek dilüenti, Anti NGF pAb, Anti NGF mAb, Anti-Rat IgG, HRP konsantresi, kromojen (TMB).

Standartlar kullanımdan hemen önce hazırlanır. NGF hazır standart konsantrasyonu 1 µg/ml dir. Bu standarttan alınan 10 µl, 390 µl diluent ile 1/40 seyreltilir. Daha sonra

bu konsantrasyondan alınan 10 µl, 490 µl diluent ile sonuç dilüsyonu olan 1/2000 dilüsyonuna getirilir (500 pg/ml). Seri standart dilüsyonlar, bu aşamadan sonra (100 µl diluent ile) 1/2 oranında, ardışık olarak hazırlanır (Sonuç standartları; 7,8 pg/ml ve sıfır NGF konsantrasyonu).

Uygulama basamakları;

1- Mikro kuyucuklar çalışmanın yapılacağı bir gün öncesinden karbonat solüsyonda hazırlanmış Anti NGF pAb ile kaplandı.

2- Bir gece +4°C de bekletildi.

3- Ertesi sabah sabitleme ve örnek solüsyonu ile kaplanan kuyucuklar, bir saat oda ısısında inkübe edildi.

4- Aspire edilen kuyucuklar hazırlanan yıkama solüsyonu ile bir kez yıkandı.

5- Beş kez seyreltilerek hazırlanmış örnek dilüenti, her bir kuyucuğa 200'er µl olacak şekilde uygulandı. Bir saat oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra aspire edilerek yıkama solüsyonu ile bir kez yıkandı.

6- Seri dilüsyonla hazırlanmış standartlar 100'er µl olacak şekilde duplike edilerek mikro kuyucuklara uygulandı.

7- Doku ve serum örneklerinin uygulanması;

Asitle işlem gören örnekler:

Önceden DPBS ile 4 kez dilüe edilerek hazırlanan örneklerin her bir 50 µl si için, 1 µl, 1N HCl ilave edildi (Örnek pH sı 3.0 veya daha düşük olmalıdır). Karıştırılan örnekler 15 dakika oda ısısında inkübe edildikten sonra, her bir 50 µl için, 1 µl, 1 N NaOH ilave edilerek nötralize edildi (pH yaklaşık 7.6 olmalıdır).

Asitsiz örnekler:

Denemelerimizde ¼ dilüsyonun uygun olduğu saptandı ve asitsiz örnekler bu oranda örnek dilüenti ile seyreltildi.

Asitli ve asitsiz olarak ikiye ayrılan aynı doku ve serum örnekleri, duplike olarak 100'er µl mikro kuyucuklara uygulandı. Altı saat, çalkalayıcıda, oda sıcaklığında inkübe edildi.

8- Aspire edilen kuyucuklar 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı.

9- Hazırlanan sekonder antikör (Anti-NGF mAb) 100'er µl mikro kuyucuklara uygulandı.

- 10- Bir gece + 4 °C de bekletildi.
- 11- Aspire edilen kuyucuklar 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- 12- Hazırlanan Anti-Rat IgG ve HRP konsantresi 100'er µl mikro kuyucuklara uygulandı. 2,5 saat çalkalayıcıda, oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 13- Aspire edilen kuyucuklar 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- 14- Oda sıcaklığına getirilmiş TMB solusyonu 100'er µl, mikro kuyucuklara uygulandı. 10 dakika çalkalayıcıda, oda sıcaklığında ışıktan korunarak inkübe edildi.
- 15- 100'er µl durdurucu çözelti olarak 1 N HCl ilave edildi.
- 16- Otuz dakika içinde mikroplate okuyucuda 450 nm. de okundu.
- 17- Sonuçlar standart konsantrasyonlarına karşılık okunan absorbans değerleri ile oluşan lineer eğri üzerinde pg/ml olarak değerlendirildi.

4.4. İstatistiksel Analizler

Deneyde elde edilen değerler Windows için SPSS 11.0 programı kullanılarak analiz edildi. Parametrik veriler arasındaki fark analizi için One Way ANOVA varyans analizi kullanıldı. Gruplar arası karşılaştırma amacıyla ise; histolojik veriler için Bonferroni, biyokimyasal veriler için Tukey testi uygulandı ve $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

5. BULGULAR

5.1. Işık Mikroskopik Bulgular

5.1.1. Prefrontal Korteks Crezyl-violet boyaması

Sham grubunda (grup I), normal histolojik yapı gözlemlendi. Nöronlar normal görünümdeydi, sınırları belirgin hücre zarı bütünlüğü korunmuştu. Çekirdek sınırları düzenli, kromatin dağılımı normal ve çekirdekte belirgin olarak gözlemlendi. Kapiller endotel bütünlüğü ve kapillerlerin çevre doku ile bütünlüğü normaldi. Işık mikroskopik gözlemlerde glial hücre sayısı normal olarak izlendi (Resim 2-5).

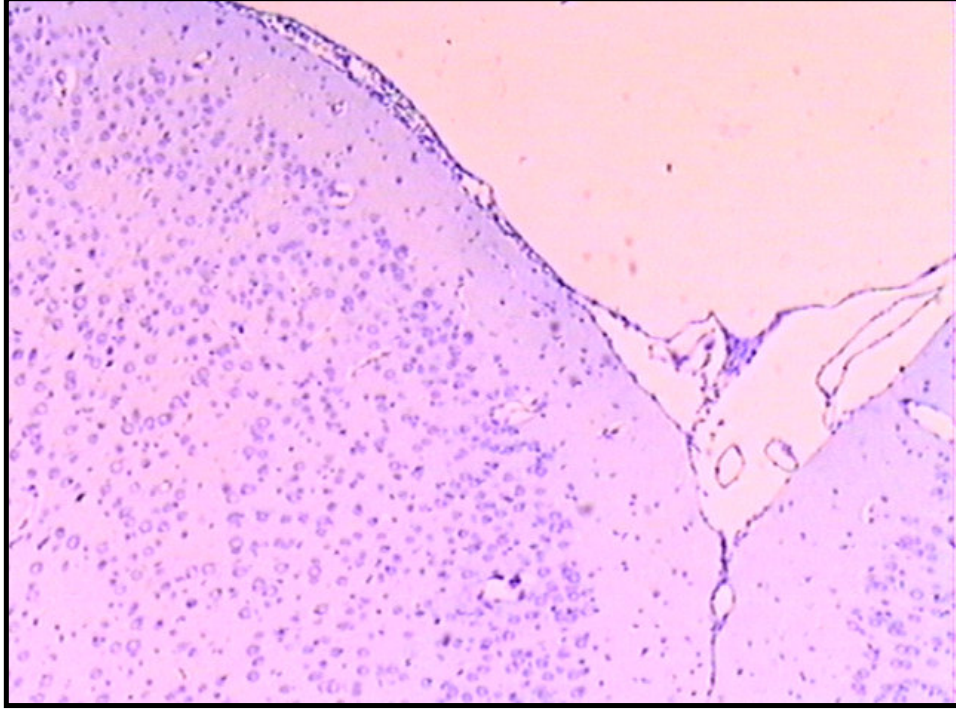
İskemi ve reperfüzyon modeli uygulanan deneklerin, prefrontal korteks ve hipokampus doku örneklerinden alınan kesitler, crezyl-violet ile boyanarak incelendiğinde iskemi reperfüzyon uygulanan grup ile tedavi grupları arasında ışık mikroskopik olarak belirgin farklılık gözlemlendi.

İR grubunda (grup I), piramidal nöronlarda belirgin büzülme, hücre ve çekirdek sınırlarında düzensizlik, bazı hücrelerde çekirdek kromatininde yoğunluk, nöron sitoplazmalarında dansite artışı gözlemlendi. Stratum molekularede ışık mikroskopik olarak glial hücre artışı gözlemlendi. Perinöronal ve perikapiller ödem belirgindi (Resim 6-10).

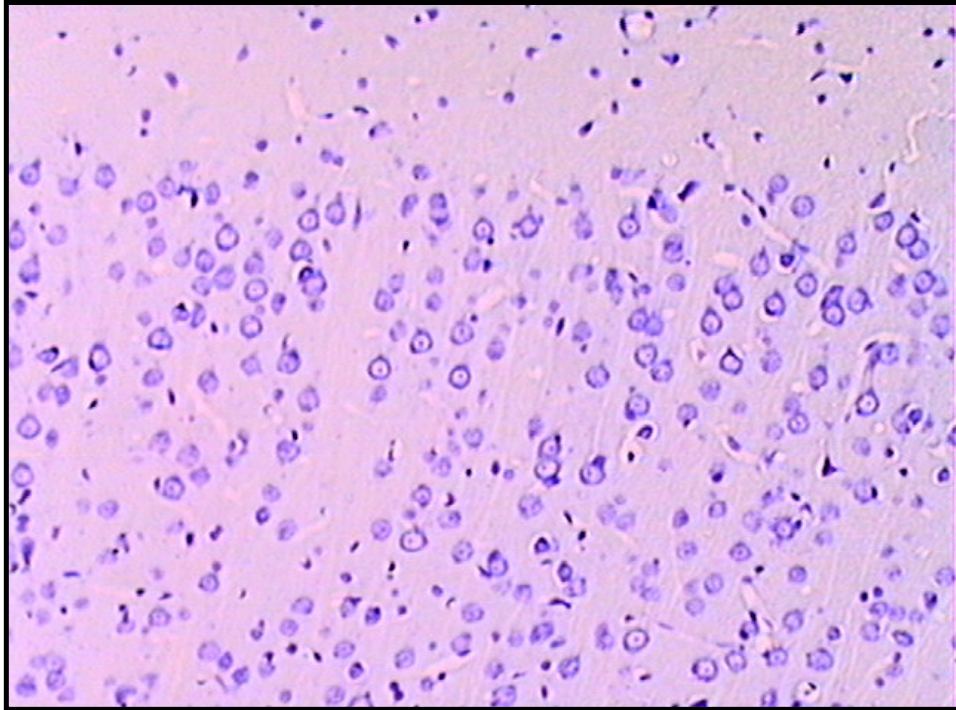
İR+ ginkgo biloba verilen grupta (grup III), prefrontal korteksin izlenen tabakaları alışılmış yapıdaydı. Nöronlarda çekirdek ve çekirdekte belirgindi. Perinöronal ve perikapiller ödem gözlenmedi. Glial hücrelerin dağılımı normal olarak izlendi (Resim 11-14).

İR+ selenyum verilen grupta (grup IV), İR grubunda (grup II) bulunan nöronlarda büzülmeler seyrek de olsa bu grupta da izlendi. Ancak perinöronal ve perikapiller ödem gözlenmedi (Resim 15-18).

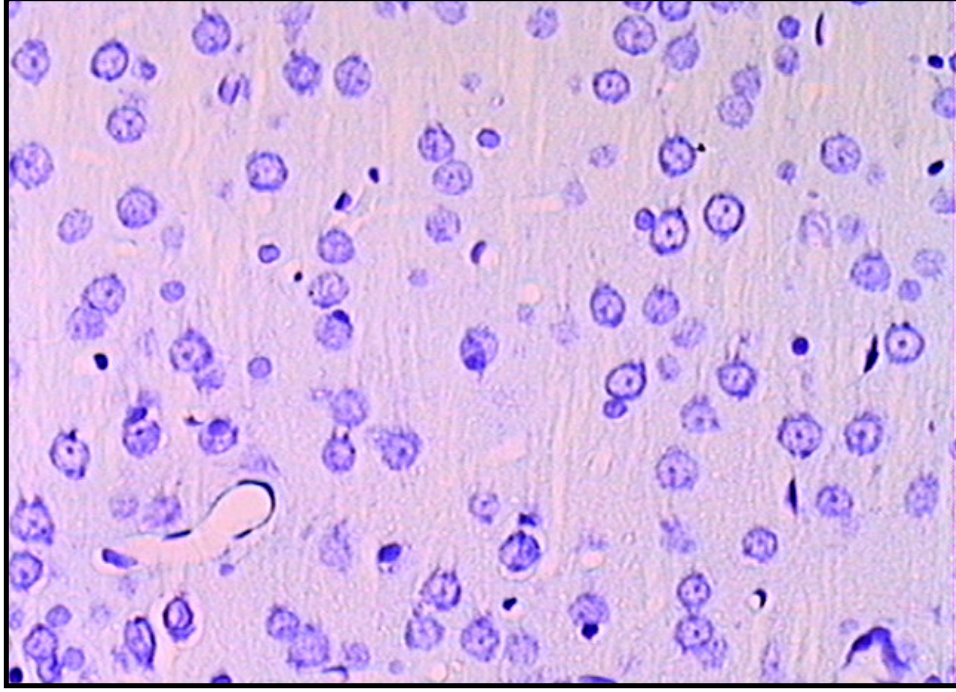
İR+ ginkgo biloba ve selenyumun birlikte verildiği grupta (grup V) nöronlar normal yapıda, çekirdek ve çekirdekte belirgindi. Glial hücre yapısı ve düzenlenimi olağandı. Perinöronal ve perikapiller ödem gözlenmedi (Resim 19-22).



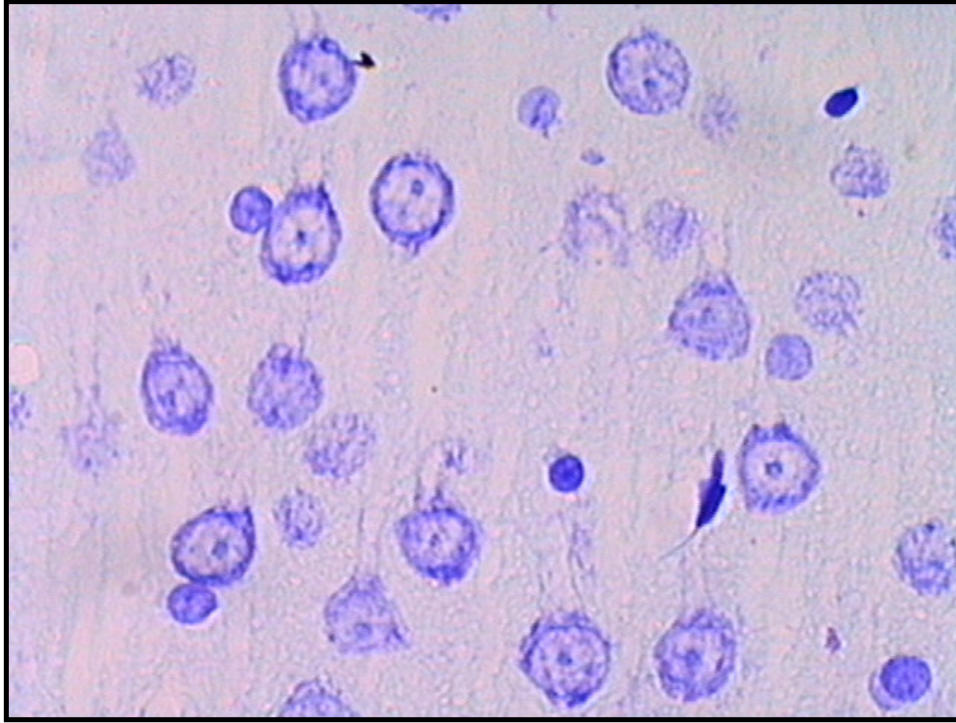
Resim 2: Sham grubu prefrontal korteks genel görünüm Crezyl-violet X13,2



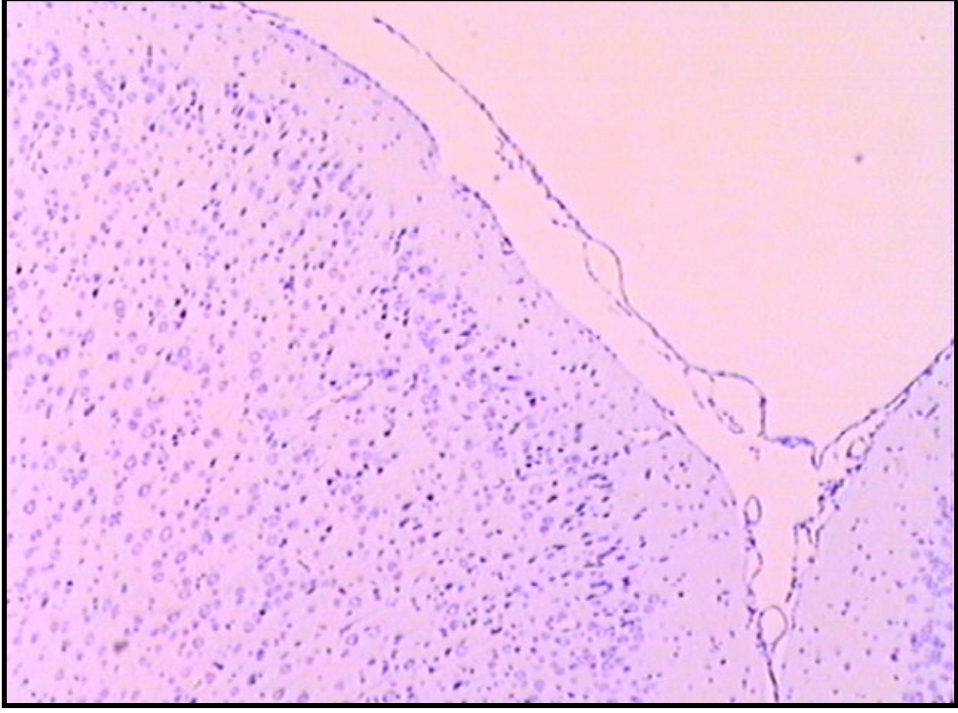
Resim 3: Sham grubu prefrontal korteks genel görünüm Crezyl-violet X33



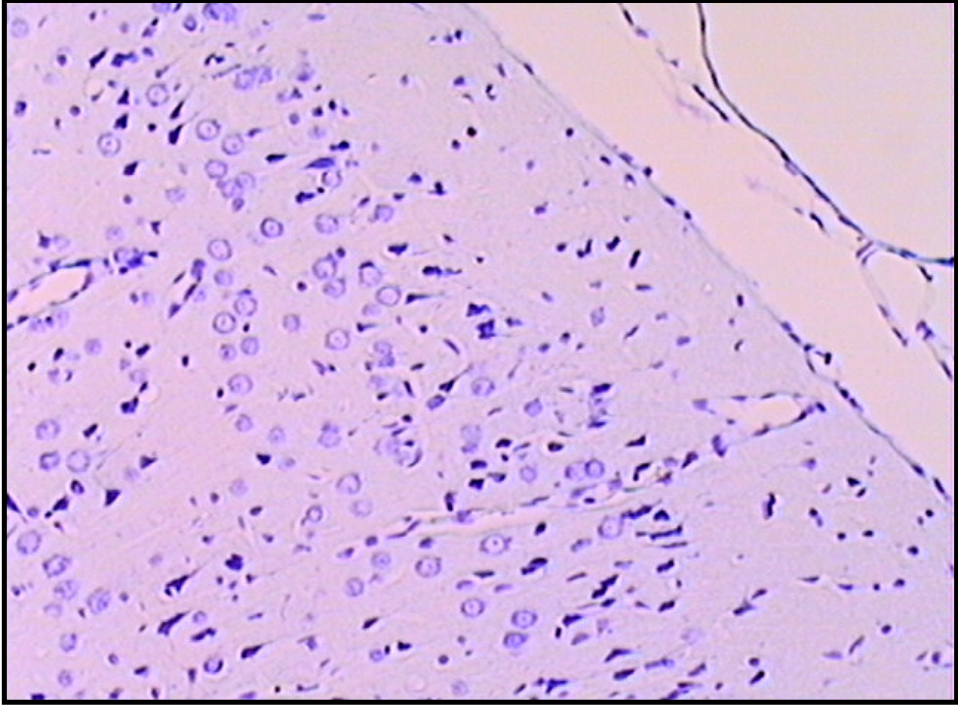
Resim 4: Sham grubu prefrontal korteks genel görünüm Crezyl-violet X66



Resim 5: Sham grubu prefrontal korteks genel görünüm Crezyl-violet X132



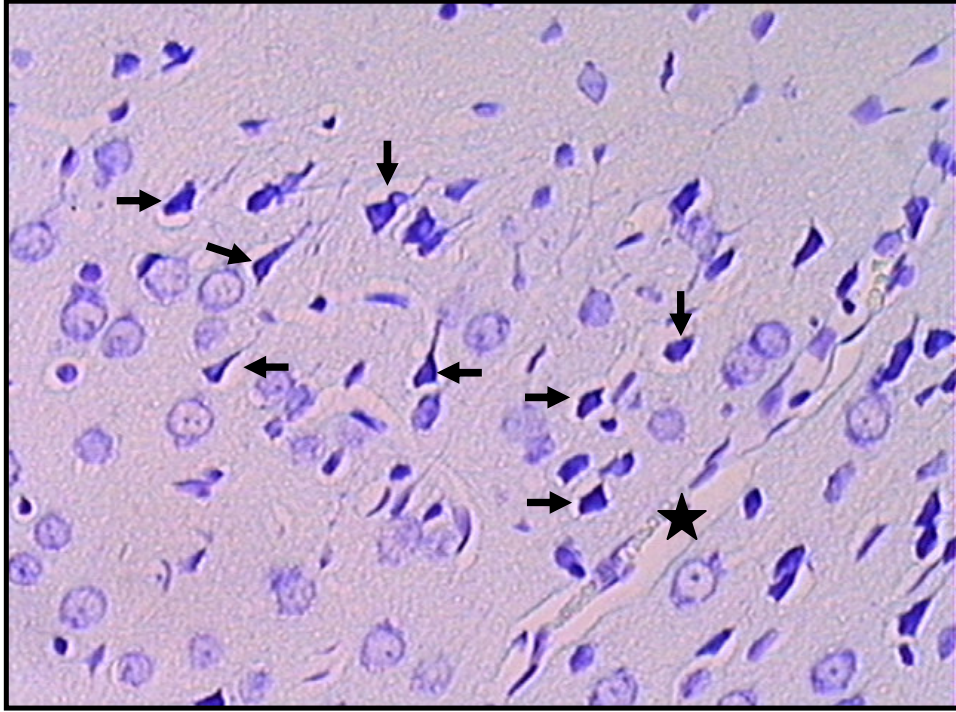
Resim 6: İR grubu prefrontal korteks genel görünüm Crezyl-violet X13,2



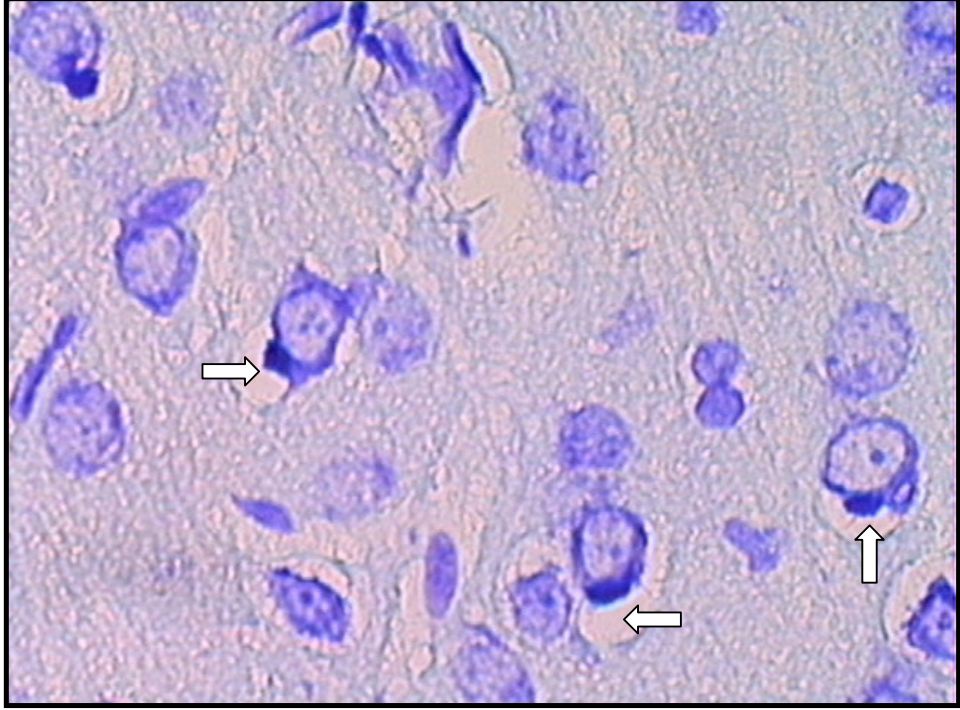
Resim 7: İR grubu prefrontal korteks genel görünüm Crezyl-violet X33



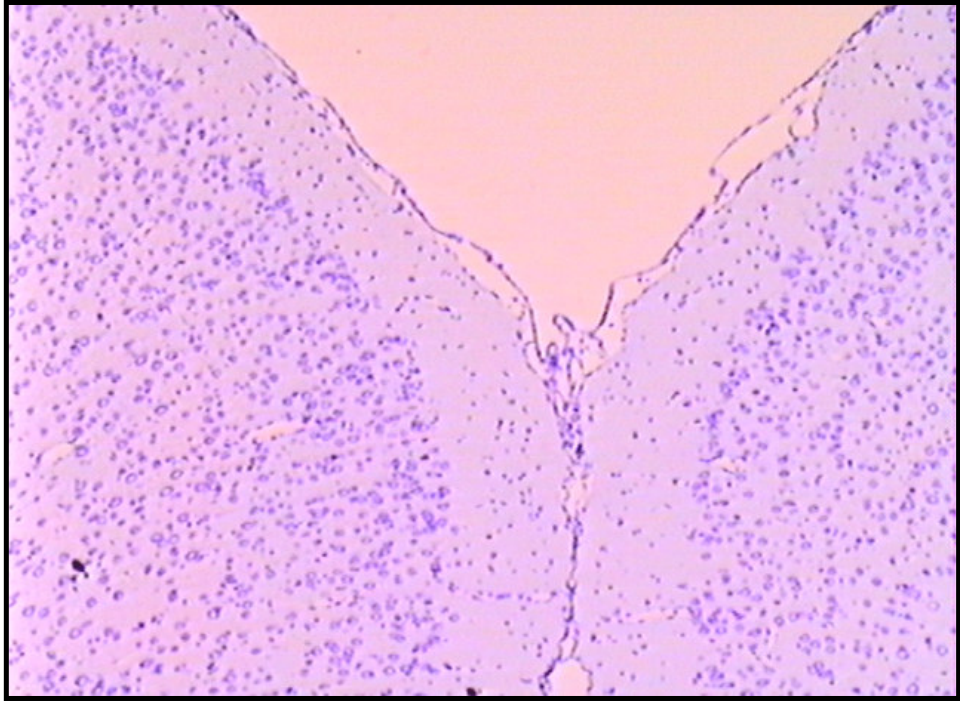
Resim 8: İR grubu prefrontal korteks perinöronal (⇔) ve perikapiller ödem (★)
Crezyl-violet X66



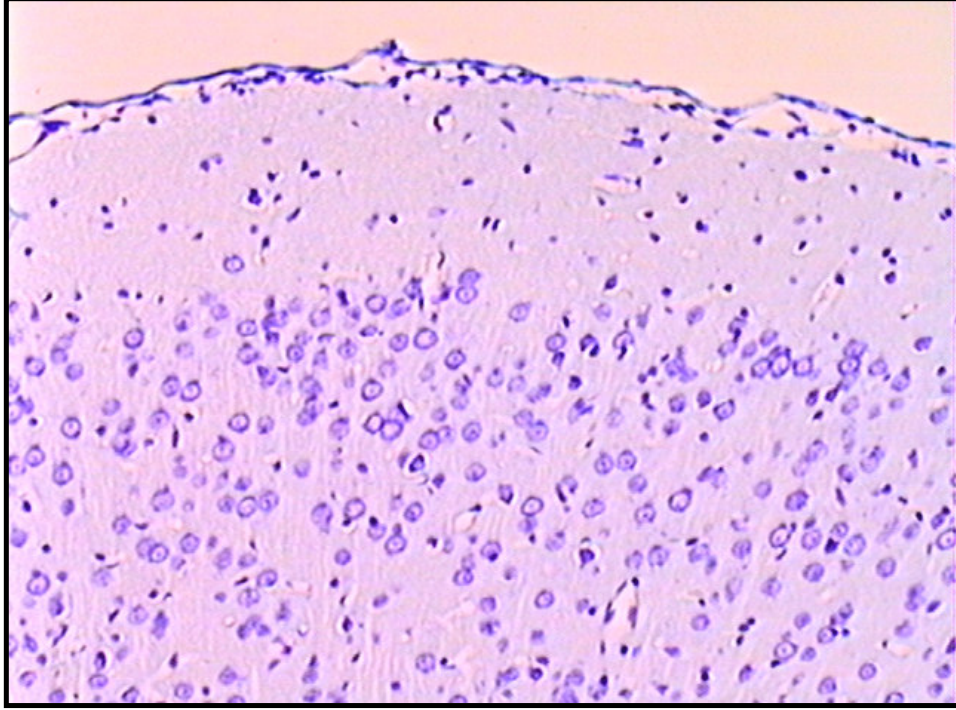
Resim 9: İR grubu prefrontal korteks nöronlarda büzülme (➔), perikapiller
ödem (★) Crezyl-violet X66



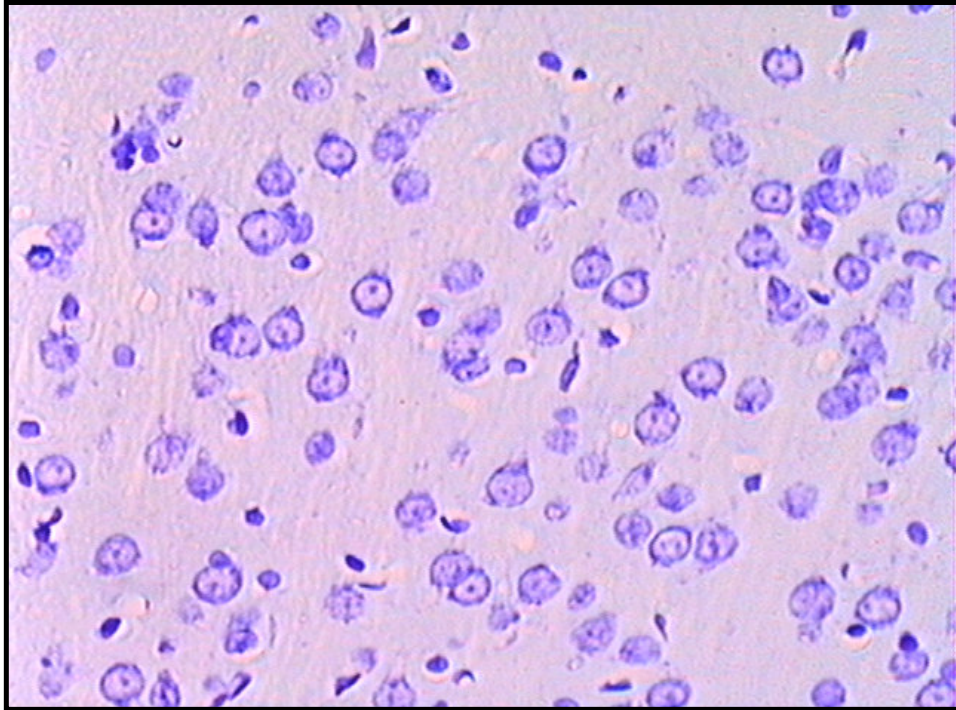
Resim 10: İR grubu prefrontal korteks perinöronal ödem (⇒) Crezyl-violet X132



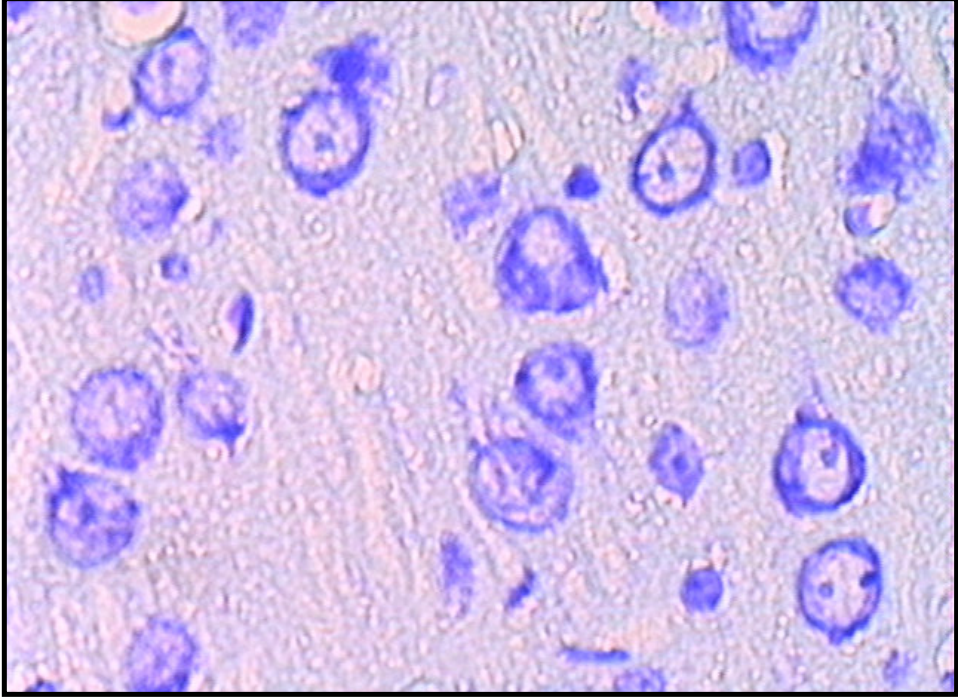
Resim 11: İR+G grubu prefrontal korteks genel görünüm Crezyl-violet X13,2



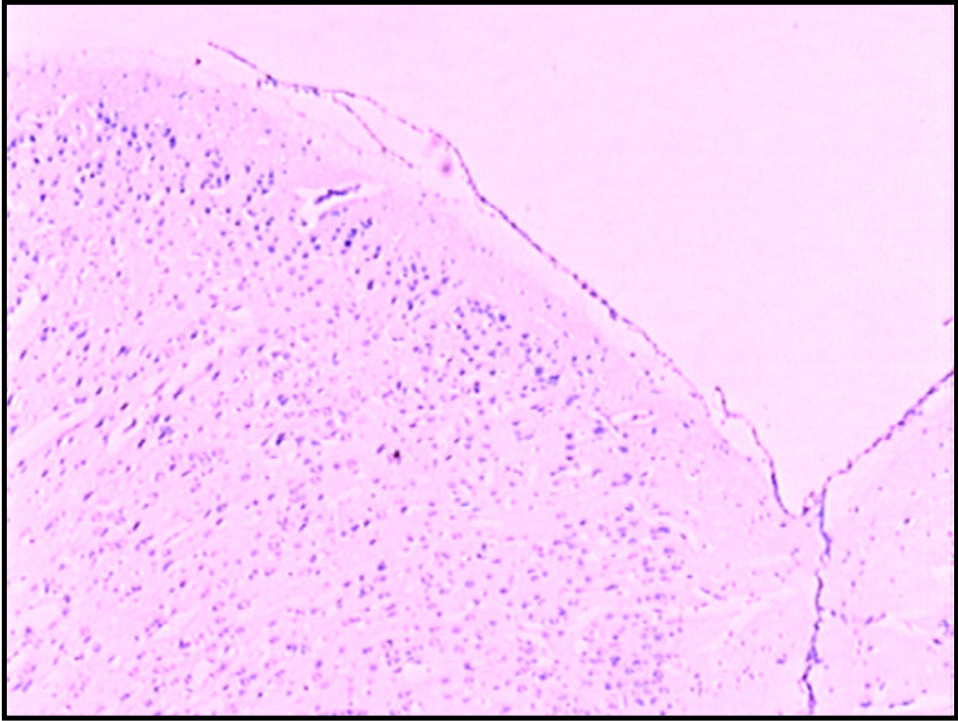
Resim 12: İR+G grubu prefrontal korteks genel görünüm Crezyl-violet X33



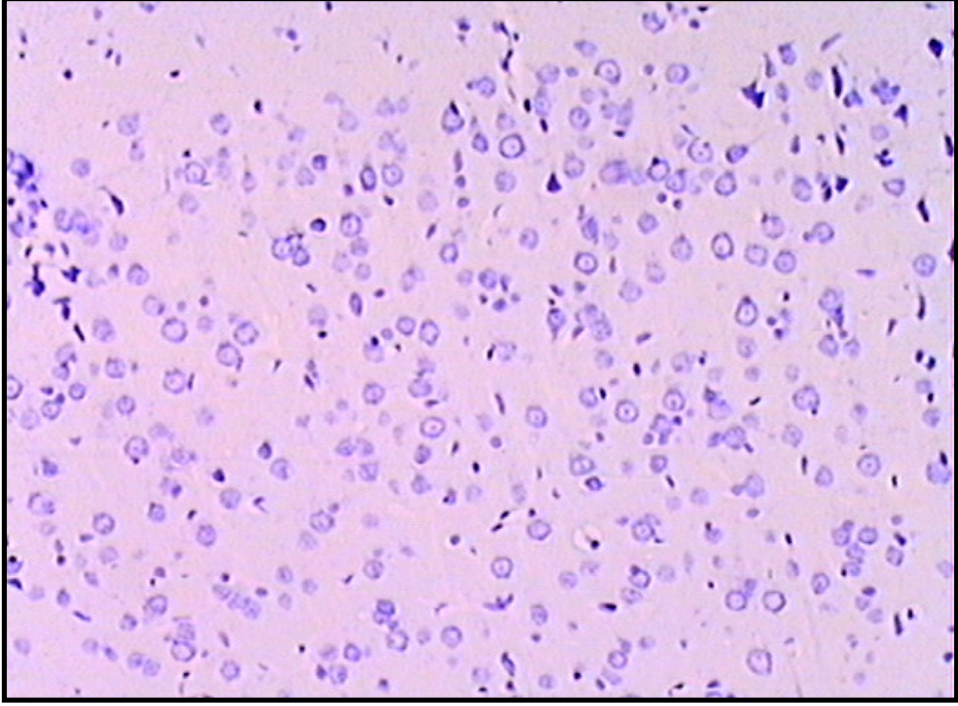
Resim 13: İR+G grubu prefrontal korteks genel görünüm Crezyl-violet X66



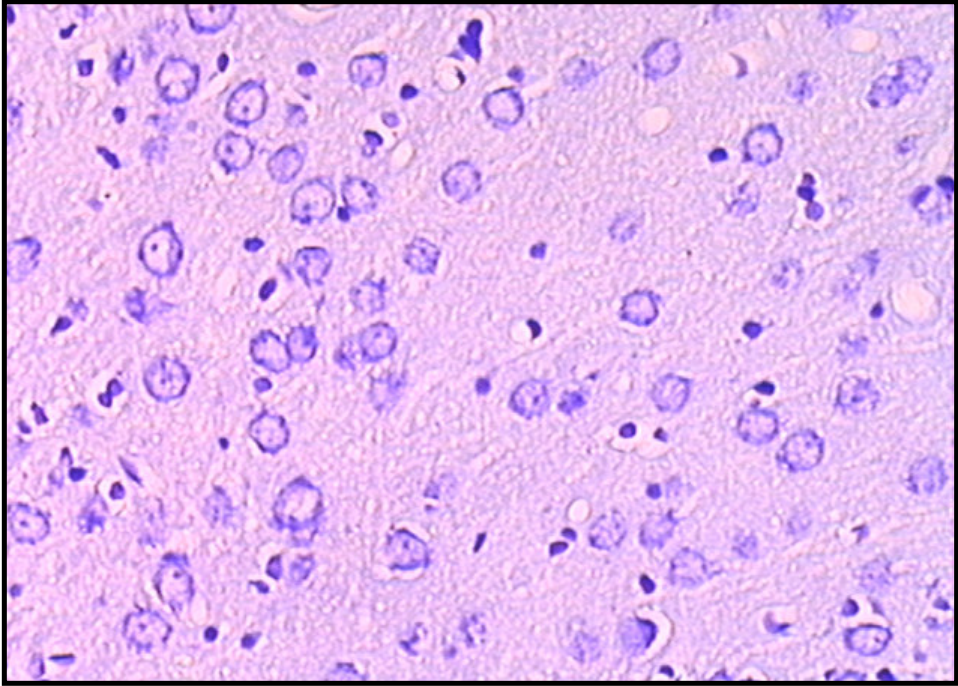
Resim 14: İR+G grubu prefrontal korteks genel görünüm Crezyl-violet X132



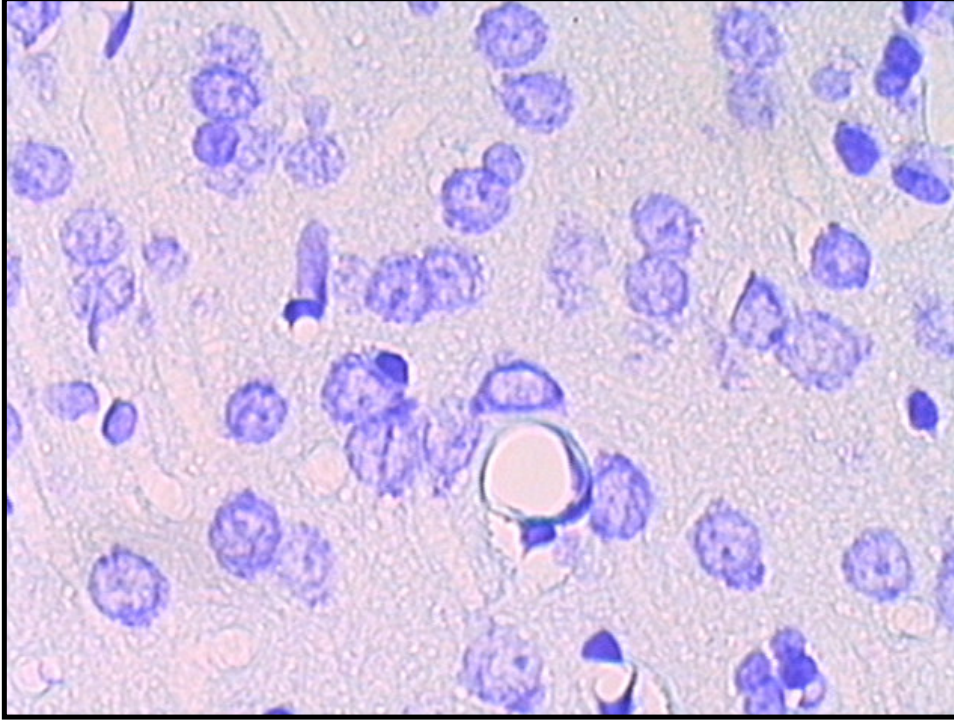
Resim 15: İR+S grubu prefrontal korteks genel görünüm Crezyl-violet X13,2



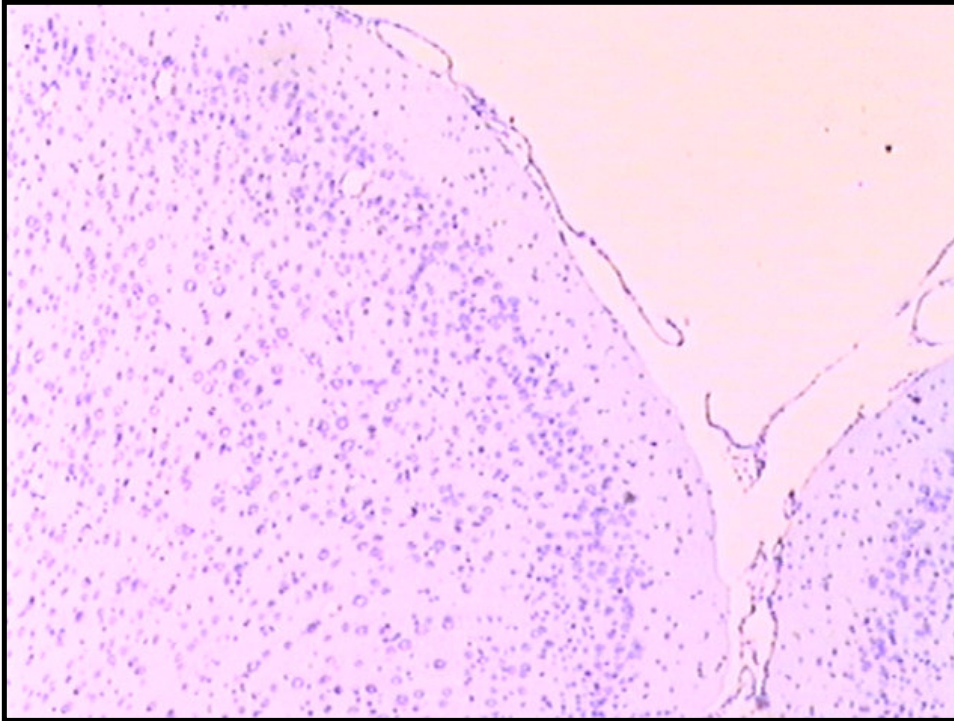
Resim 16: İR+S grubu prefrontal korteks genel görünüm Crezyl-violet X33



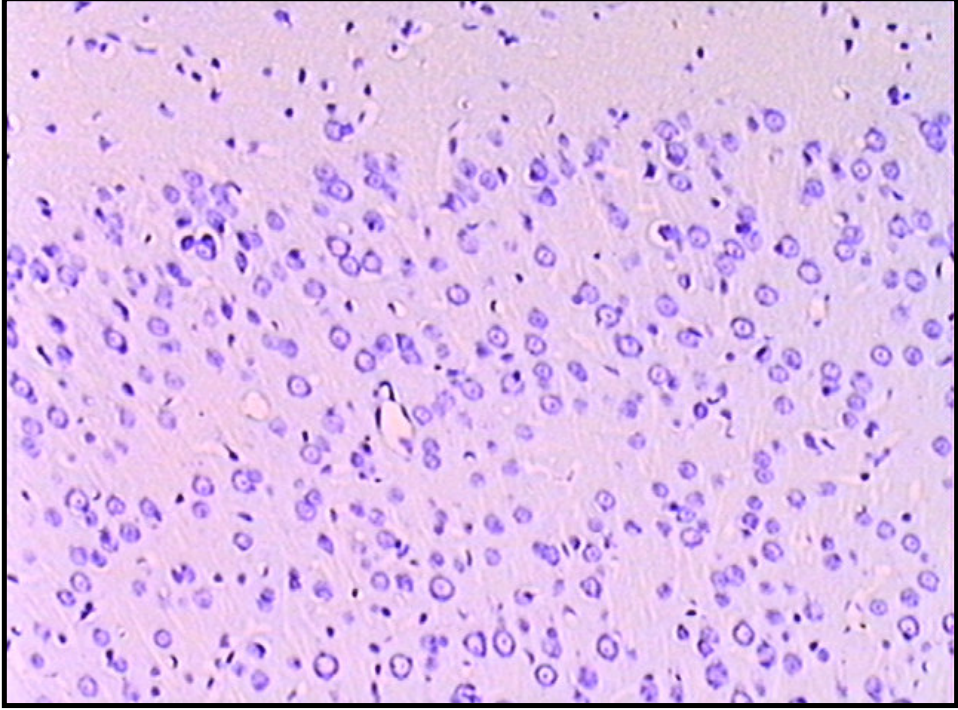
Resim 17: İR+S grubu prefrontal korteks genel görünüm Crezyl-violet X66



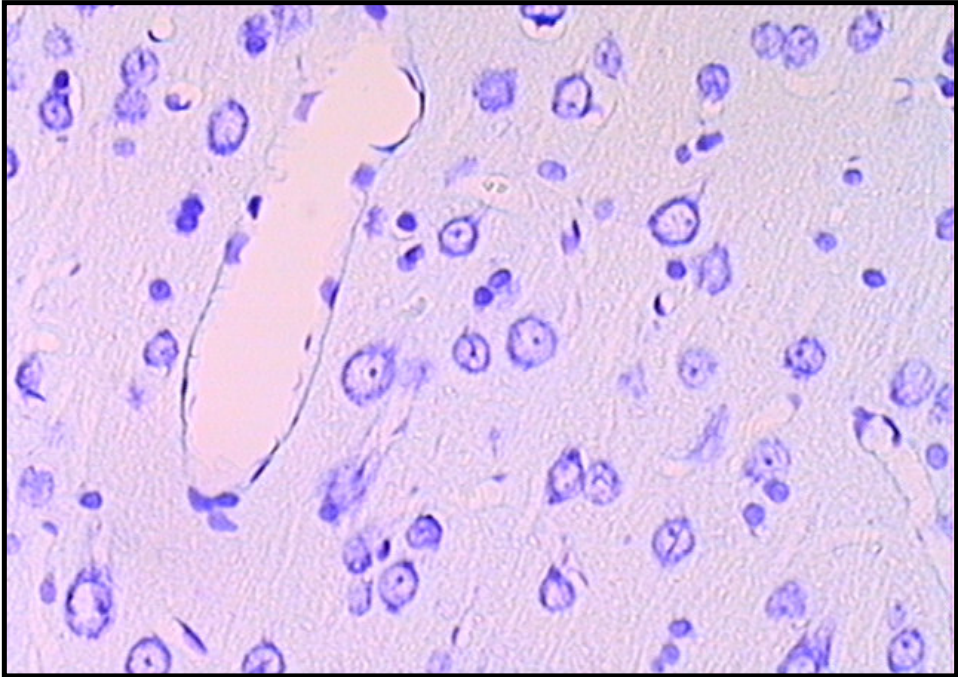
Resim 18: İR+S grubu prefrontal korteks genel görünüm Crezyl-violet X132



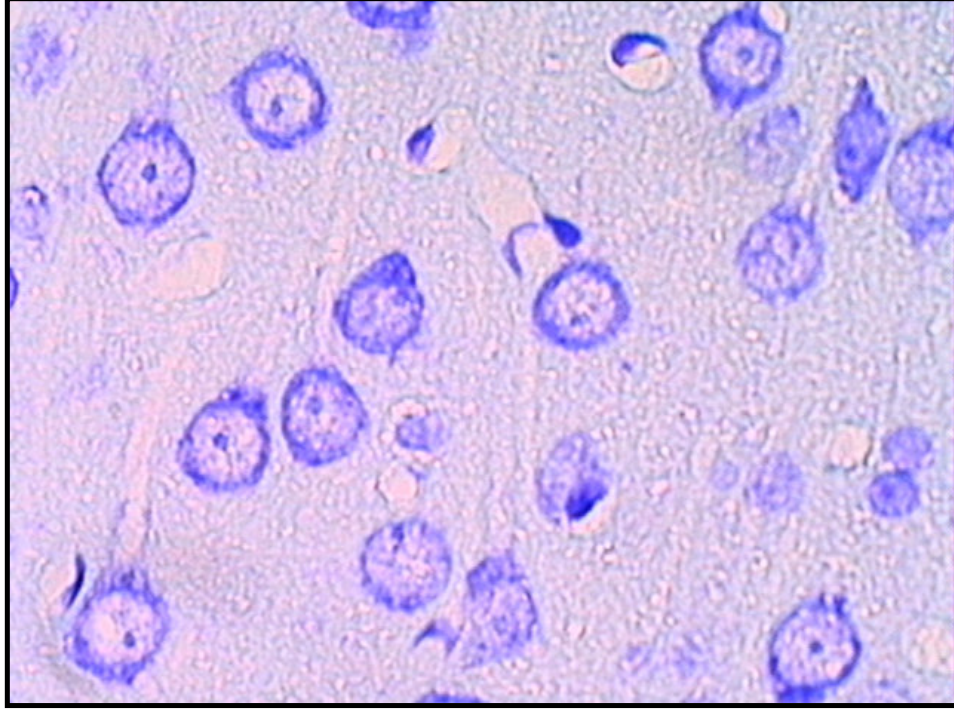
Resim 19: İR+G+S grubu prefrontal korteks genel görünüm Crezyl-violet X13,2



Resim 20: İR+G+S grubu prefrontal korteks genel görünüm Crezyl-violet X33



Resim 21: İR+G+S grubu prefrontal korteks genel görünüm Crezyl-violet X66



Resim 22: İR+G+S grubu prefrontal korteks genel görünüm Crezyl-violet X132

5.1.2. Hipokampus Crezyl-violet boyaması

Sham grubunda (grup I), normal histolojik yapı gözlemlendi. Nöronlar normal görünümdeydi, sınırları belirgin hücre zarı bütünlüğü korunmuştu. Çekirdek sınırları düzenli, kromatin dağılımı normal ve çekirdekcik belirgin olarak gözlemlendi. Işık mikroskopik gözlemlerde glial hücre sayısı olağan olarak izlendi (Resim 23-25).

İskemi ve reperfüzyon grubu ve tedavi grupları deneklerin hipokampus doku örneklerinden alınan kesitler, crezyl-violet ile boyanarak incelendiğinde iskemi reperfüzyon uygulanan grup ile tedavi grupları arasında ışık mikroskopik olarak farklılıklar gözlemlendi.

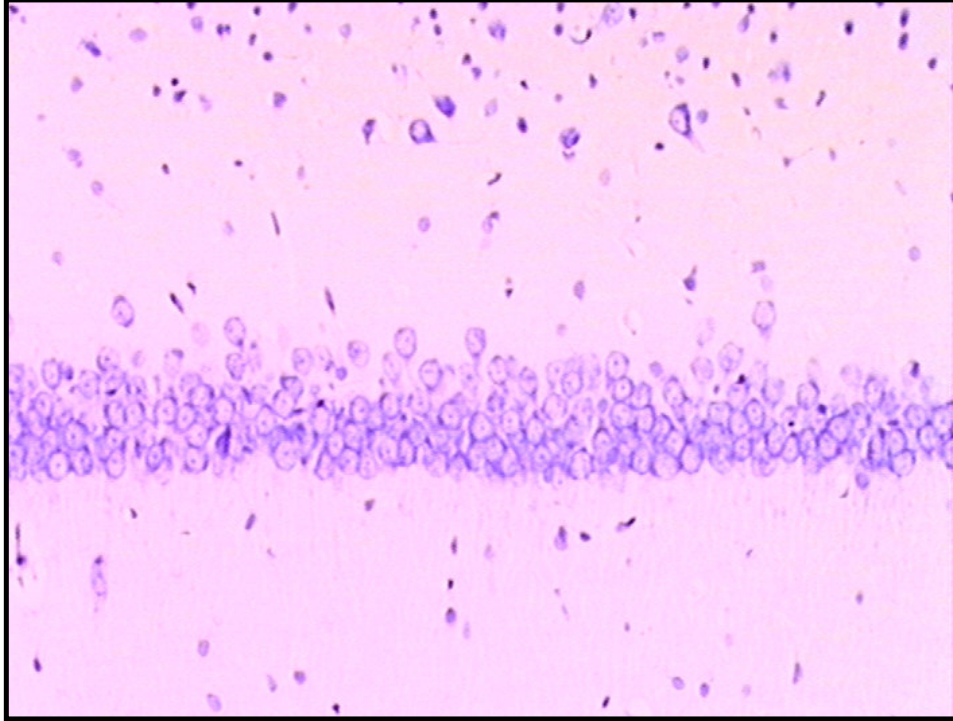
İR grubunda (grup II), hipokampusun tipik çok sıralı hücre dizilimi bozulmuş, hücreler seyrekleşmişti. Daha büyük büyültmelerde sham grubuna göre nöronların büzüldüğü ve sayıca azaldığı, birbirinden uzak, seyrek dizimli yerleştiği, nöronlar arasındaki alanların glial hücrelerce işgal edildiği saptandı. Hücre ve çekirdek

sınırlarında düzensizlik, ışık mikroskopik olarak glial hücre artışı izlendi (Resim 26-28).

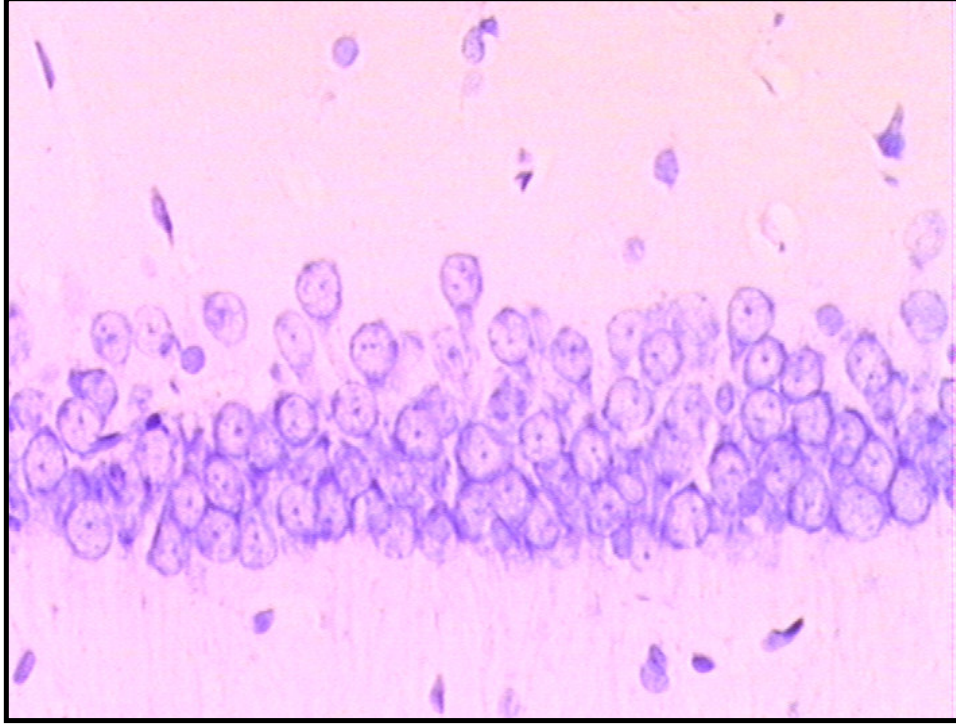
İR+ ginkgo biloba verilen grupta (grup III), hipokampus yeniden çok sıralı görünüm kazanmış olağan yapıdaydı. Hücreler birbiriyle yakın komşulukta olarak gözlemlendi. Nöronlarda çekirdek ve çekirdekçik belirgindi. Glial hücrelerin dağılımı normal olarak izlendi (Resim 29-31).

İR+ selenyum verilen grupta (grup IV), İR grubunda (grup II) gözlenen nöronlardaki büzülme çok az sayıda bu grupta da gözlemlendi (Resim 32-34).

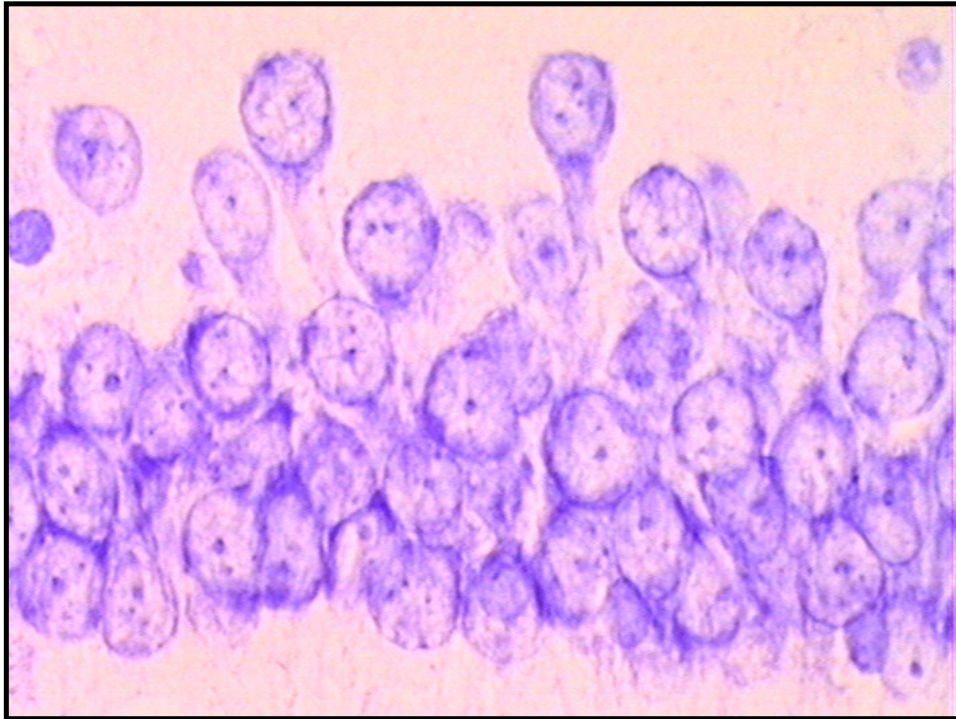
İR+ ginkgo biloba ve selenyumun birlikte verildiği grupta (grup V) nöronlar normal yapıda, çekirdek ve çekirdekçik belirgindi. Glial hücre dağılımı olağandı (Resim 35-37).



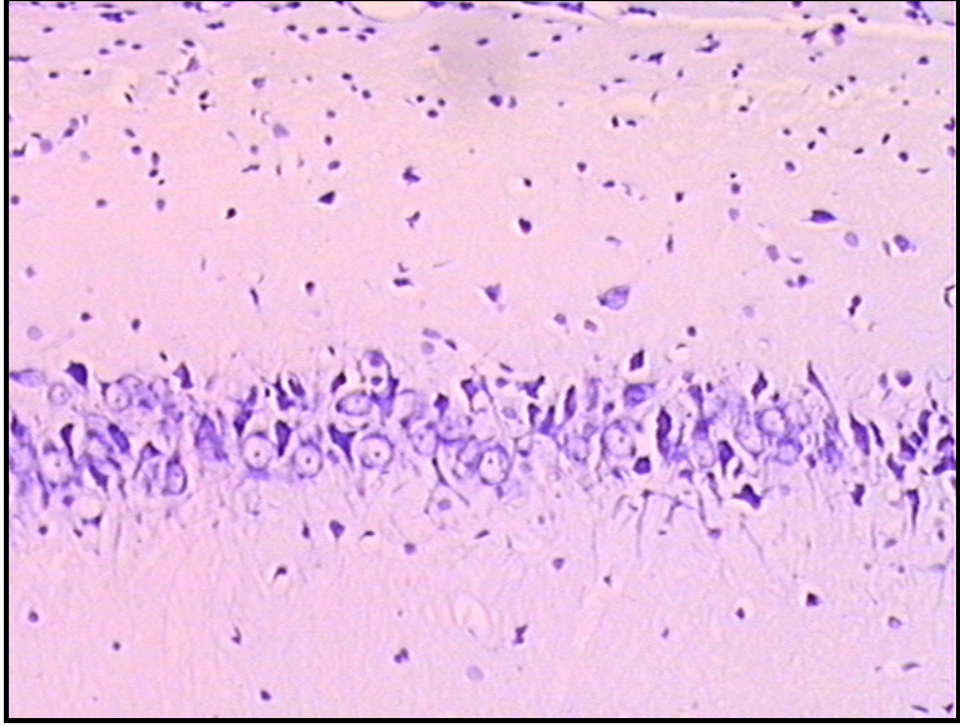
Resim 23: Sham grubu hipokampus genel görünüm Crezyl-violet X33



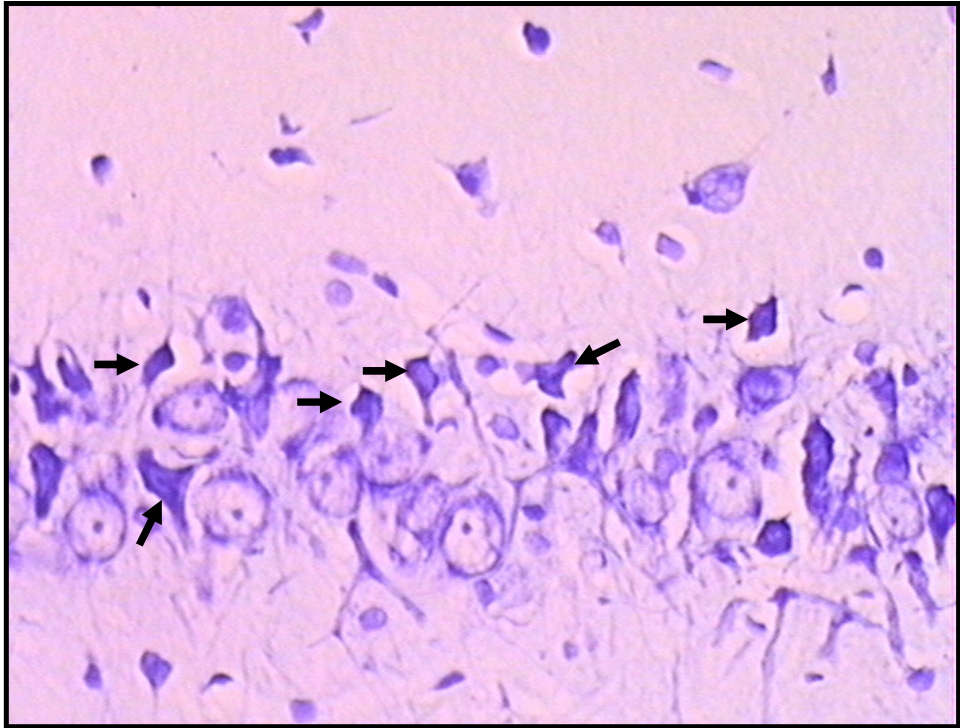
Resim 24: Sham grubu hipokampus genel görünüm Crezyl-violet X66



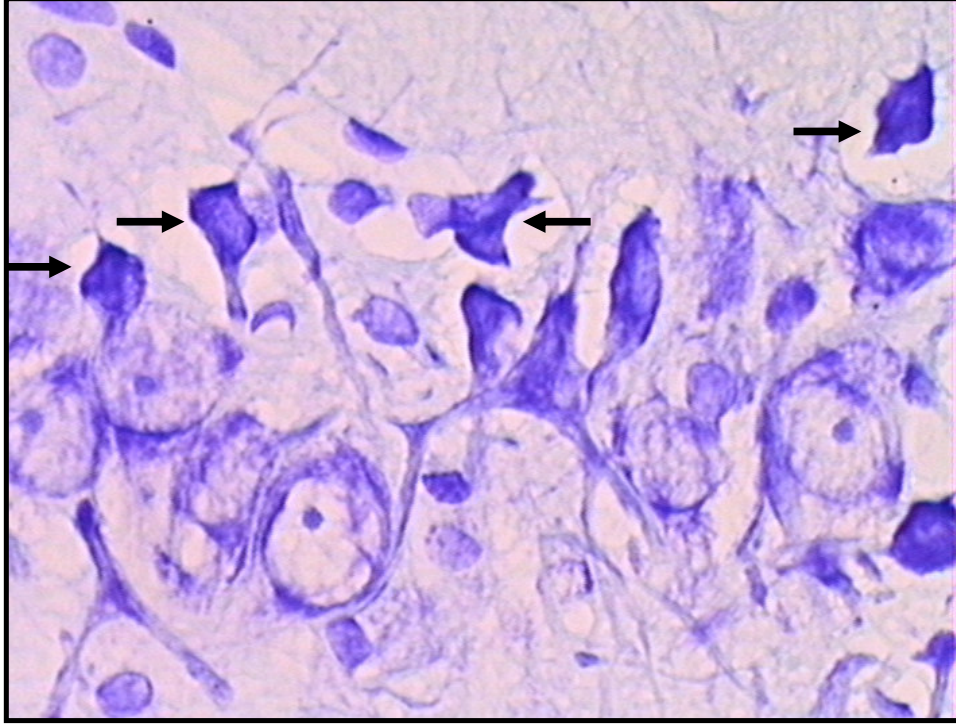
Resim 25: Sham grubu hipokampus genel görünüm Crezyl-violet X132



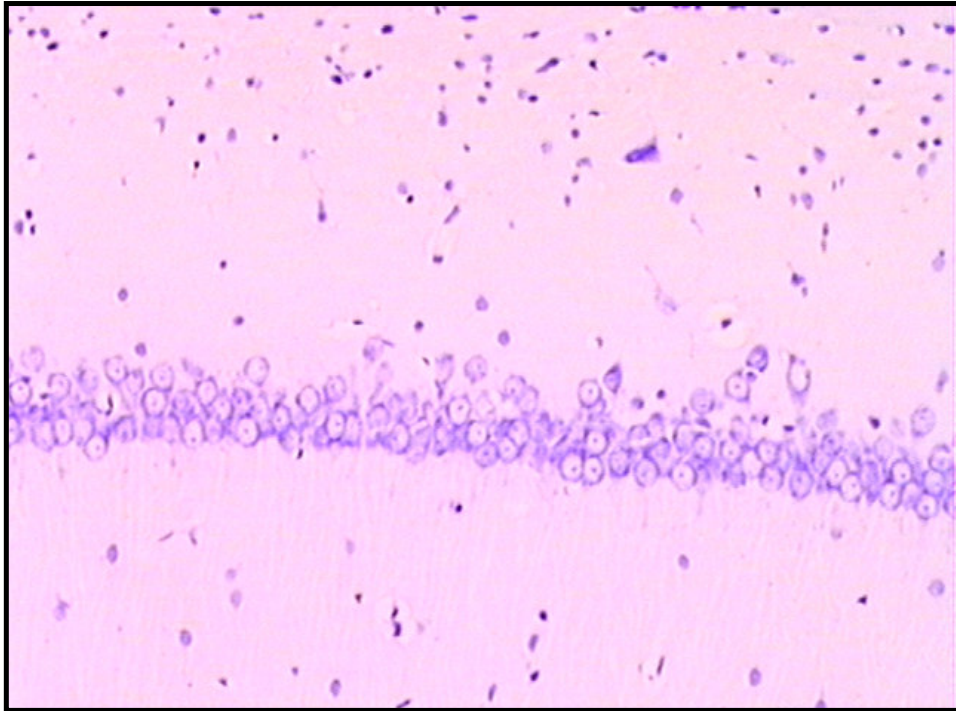
Resim 26: İR grubu hipokampus genel görünüm Crezyl-violet X33



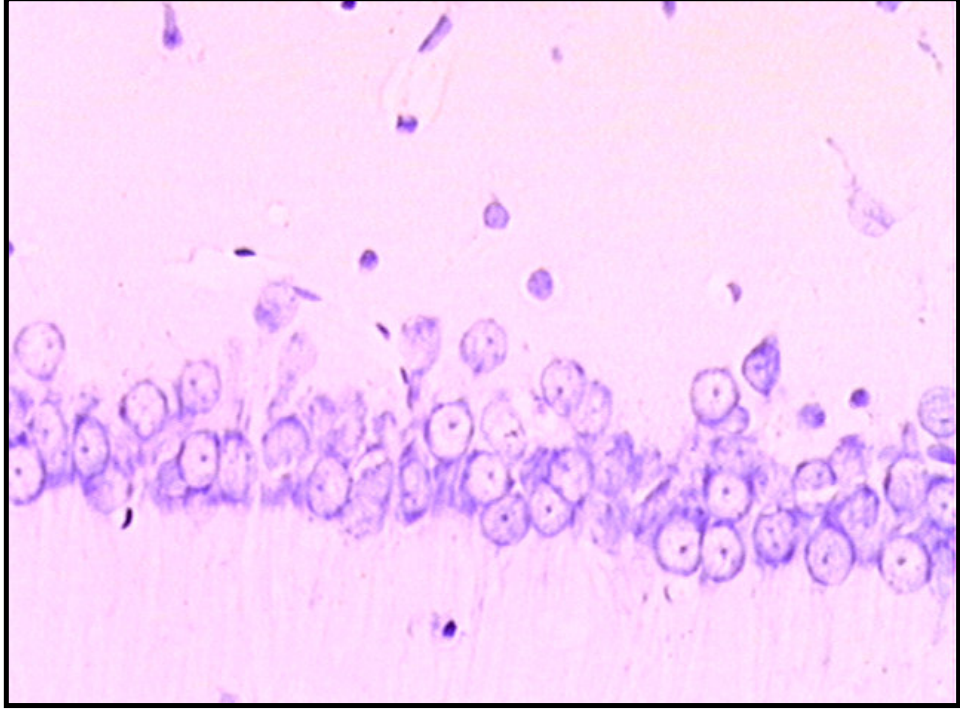
Resim 27: İR grubu hipokampus nöronlarda büzülme (→) Crezyl-violet X66



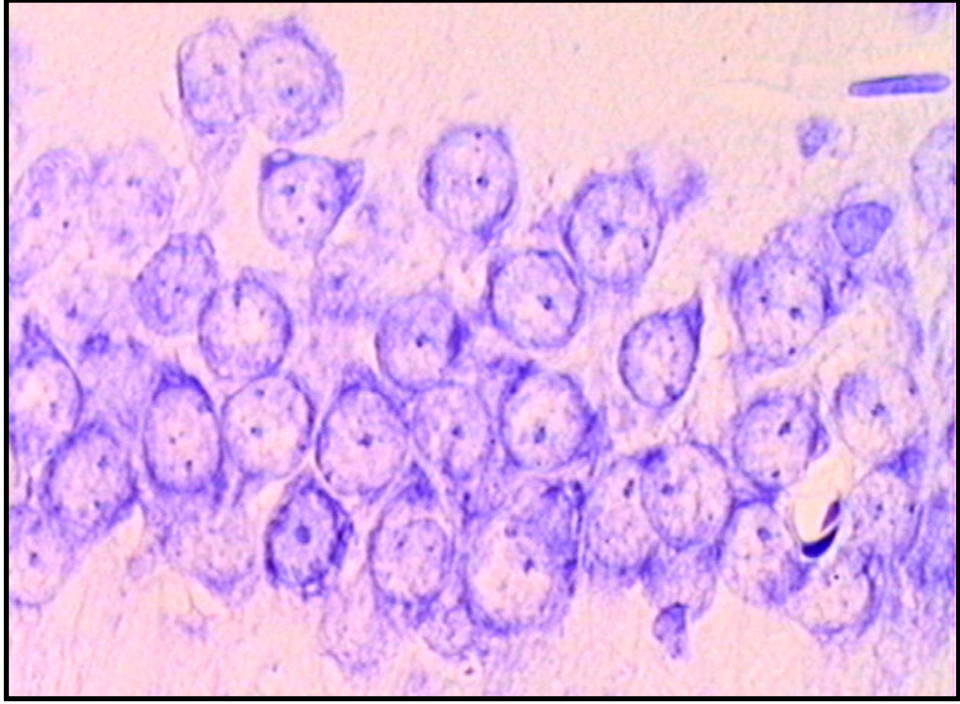
Resim 28: ÎR grubu hipokampus nöronlarda büzülme (→) Crezyl-violet X132



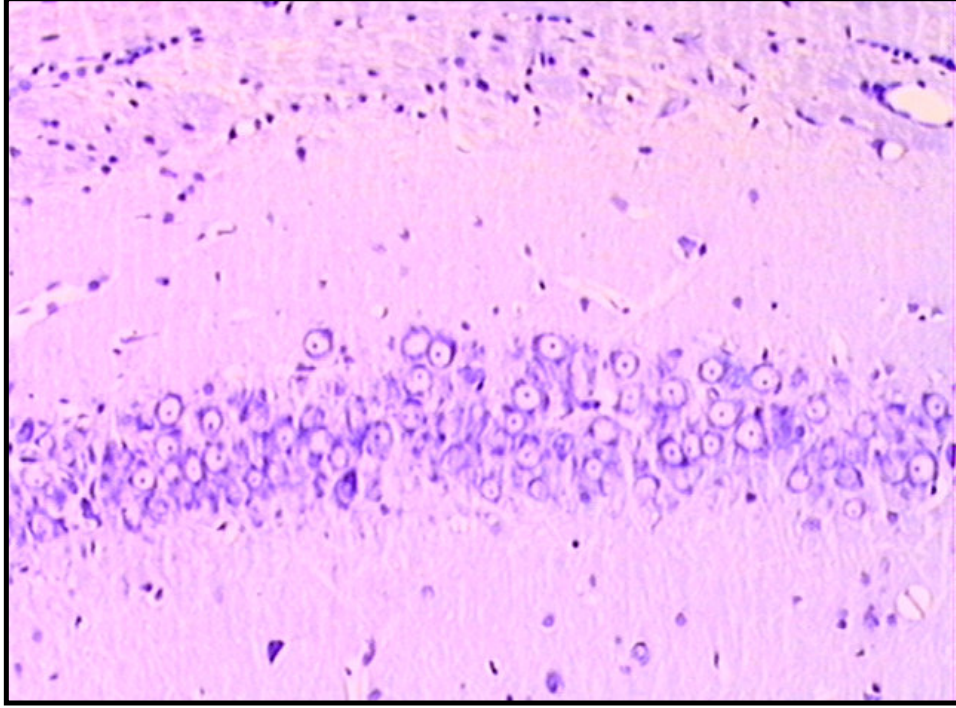
Resim 29: ÎR+G grubu hipokampus genel görünüm Crezyl-violet X33



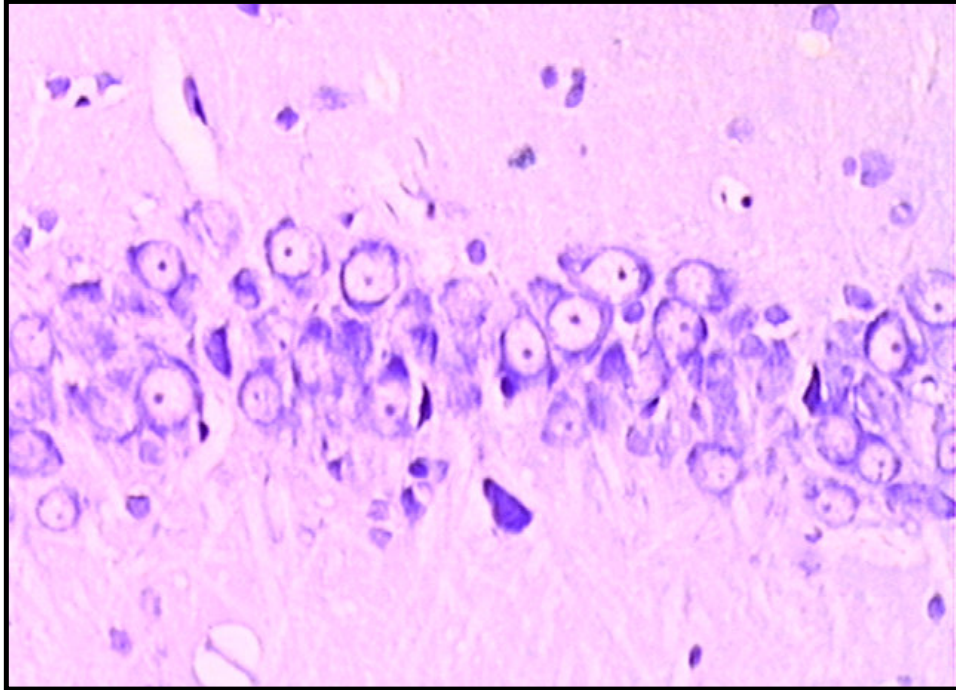
Resim 30: İR+G grubu hipokampus genel görünüm Crezyl-violet X66



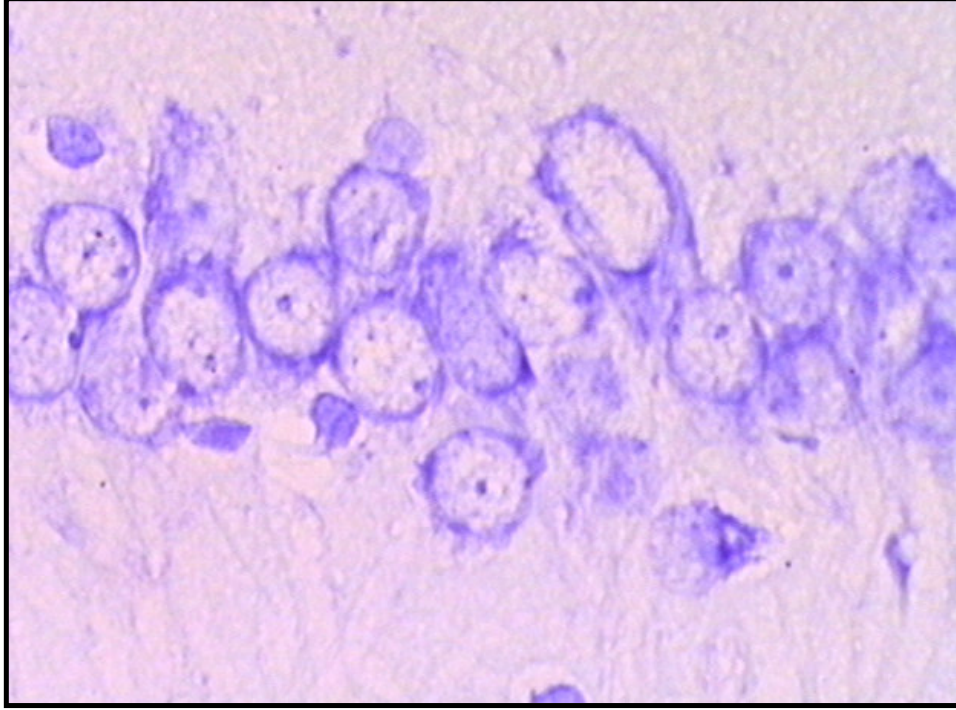
Resim 31: İR+G grubu hipokampus genel görünüm Crezyl-violet X132



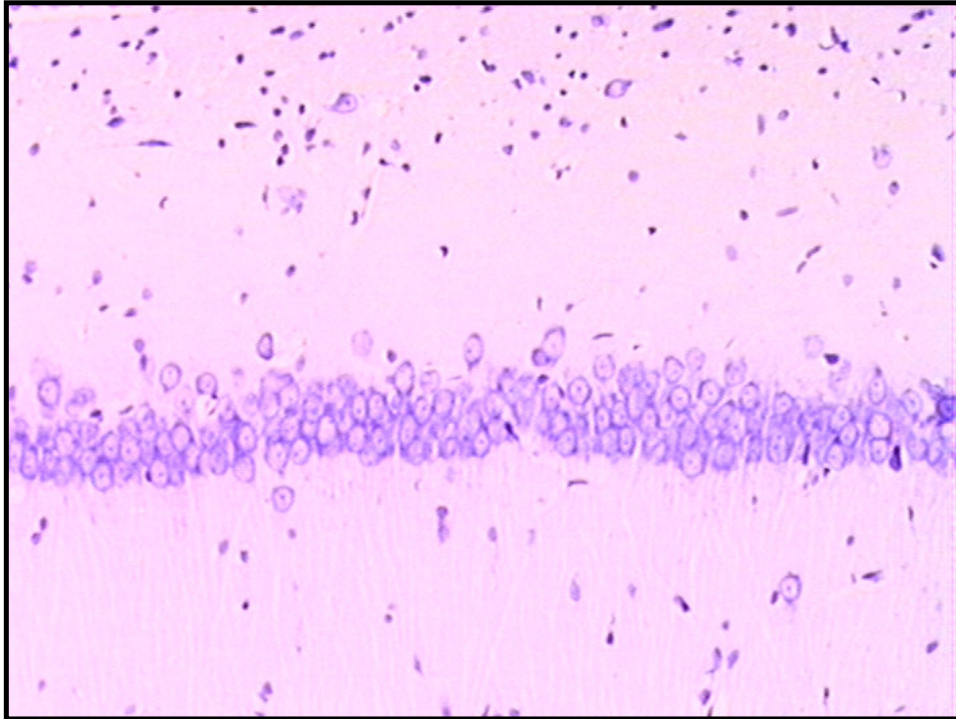
Resim 32: İR+S grubu hipokampus genel görünüm Crezyl-violet X33



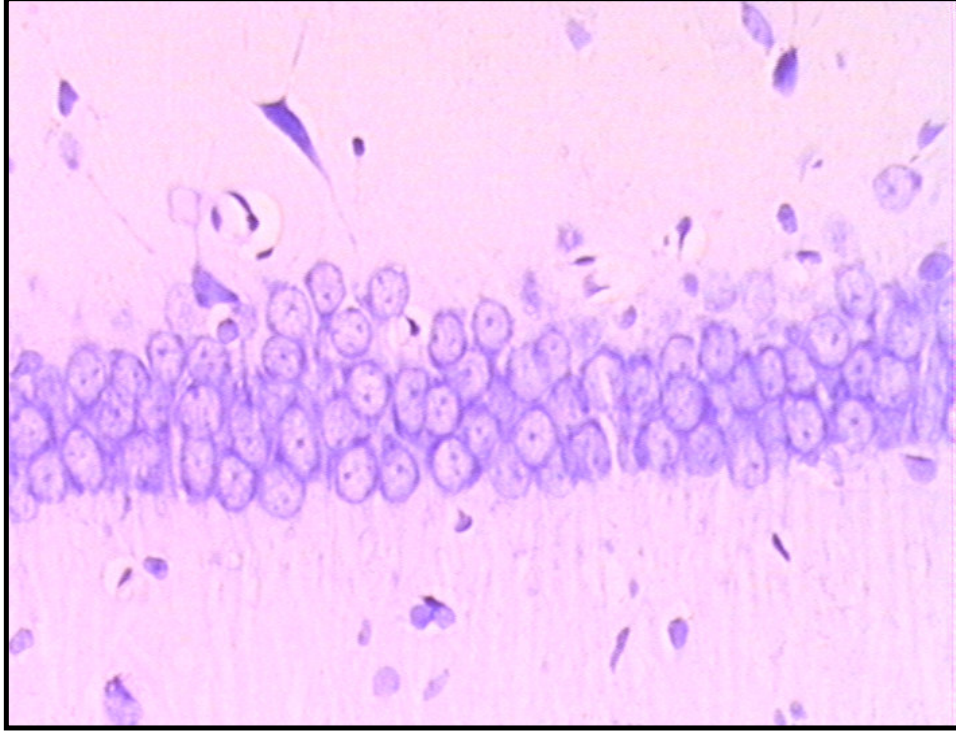
Resim 33: İR+S grubu hipokampus genel görünüm Crezyl-violet X66



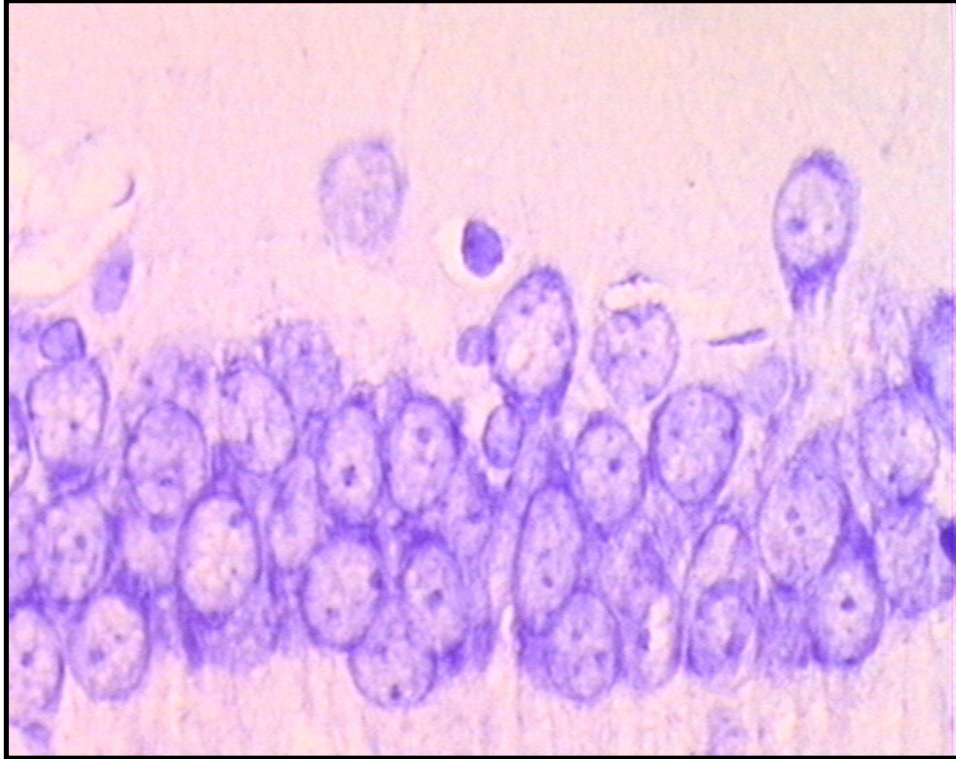
Resim 34: İR+S grubu hipokampus genel görünüm Crezyl-violet X132



Resim 35: İR+G+S grubu hipokampus genel görünüm Crezyl-violet X33



Resim 36: İR+G+S grubu hipokampus genel görünüm Crezyl-violet X66



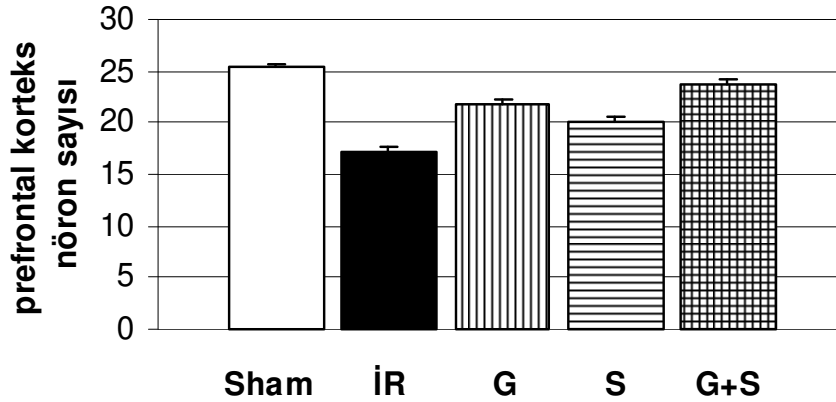
Resim 37: İR+G+S grubu hipokampus genel görünüm Crezyl-violet X132

5. 2. Hücre Sayımı Sonuçları

5.2.1. Prefrontal Korteks Hücre Sayımı

Ortalama Prefrontal Korteks nöron sayıları, Sham grubunda $25,3 \pm 0,3$ hücre; İR grubunda $17,1 \pm 0,5$ hücre; Ginkgo biloba verilen grupta $21,8 \pm 0,5$ hücre, Selenyum verilen grupta $20,0 \pm 0,5$ hücre; G+S verilen grupta ise $23,7 \pm 0,5$ hücre olarak bulundu.

İstatistiksel olarak karşılaştırıldığında, gruplar arasında sırası ile; İR ile Sham grubu arasında ($p < 0,001$); İR ile G grubu arasında ($p < 0,001$), İR grubu ile S grubu arasında ($p = 0,004$); İR ile G+S grubu arasında ($p < 0,001$) anlamlı istatistiksel fark bulundu. İR grubu karşılaştırıldığı bu gruplardan anlamlı derecede düşüktü. G ile Sham grubu arasında ($p = 0,008$); S ile Sham grubu arasında ($p < 0,001$) anlamlı istatistiksel fark vardı. Sham grubu değerleri, karşılaştırıldığı bu gruplardan anlamlı derecede yüksekti. G+S ile S grubu arasında ($p < 0,001$) anlamlı istatistiksel fark vardı. G+S grubu değerleri, karşılaştırıldığı bu gruptan anlamlı derecede yüksekti (One Way ANOVA, Bonferroni) (Tablo 1).



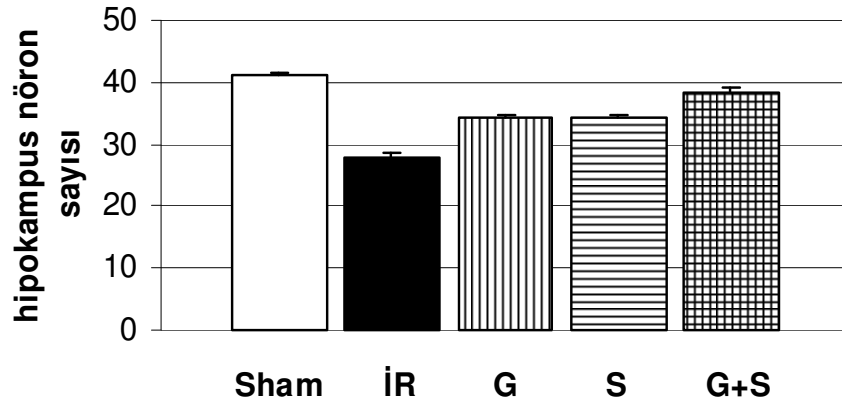
Tablo 1: Prefrontal Korteks Nöron Sayısı Ortalamaları

5.2.2. Hipokampus Hücre Sayımı

Ortalama Hipokampus nöron sayıları, Sham grubunda $41,3 \pm 0,3$ hücre; İR grubunda $28,0 \pm 0,7$ hücre; Ginkgo biloba verilen grupta $34,1 \pm 0,5$ hücre, Selenyum verilen grupta $34,1 \pm 0,5$ hücre; G+S verilen grupta ise $38,2 \pm 0,6$ hücre olarak bulundu.

İstatistiksel olarak karşılaştırıldığında, gruplar arasında sırası ile; İR ve Sham grubu arasında ($p < 0,001$); İR ile G grubu arasında ($p < 0,001$), İR ile S grubu arasında

($p<0,001$); İR ile G+S grubu arasında ($p<0,001$) anlamlı istatistiksel fark bulundu. İR grubu karşılaştırıldığı bu gruplardan anlamlı derecede düşüktü. G ile Sham grubu arasında ($p<0,001$); S ile Sham grubu arasında ($p<0,001$) anlamlı istatistiksel fark vardı. Sham grubu değerleri, karşılaştırıldığı bu gruplardan anlamlı derecede yüksekti. G+S ile G grubu arasında ($p<0,001$); G+S ile S grubu arasında ($p<0,001$) anlamlı istatistiksel fark bulundu. G+S grubu karşılaştırıldığı bu gruplardan anlamlı derecede yüksekti (One Way ANOVA, Bonferroni) (Tablo 2).



Tablo 2: Hipokampus Nöron Sayısı Ortalamaları

5.3. İmmunohistokimyasal Bulgular

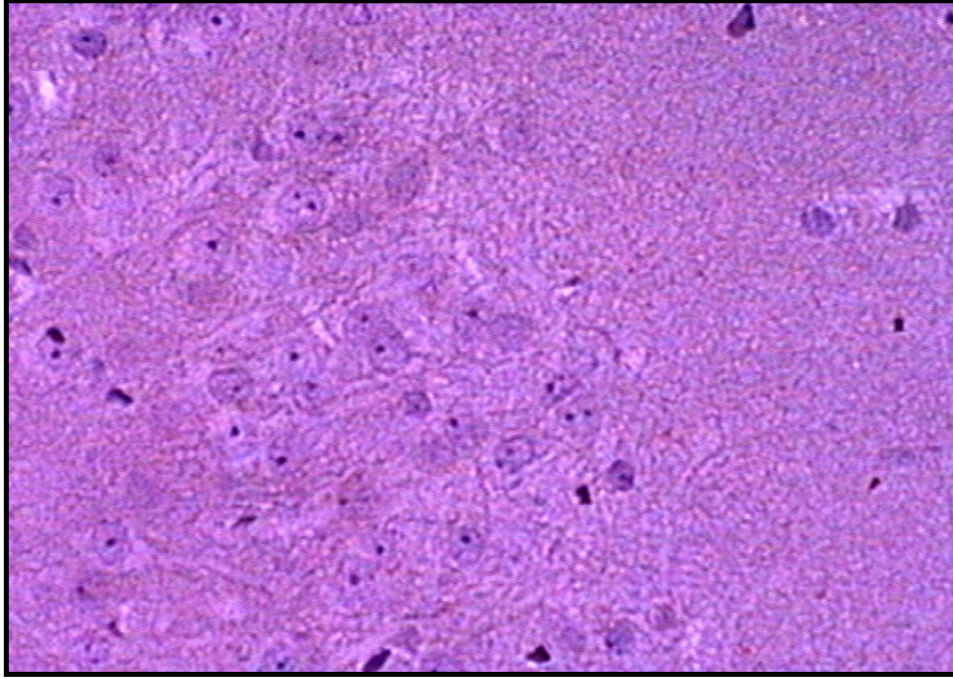
5.3.1. Prefrontal Korteks İmmunohistokimyasal Bulgular

Sham grubunda (grup I), apostain ile boyanan prefrontal korteks kesitlerinde herhangi bir tutulum gözlenmedi ve normal histolojik yapı izlendi. (Resim 38-39, 46).

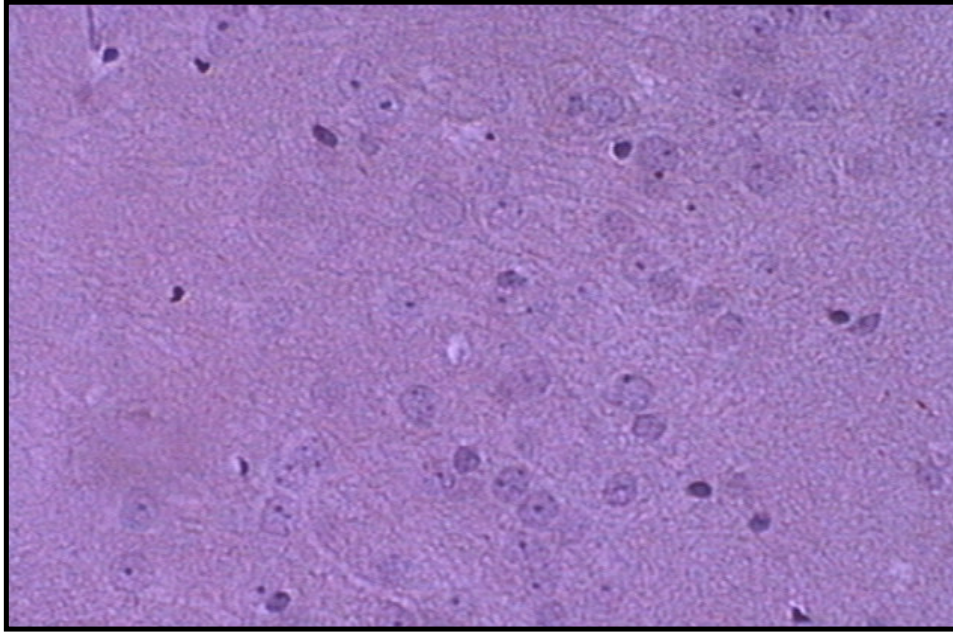
İskemi-reperfüzyon modelinde deneklerden alınan ve apostain ile boyanan prefrontal korteks kesitlerinde, iskemi reperfüzyon uygulanan grup ile tedavi grupları arasında fark vardı.

İR grubunda (grup II), apostain ve kaspaz-3 ile boyanan kesitlerde apoptoza giden nöronlar belirgin olarak işaretlenmişti (Resim 40-42, 47-48).

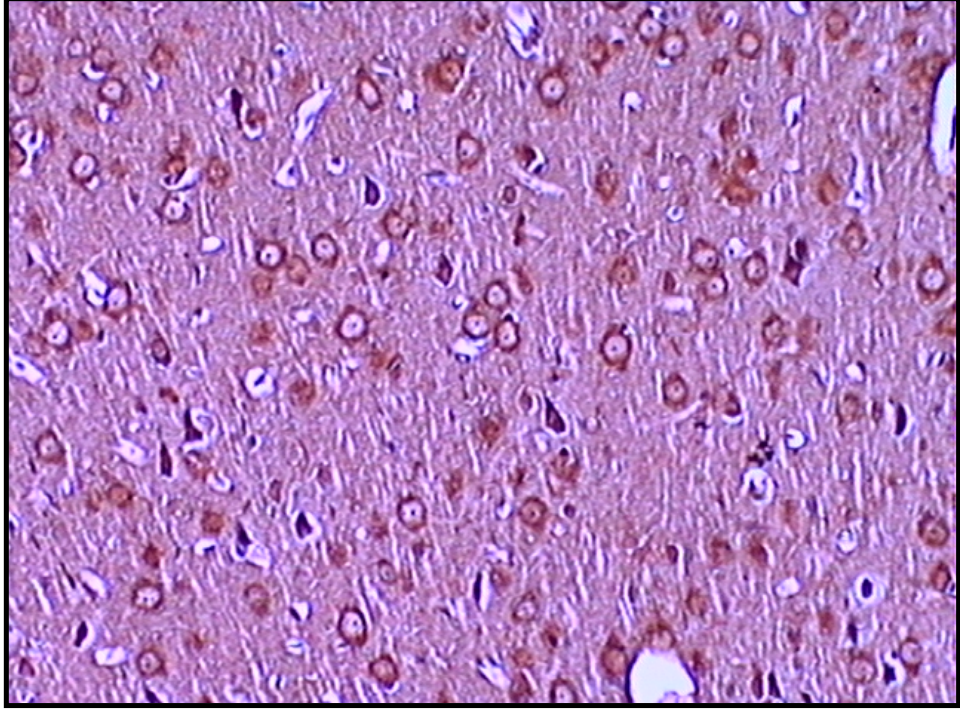
Sham grubunda olduğu gibi (grup I) tedavi gruplarında (grup III, IV, V) apostain ve kaspaz-3 ile pozitif boyanan hücrelere rastlanmadı (Resim 43-45, 49-51).



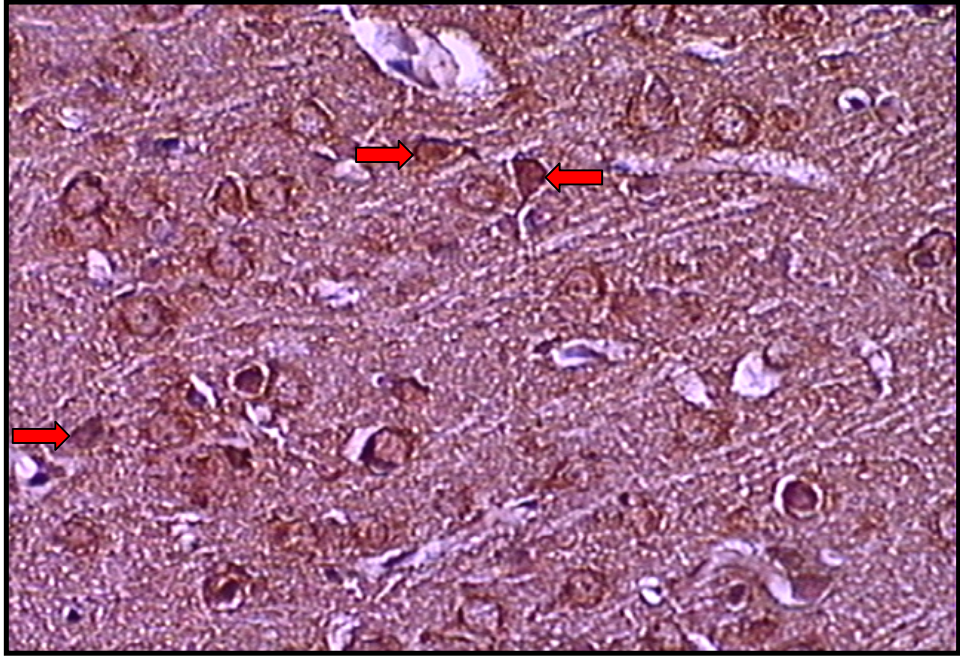
Resim 38: Sham grubu prefrontal korteks genel görünüm Apostain X33



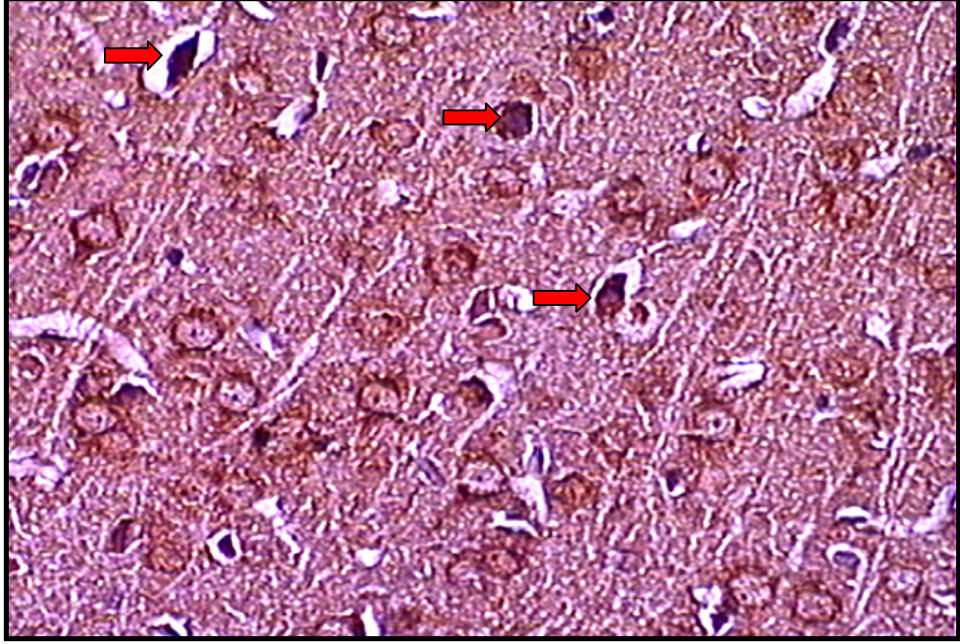
Resim 39: Sham grubu prefrontal korteks genel görünüm Apostain X66



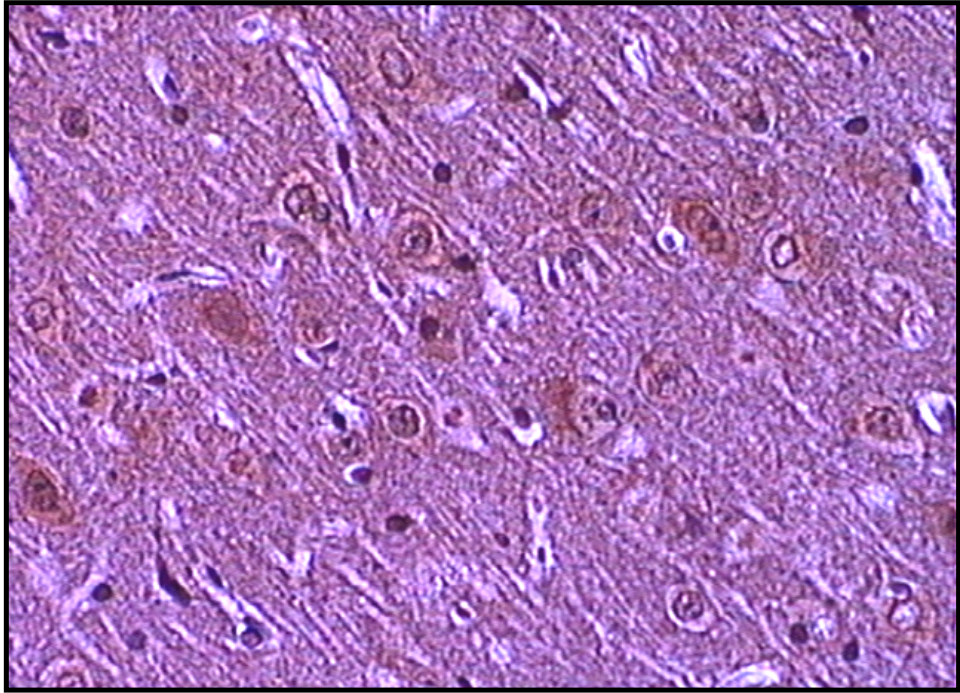
Resim 40: İR grubu prefrontal korteks genel görünüm Apostain X33



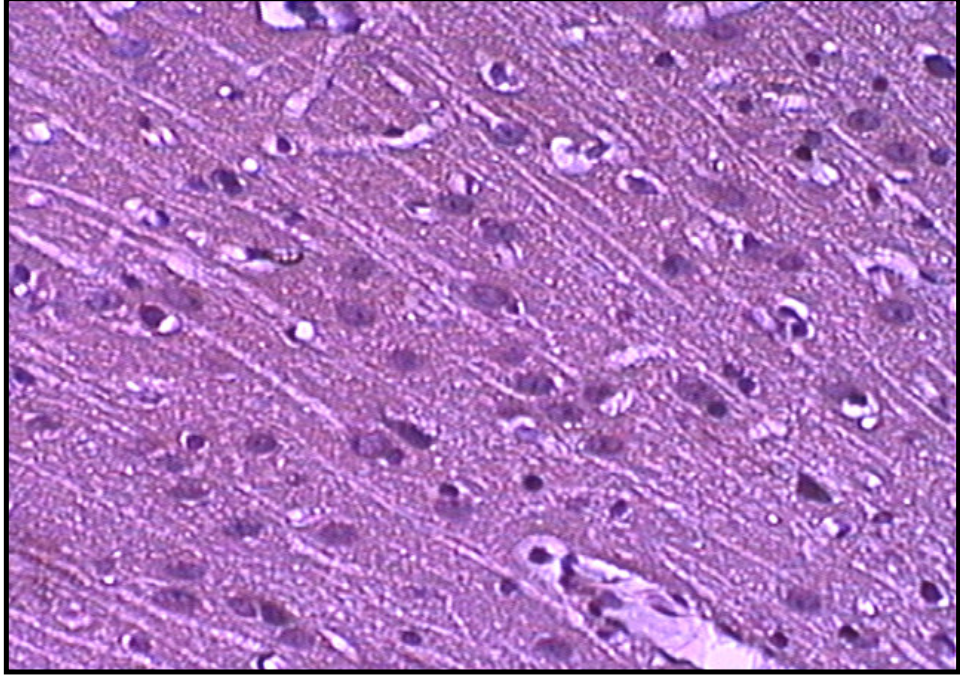
Resim 41: İR grubu prefrontal kortekste apoptotik hücreler (→) Apostain X66



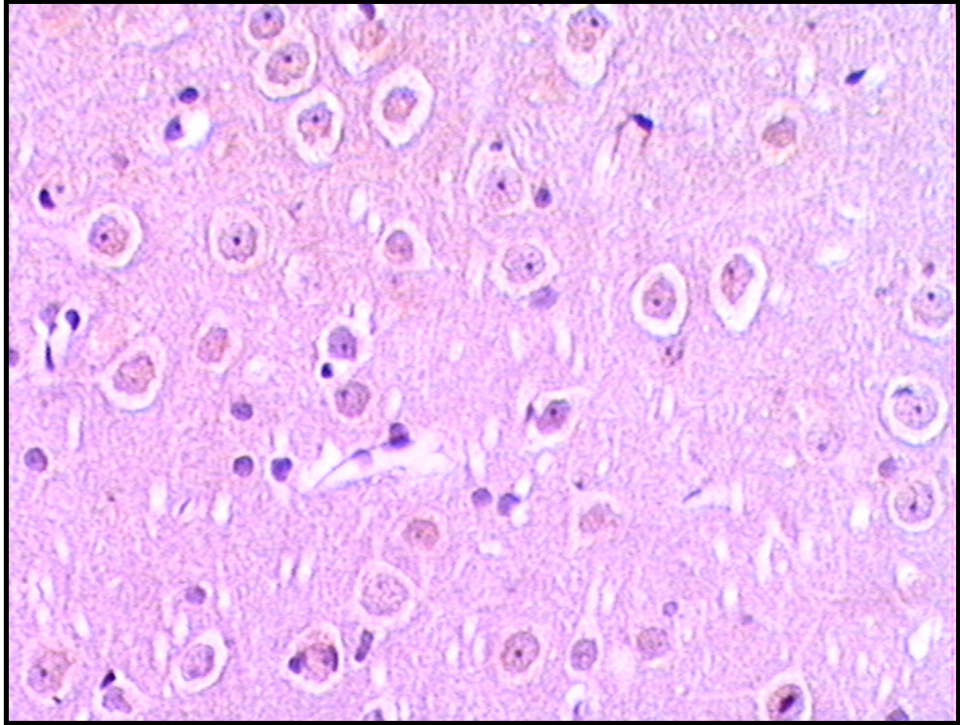
Resim 42: İR grubu prefrontal kortekste apoptotik hücreler (→) Apostain X66



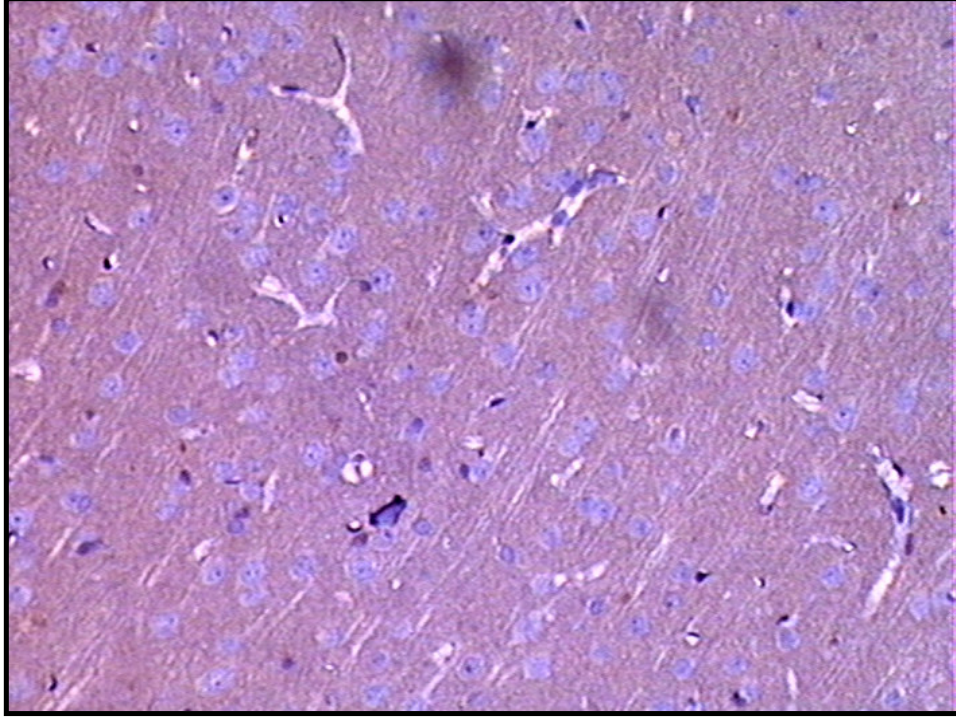
Resim 43: IR+G grubu prefrontal korteks genel görünüm Apostain X66



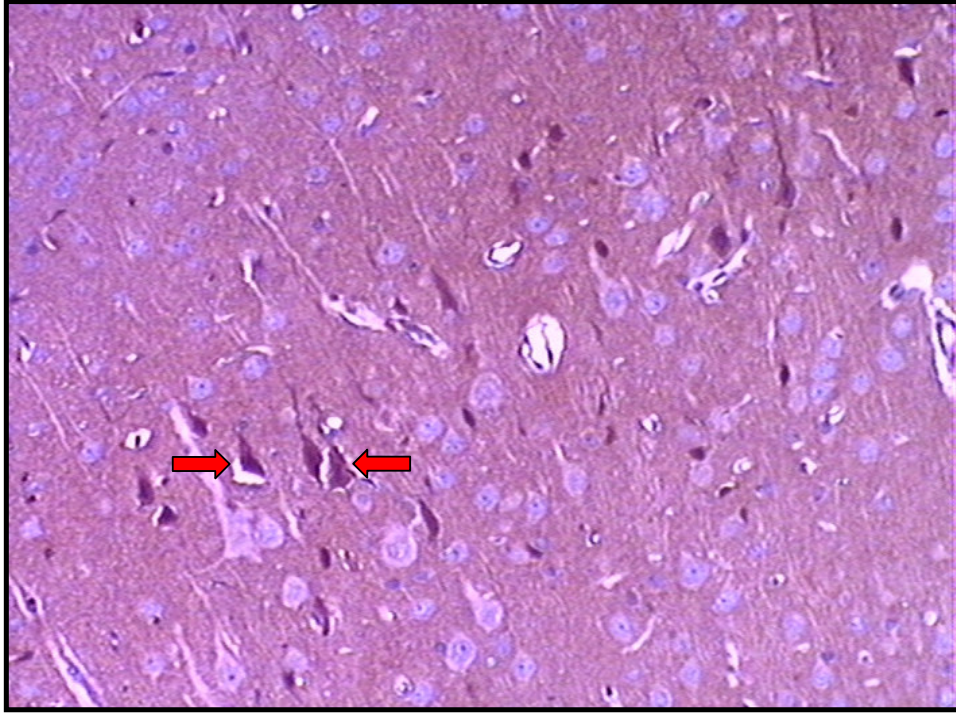
Resim 44: IR+S grubu prefrontal korteks genel görünüm Apostain X66



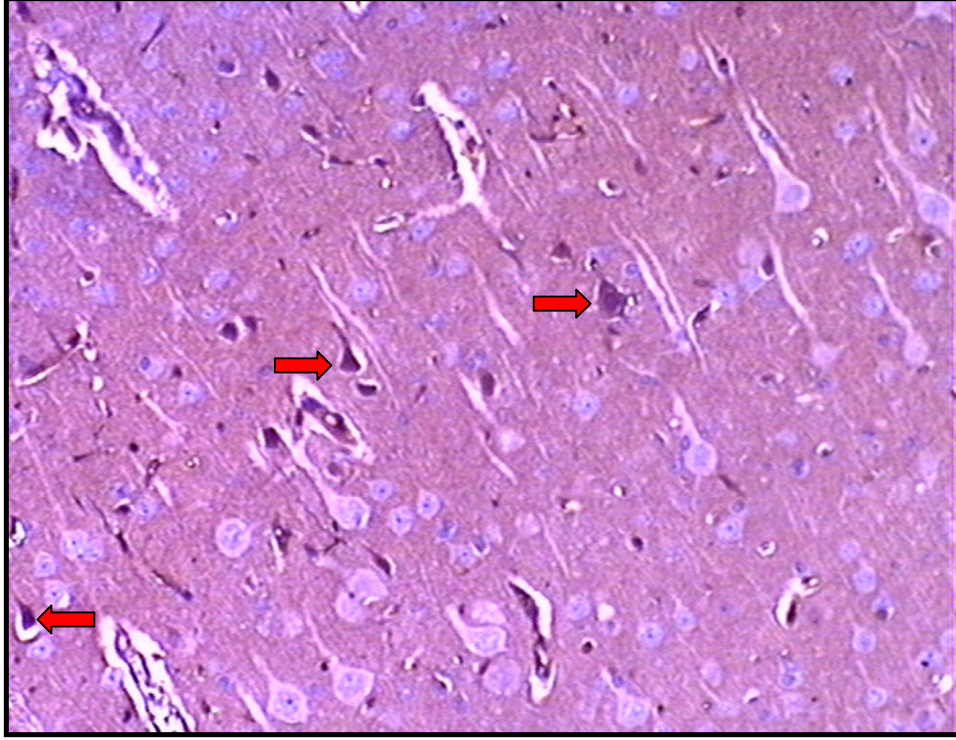
Resim 45: IR+G+S grubu prefrontal korteks genel görünüm Apostain X66



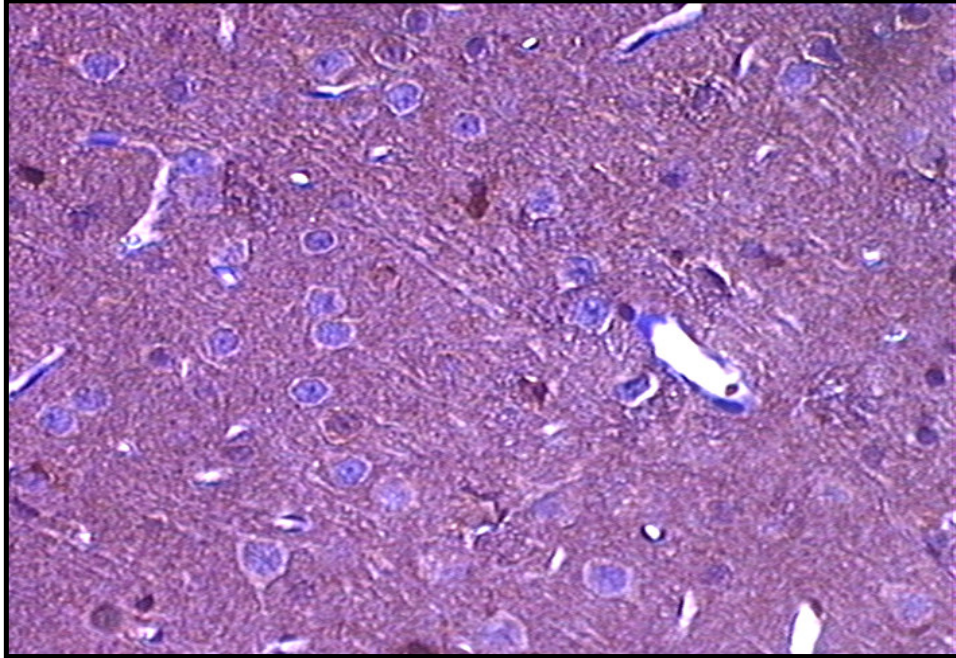
Resim 46: Sham grubu prefrontal korteks genel görünüm Kaspaz-3 X33



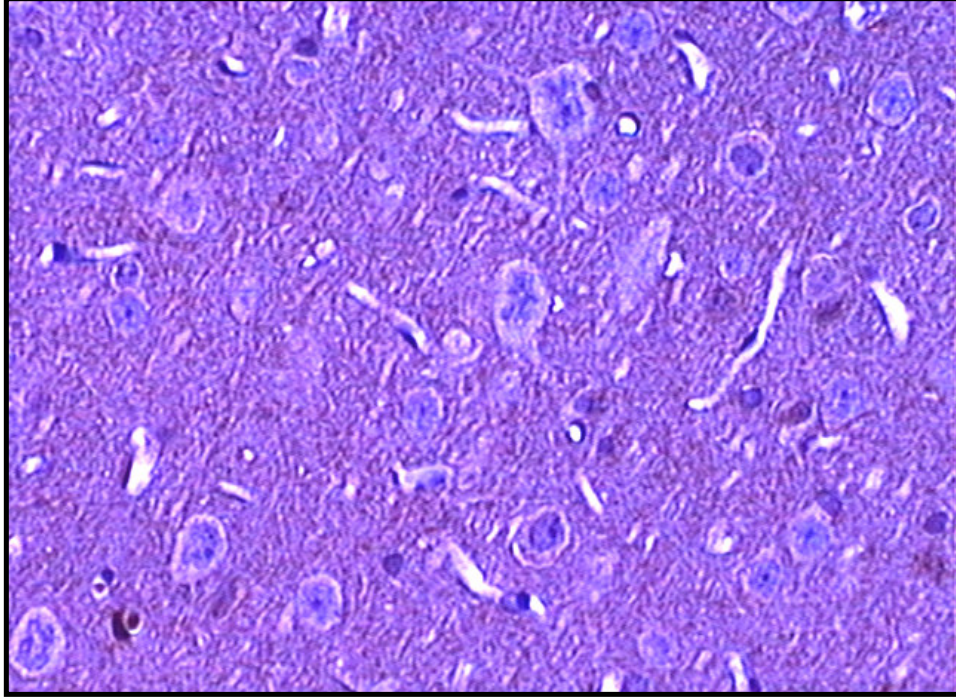
Resim 47: İR grubu prefrontal kortekste apoptotik hücreler (→) Kaspaz-3 X33



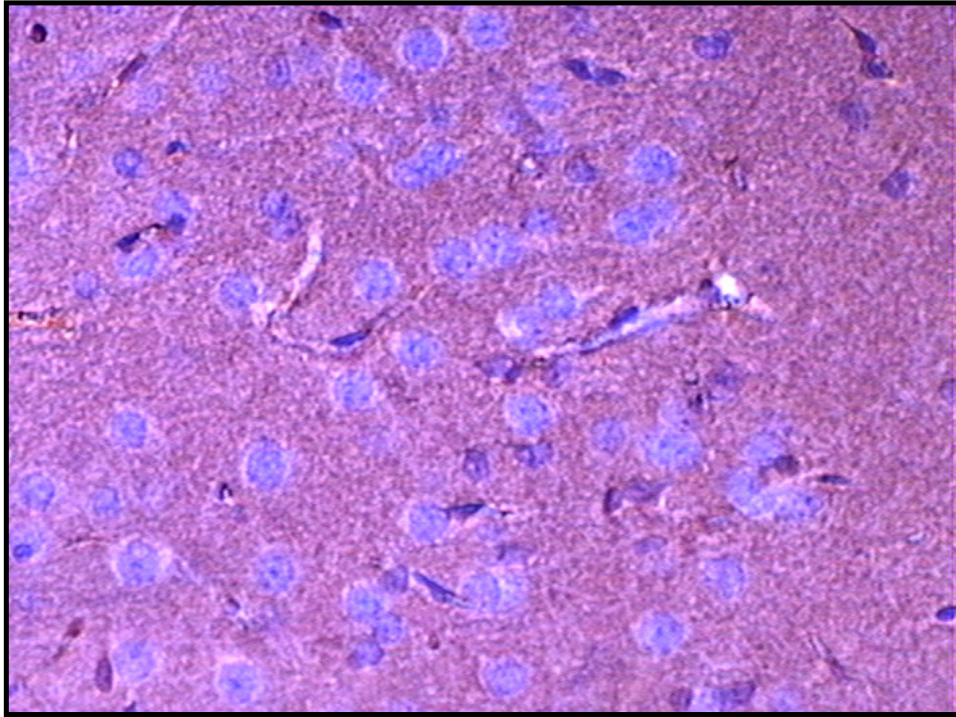
Resim 48: İR grubu prefrontal kortekste apoptotik hücreler (→) Kaspaz-3 X33



Resim 49: İR+G grubu prefrontal korteks genel görünüm Kaspaz-3 X66



Resim 50: İR+S grubu prefrontal korteks genel görünüm Kaspaz-3 X66

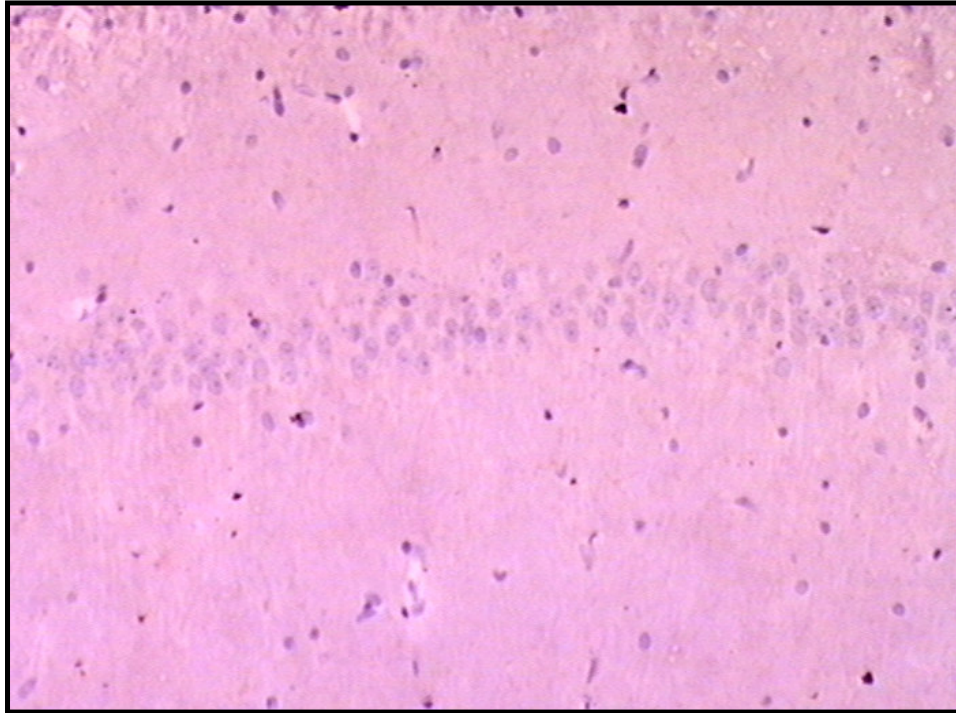


Resim 51: İR+G+S grubu prefrontal korteks genel görünüm Kaspaz-3 X66

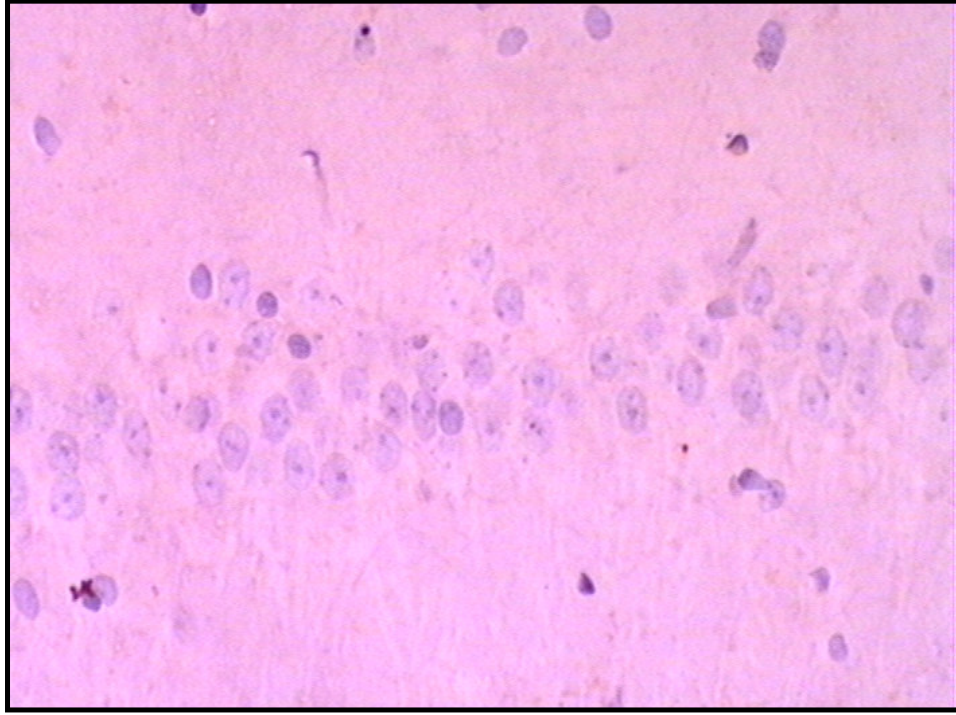
5.3.2. Hipokampus İmmunohistokimyasal Bulgular

Sham grubunda, apostain ve kaspaz-3 ile boyanan hipokampus kesitlerinde herhangi bir tutulum gözlenmedi ve normal histolojik yapı izlendi.

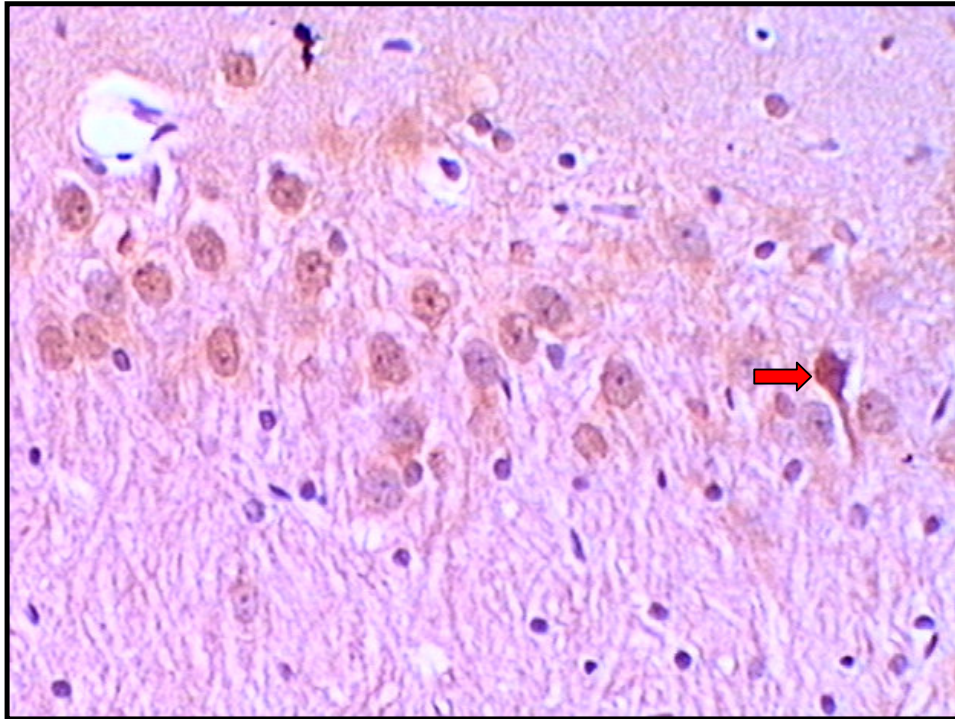
Sham grubu (Resim 52-53, 60-61) ve tedavi gruplarında (Resim 57-59, 65-73) hipokampus nöronları apostain ve kaspaz-3 ile negatif boyanırken İR grubu hipokampus nöronlarında apostain ile apoptoza giden hücreler çok sayıda ve belirgin olarak işaretlenmişti (Resim 54-56). Bu grupta uygulanan kaspaz-3 işaretlemesi ile pozitif tutulum gösteren apoptotik hücreler ise belirgin olarak işaretlenmişti (Resim 62-64).



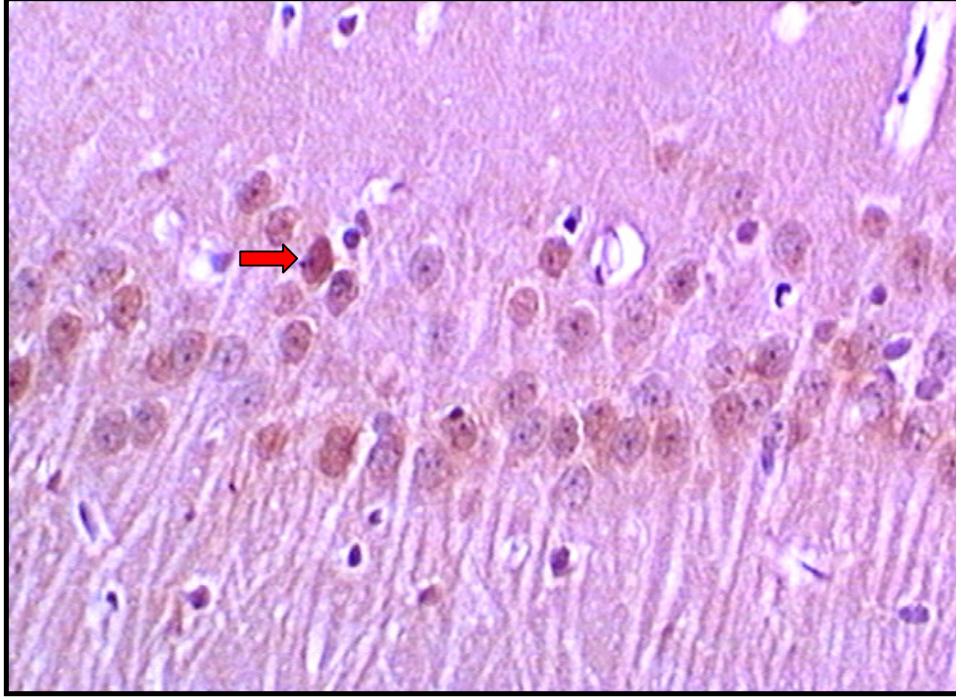
Resim 52: Sham grubu hipokampus genel görünüm Apostain X33



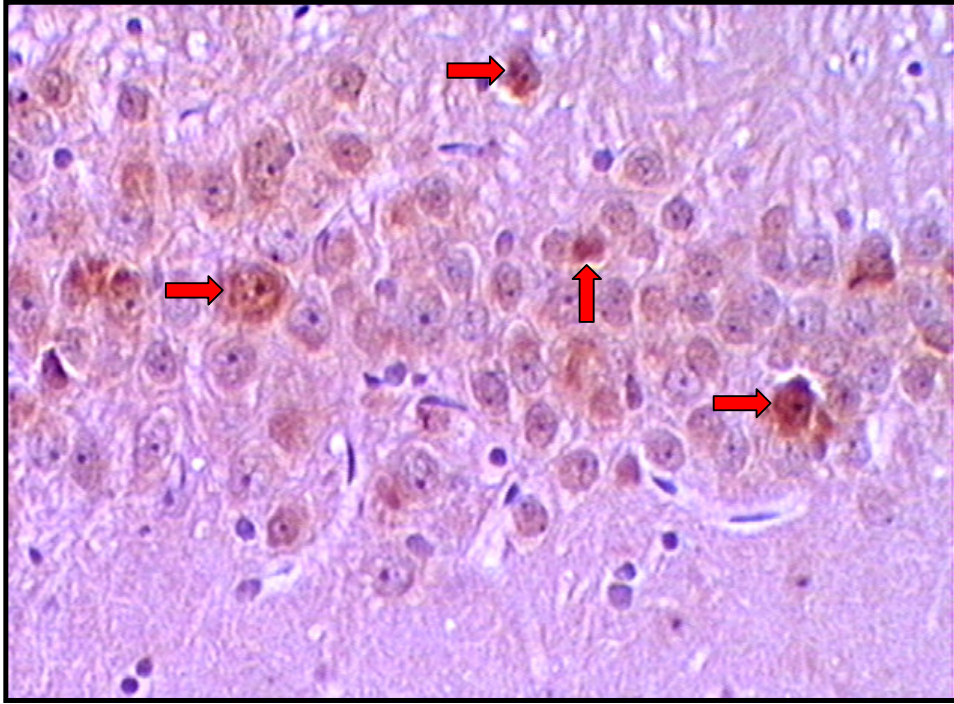
Resim 53: Sham grubu hipokampus genel görünüm Apostain X66



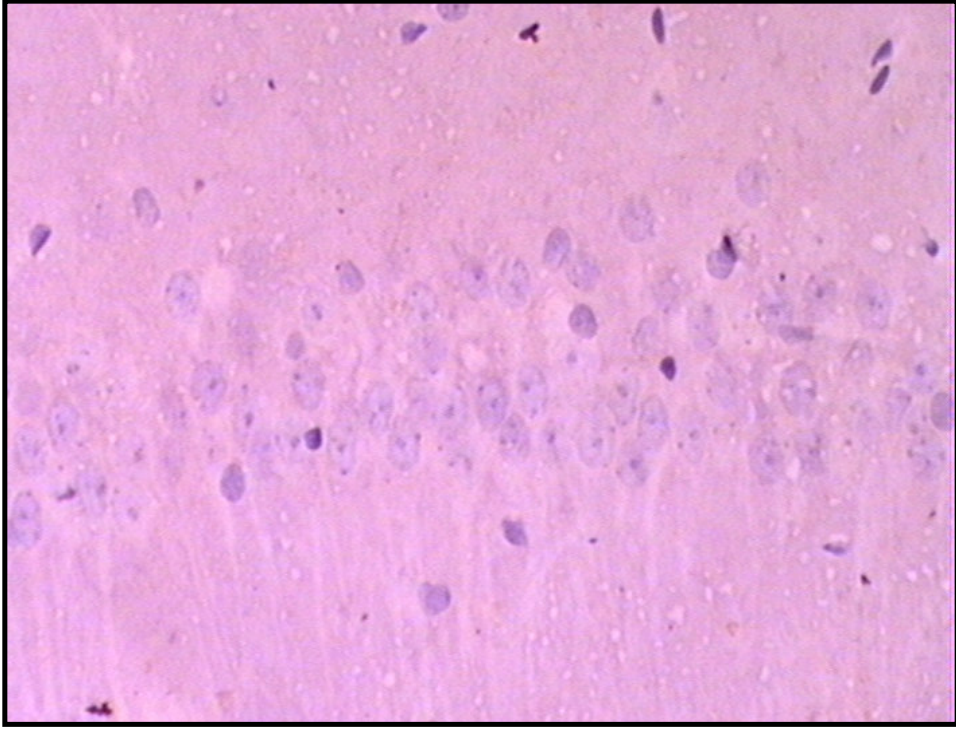
Resim 54: İR grubu hipokampusta apoptotik hücre (→) Apostain X66



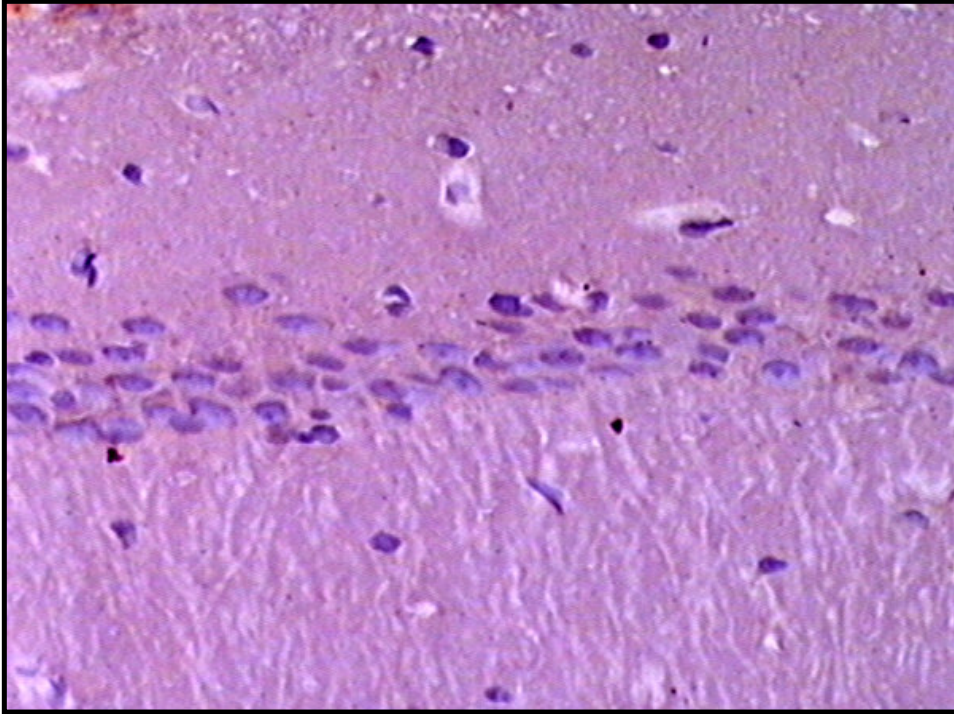
Resim 55: İR grubu hipokampusta apoptotik hücre (→) Apostain X66



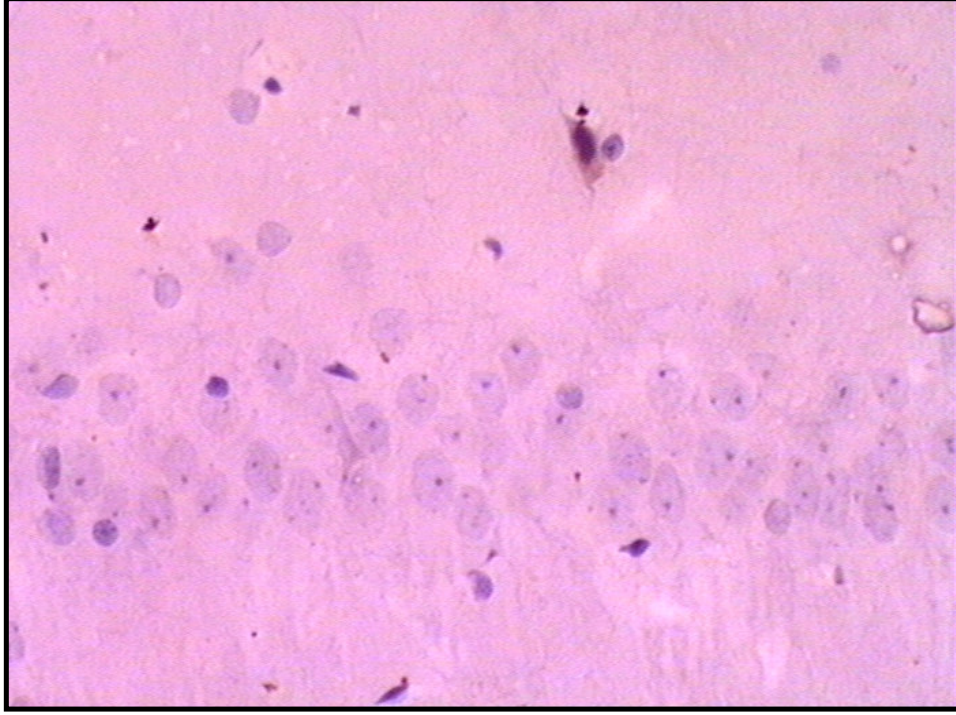
Resim 56: İR grubu hipokampusta apoptotik hücreler (→) Apostain X66



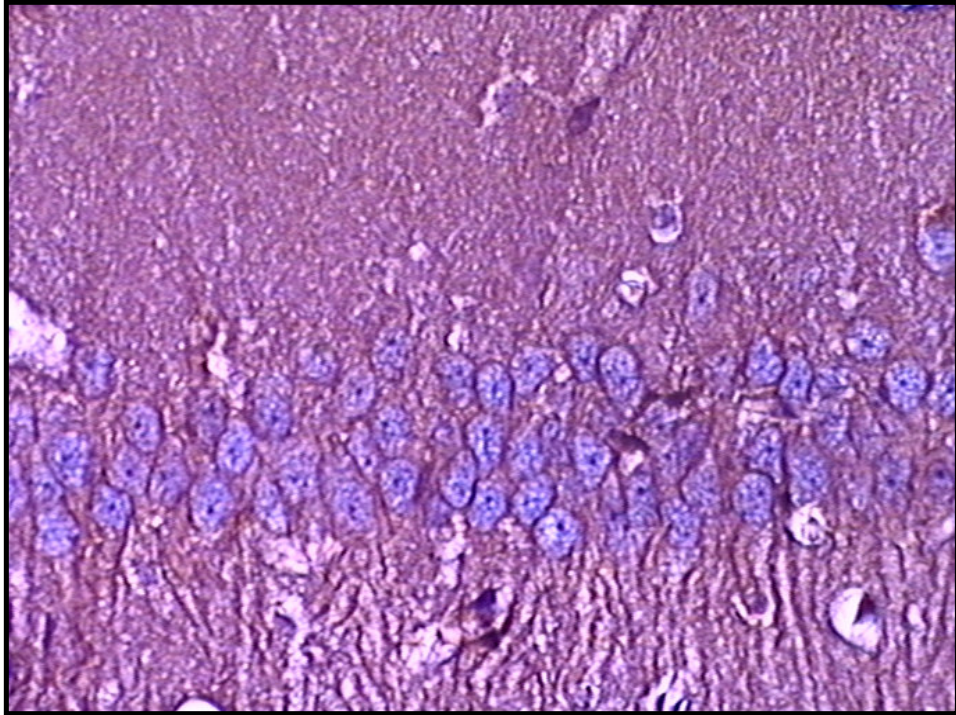
Resim 57: İR+G grubu hipokampus genel görünüm Apostain X66



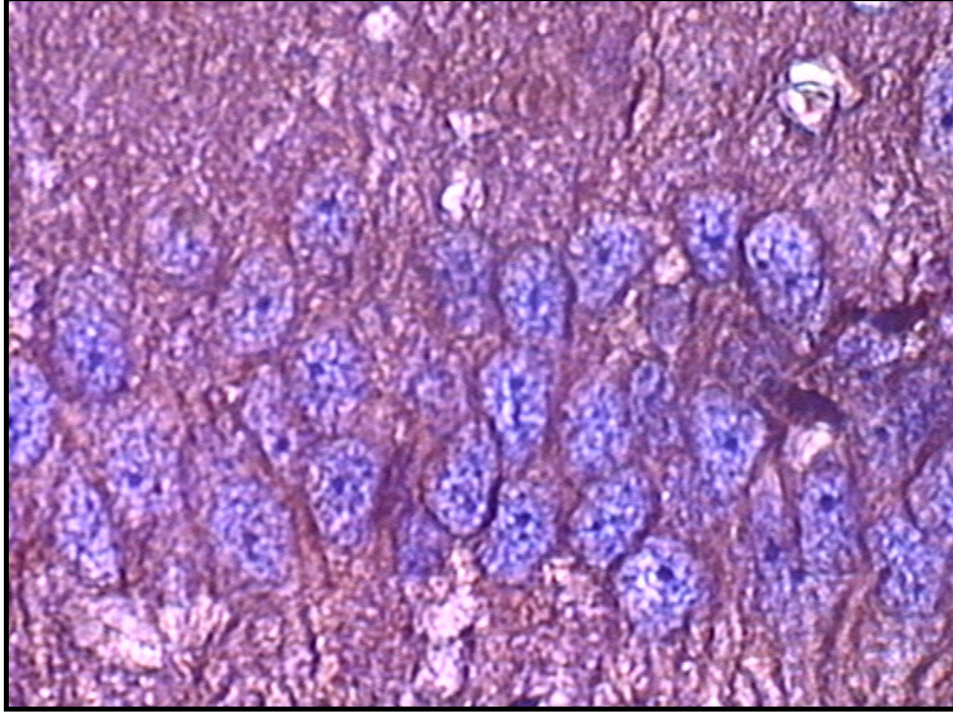
Resim 58: İR+S grubu hipokampus genel görünüm Apostain X66



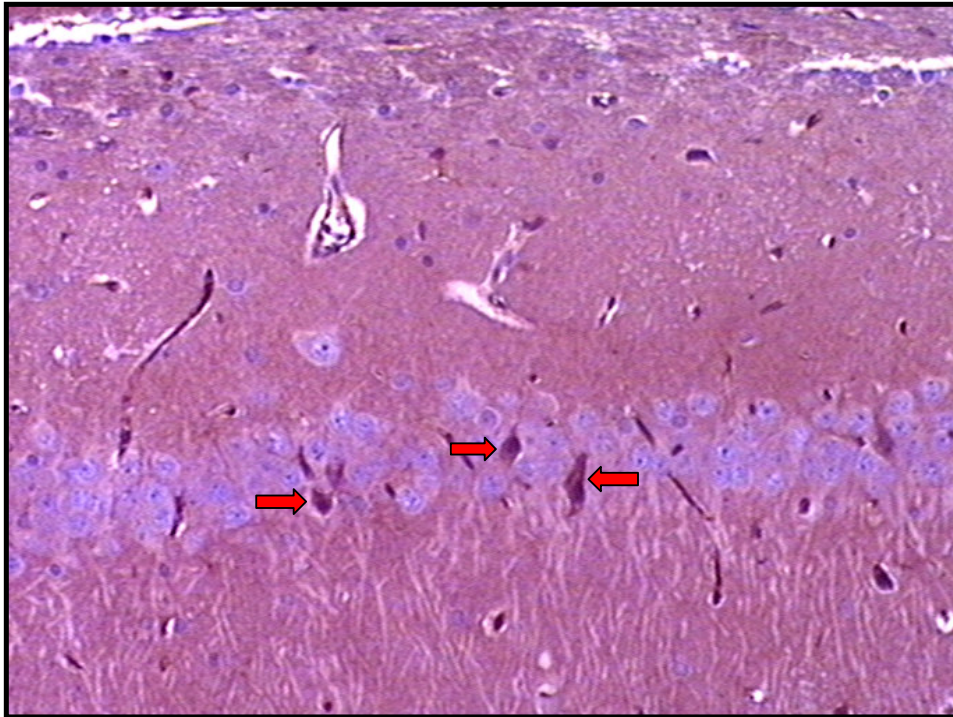
Resim 59: İR+G+S grubu hipokampus genel görünüm Apostain X66



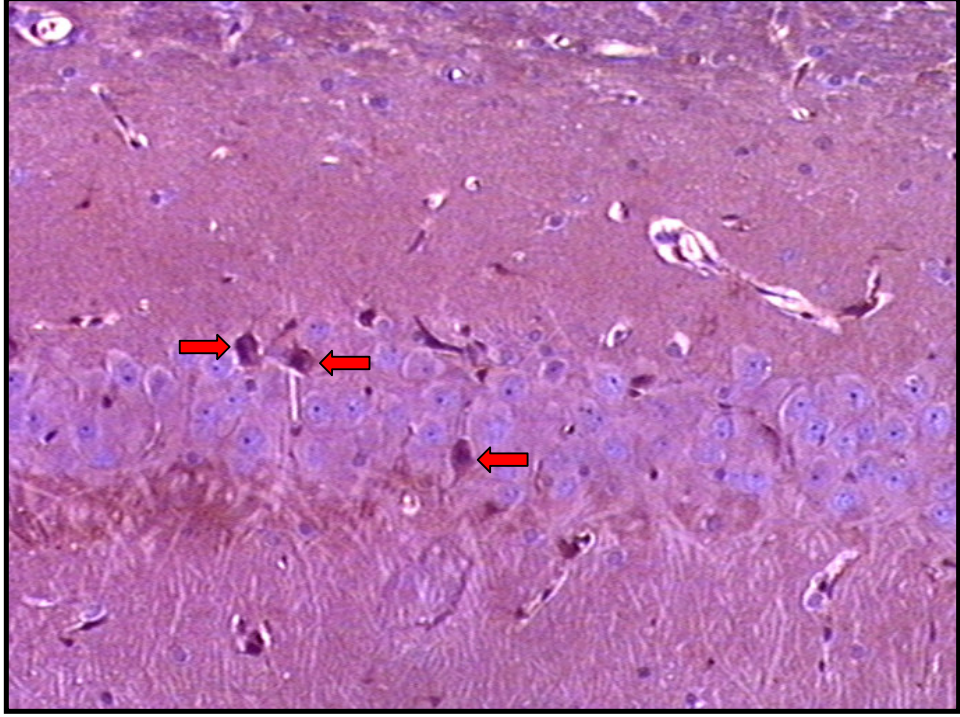
Resim 60: Sham grubu hipokampus genel görünüm Kaspaz-3 X66



Resim 61: Sham grubu hipokampus genel görünüm Kaspaz-3 X132



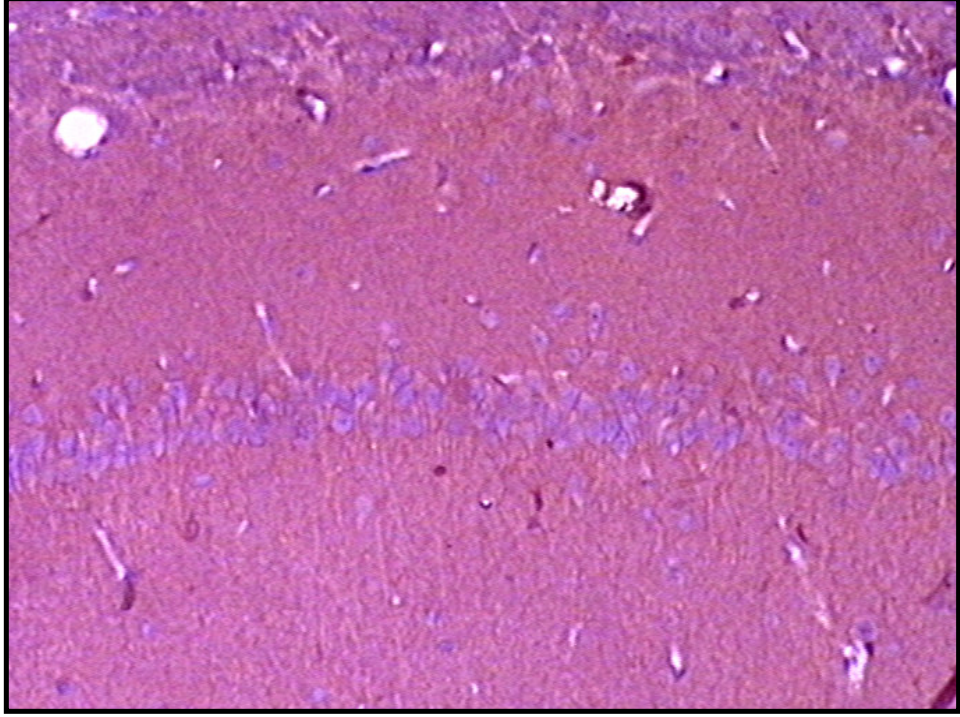
Resim 62: İR grubu hipokampusta apoptotik hücreler (→) Kaspaz-3 X33



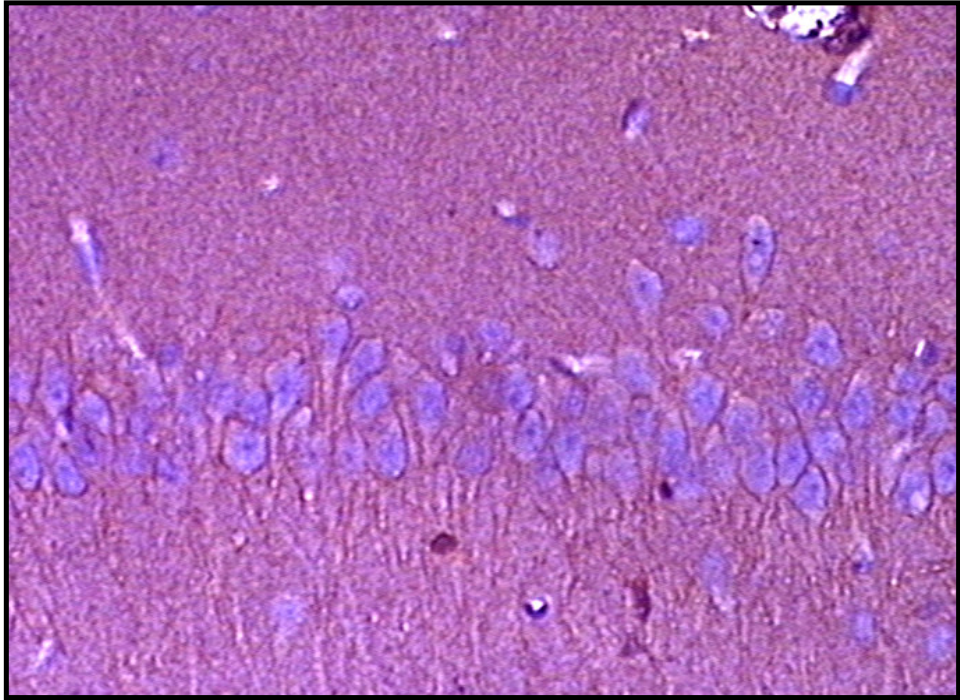
Resim 63: İR grubu hipokampusta apoptotik hücreler (→) Kaspaz-3 X33



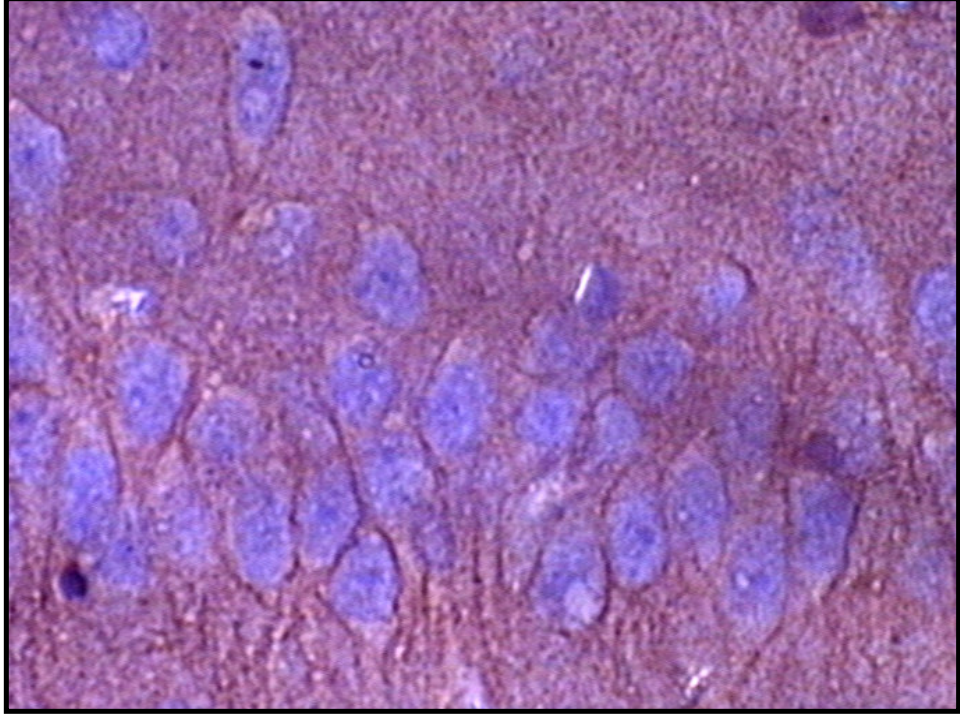
Resim 64: İR grubu hipokampusta apoptotik hücreler (→) Kaspaz-3 X66



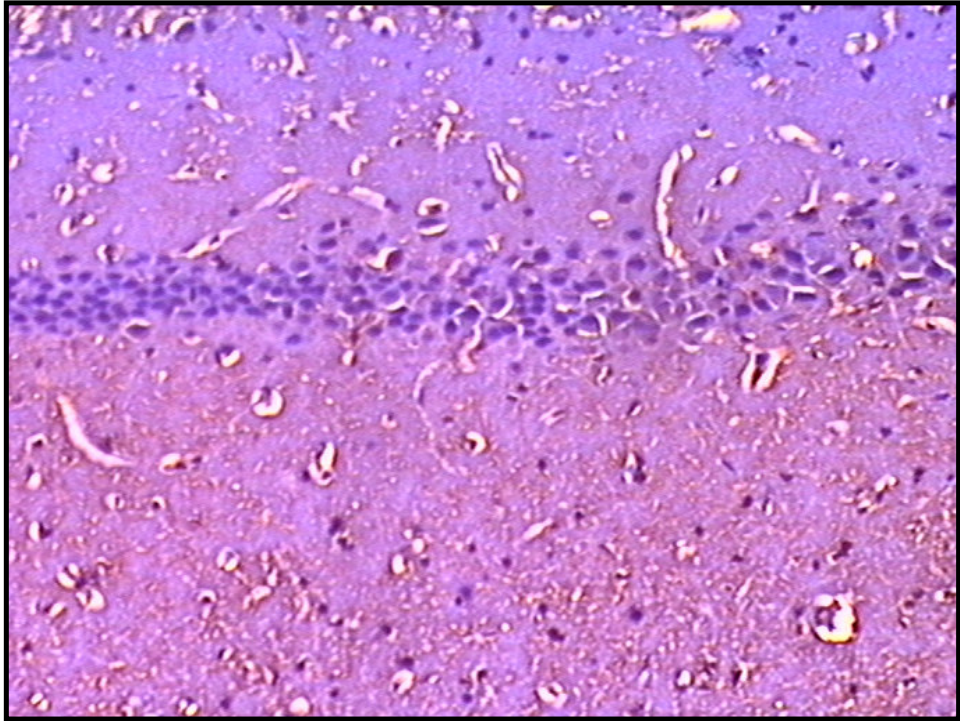
Resim 65: İR+G grubu hipokampus genel görünüm Kaspaz-3 X33



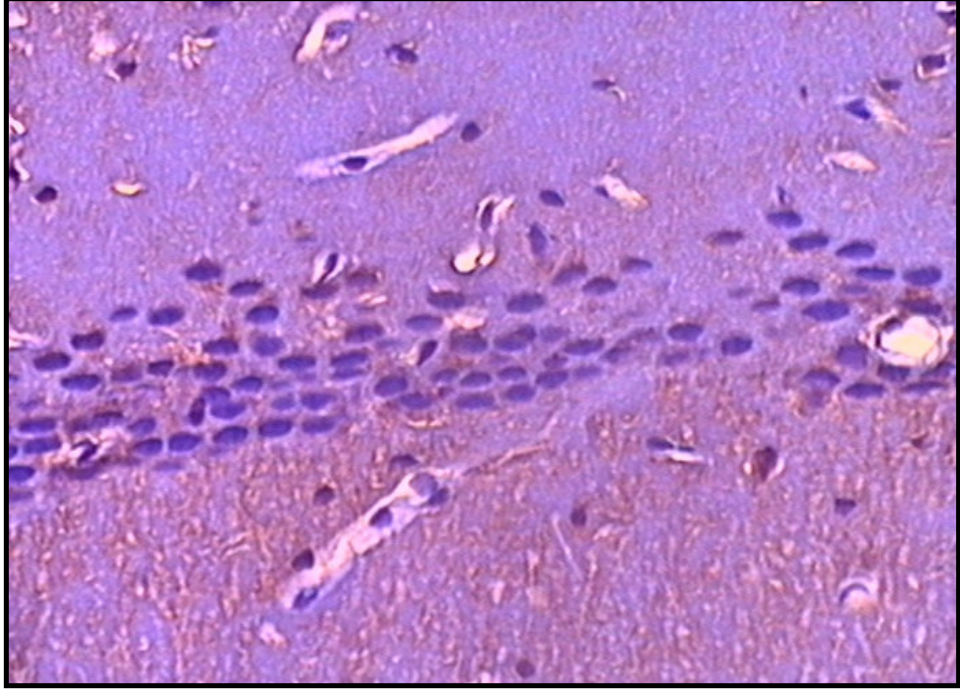
Resim 66: İR+G grubu hipokampus genel görünüm Kaspaz-3 X66



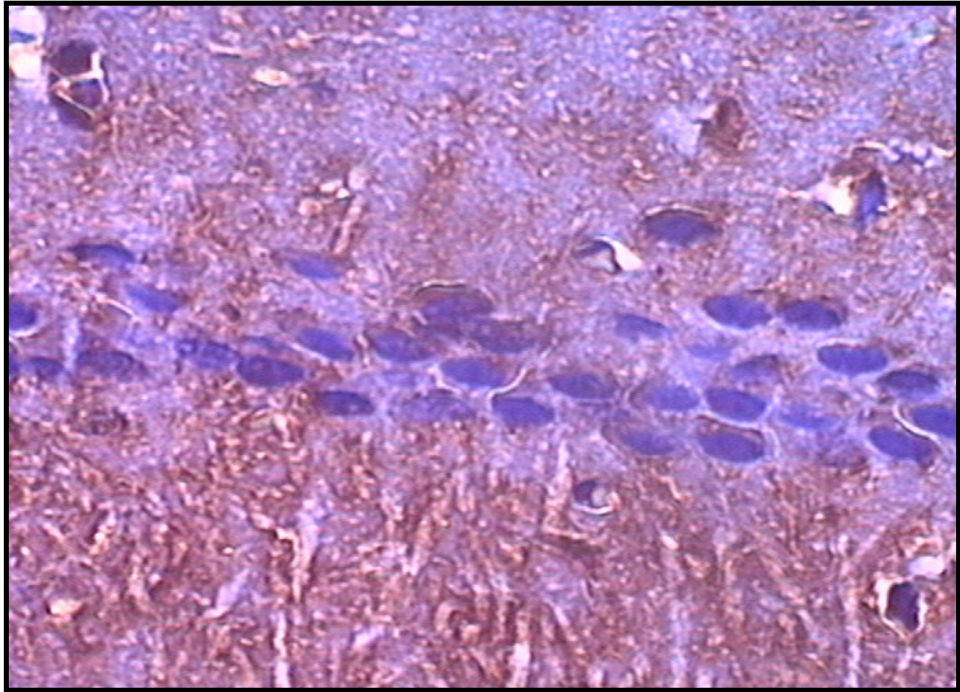
Resim 67: İR+G grubu hipokampus genel görünüm Kaspaz-3 X132



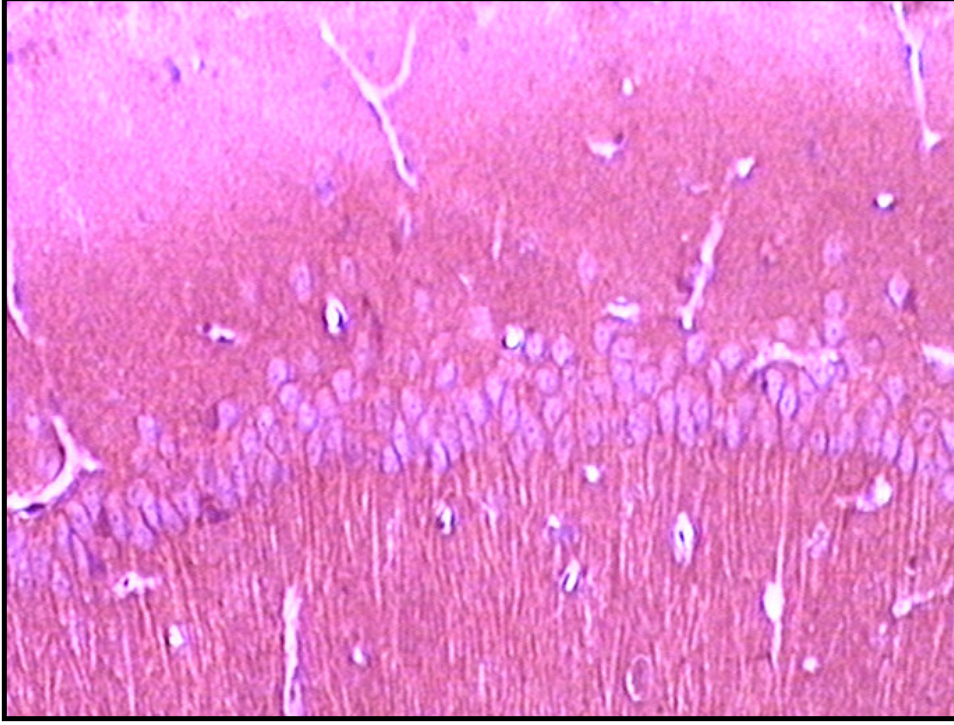
Resim 68: İR+S grubu hipokampus genel görünüm Kaspaz-3 X33



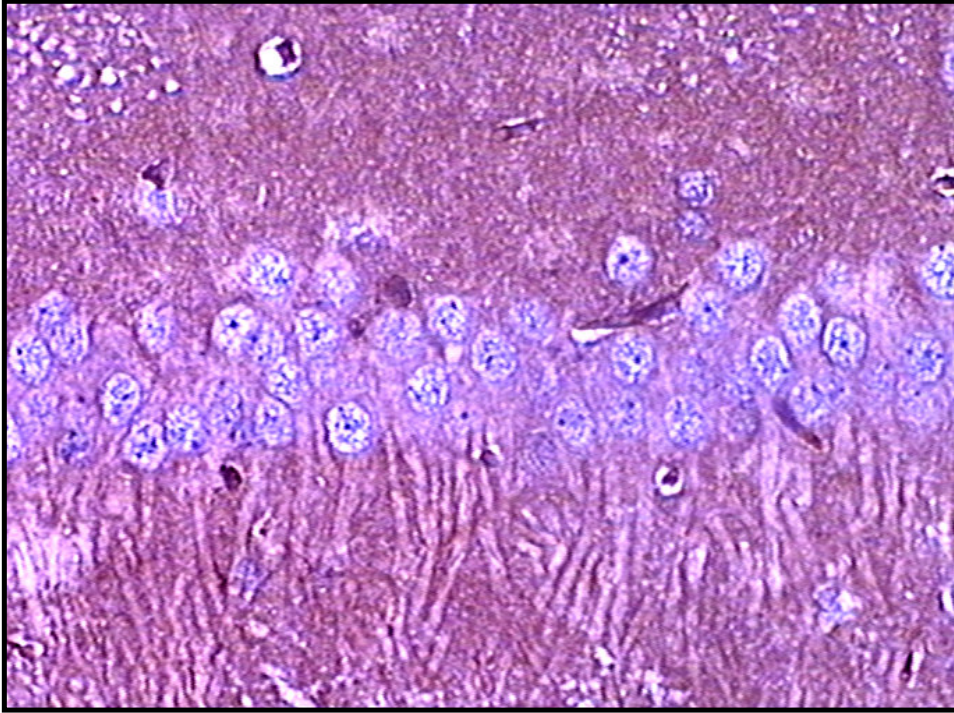
Resim 69: İR+S grubu hipokampus genel görünüm Kaspaz-3 X66



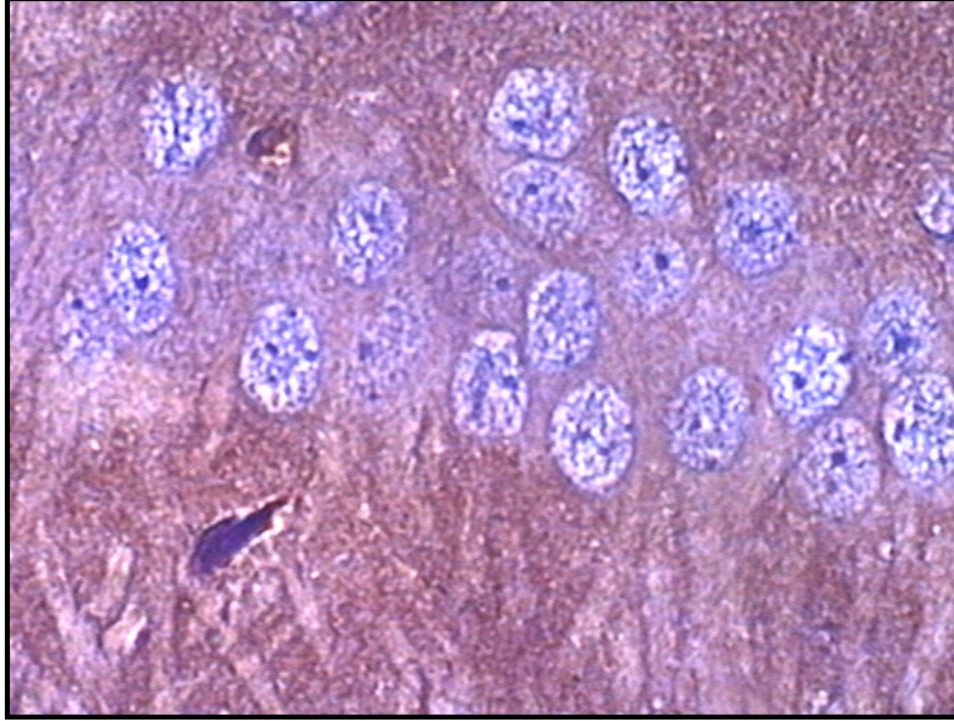
Resim 70: İR+S grubu hipokampus genel görünüm Kaspaz-3 X132



Resim 71: İR+G+S grubu hipokampus genel görünüm Kaspaz-3 X33



Resim 72: İR+G+S grubu hipokampus genel görünüm Kaspaz-3 X66



Resim 73: İR+G+S grubu hipokampus genel görünüm Kaspaz-3 X132

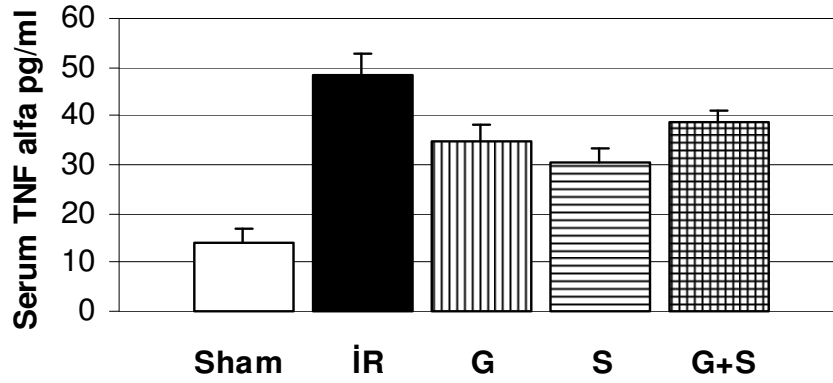
5.4. Biyokimyasal Sonuçlar

5.4.1. Rat TNF analiz sonuçları

5.4.1.1. Serum TNF- α Düzeyleri

Ortalama serum TNF- α düzeyleri, Sham grubunda $14,0 \pm 2,9$ pg/ml (Standart Hata Ortalaması: SEM); İR grubunda $48,6 \pm 4,1$ pg/ml; G grubunda $34,8 \pm 3,3$ pg/ml; S grubunda $30,2 \pm 3,0$ pg/ml; G+S grubunda ise $38,5 \pm 2,3$ pg/ml olarak bulundu.

İstatistiksel olarak karşılaştırıldığında, gruplar arasında sırası ile; İR ve Sham grubu arasında ($p < 0,001$); İR ile G grubu arasında ($p = 0,037$); İR ile S grubu arasında ($p = 0,003$) anlamlı istatistiksel fark bulundu. İR grubu karşılaştırıldığı bu gruplardan anlamlı derecede yüksekti; G+S ile Sham grubu arasında ($p < 0,001$); G ile Sham grubu arasında ($p = 0,002$); S ile Sham grubu arasında ($p = 0,021$) anlamlı istatistiksel fark vardı. Sham grubu değerleri, karşılaştırıldığı bu gruplardan anlamlı derecede düşüktü. Bu değerler serum TNF- α düzeyleri açısından incelendiğinde G ve S verilmesinin İR tedavisinde olumlu etkilerinin olduğu gözlemlendi (One Way ANOVA, Tukey) (Tablo 3).

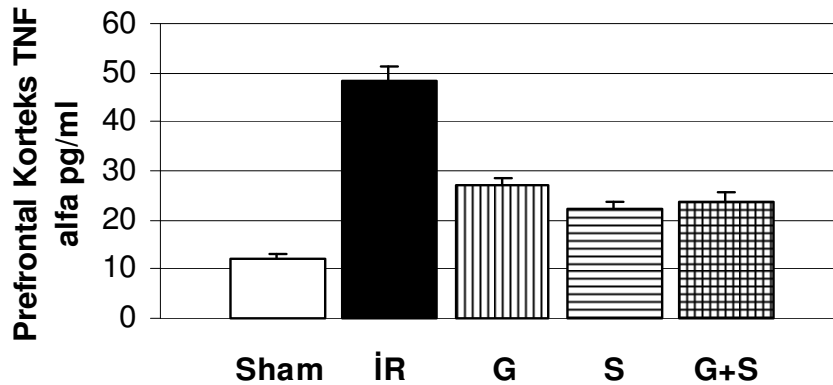


Tablo 3. Serum TNF- α düzeyleri

5.4.1.2. TNF-α Doku (Prefrontal Korteks) Düzeyleri

Ortalama Prefrontal Korteks TNF-α düzeyleri, Sham grubunda 12,2±0,6 pg/ml; İR grubunda 48,2±3,1 pg/ml; G grubunda 27,0±1,6 pg/ml, S grubunda 22,1±1,3 pg/ml; G+S grubunda ise 23,8±1,9 pg/ml olarak bulundu.

İstatistiksel olarak karşılaştırıldığında, gruplar arasında sırası ile; İR ve Sham grubu arasında ($p<0,001$); İR ile G grubu arasında ($p<0,001$), İR ile S grubu arasında ($p<0,001$); İR ile G+S grubu arasında ($p<0,001$) anlamlı istatistiksel fark bulundu. İR grubu karşılaştırıldığı bu gruplardan anlamlı derecede yüksekti. G ile Sham grubu arasında ($p<0,001$); S ile Sham grubu arasında ($p=0,025$); G+S ile Sham grubu arasında ($p=0,007$) anlamlı istatistiksel fark vardı. Sham grubu değerleri, karşılaştırıldığı bu gruplardan anlamlı derecede düşüktü. Bu değerler prefrontal korteks TNF-α düzeyleri açısından incelendiğinde G, S ve G+S verilmesinin İR tedavisinde olumlu etkileri olduğu gözlemlendi (One Way ANOVA, Tukey) (Tablo 4).

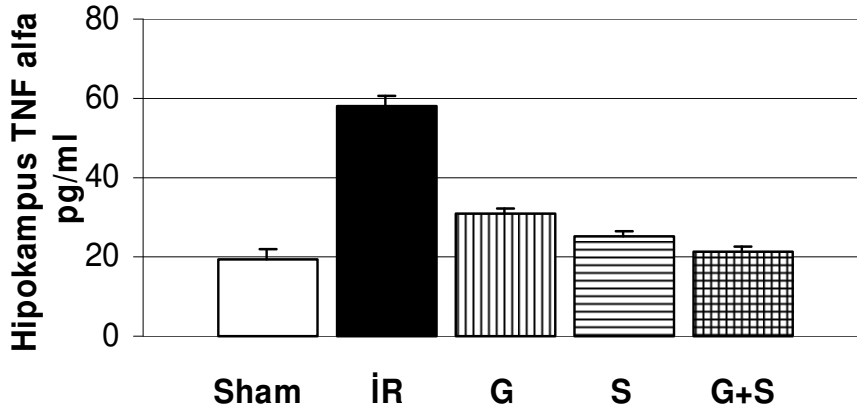


Tablo 4. Prefrontal Korteks TNF- α düzeyleri

5.4.1.3. TNF- α Doku (Hipokampus) Düzeyleri

Ortalama Hipokampus TNF- α düzeyleri, Sham grubunda $19,6 \pm 2,5$ pg/ml; İR grubunda $58,2 \pm 2,6$ pg/ml; G grubunda $30,8 \pm 1,1$ pg/ml; S grubunda $25,1 \pm 1,4$ pg/ml; G+S grubunda ise $21,2 \pm 1,2$ pg/ml olarak bulundu.

İstatistiksel olarak karşılaştırıldığında, gruplar arasında sırası ile; İR ve Sham grubu arasında ($p < 0,001$); İR ile G grubu arasında ($p < 0,001$), İR ile S grubu arasında ($p < 0,001$); İR ile G+S grubu arasında ($p < 0,001$) anlamlı istatistiksel fark bulundu. İR grubu karşılaştırıldığı bu gruplardan anlamlı derecede yüksekti. G ile Sham grubu arasında ($p = 0,003$) anlamlı istatistiksel fark vardı. Sham grubu değerleri, karşılaştırıldığı bu gruptan anlamlı derecede düşüktü. G ile G+S grubu arasında ($p = 0,006$) anlamlı istatistiksel fark vardı. G grubu değerleri, karşılaştırıldığı bu gruptan anlamlı derecede yüksekti. Bu değerler hipokampus TNF- α düzeyleri açısından incelendiğinde G, S ve G+S verilmesinin İR tedavisinde olumlu etkilerinin olduğu gözlemlendi (One Way ANOVA, Tukey) (Tablo 5).



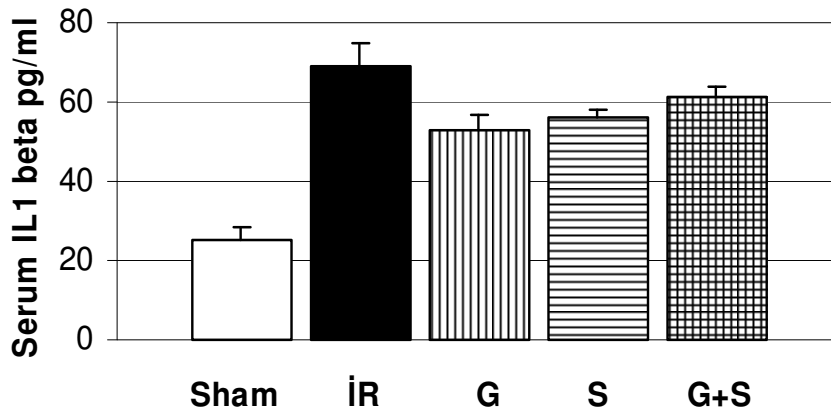
Tablo 5. Hipokampus TNF- α düzeyleri

5.4.2. IL-1 β analiz sonuçları

5.4.2.1. Serum IL-1 β Düzeyleri

Ortalama serum IL-1 β düzeyleri, Sham grubunda $25,2 \pm 3,0$ pg/ml; İR grubunda $68,8 \pm 5,8$ pg/ml; G grubunda $53,1 \pm 3,6$ pg/ml, S grubunda $56,2 \pm 1,8$ pg/ml; G+S grubunda ise $61,5 \pm 2,2$ pg/ml olarak bulundu.

İstatistiksel olarak karşılaştırıldığında, gruplar arasında sırası ile; İR ve Sham grubu arasında ($p<0,001$); İR ile G grubu arasında ($p=0,034$) anlamlı istatistiksel fark bulundu. İR grubu karşılaştırıldığı bu gruplardan anlamlı derecede yüksekti. G ile Sham grubu arasında ($p<0,001$); S ile Sham grubu arasında ($p<0,001$); G+S ile Sham grubu arasında ($p<0,001$) anlamlı istatistiksel fark vardı. Sham grubu değerleri, karşılaştırıldığı bu gruplardan anlamlı derecede düşüktü. Bu değerler serum IL-1 β düzeyleri açısından incelendiğinde G verilmesinin İR tedavisinde olumlu etkilerinin olduğu gözlemlendi (One Way ANOVA, Tukey) (Tablo 6).

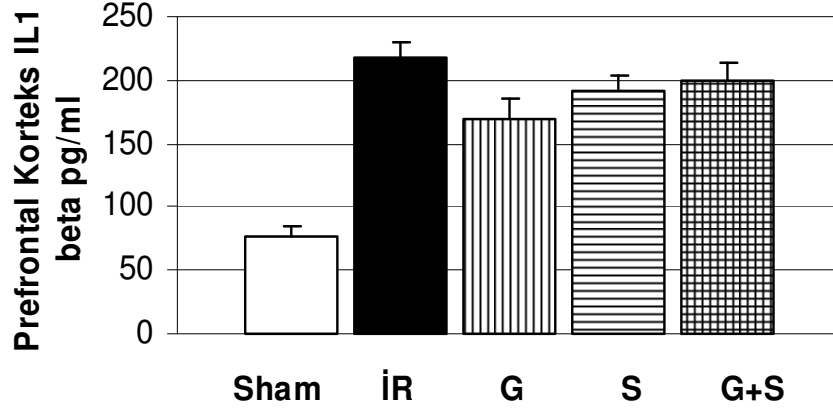


Tablo 6. Serum IL-1 β düzeyleri

5.4.2.2. IL-1 β Doku (Prefrontal Korteks) Düzeyleri

Ortalama Prefrontal Korteks IL-1 β düzeyleri, Sham grubunda $77,0\pm7,6$ pg/ml; İR grubunda $218,5\pm10,4$ pg/ml; G grubunda $170,0\pm15,6$ pg/ml, S grubunda $191,5\pm11,4$ pg/ml; G+S grubunda ise $200,2\pm13,1$ pg/ml olarak bulundu.

İstatistiksel olarak karşılaştırıldığında, gruplar arasında sırası ile; İR ve Sham grubu arasında ($p<0,001$) anlamlı istatistiksel fark bulundu. İR grubu karşılaştırıldığı bu gruptan anlamlı derecede yüksekti. G ile Sham grubu arasında ($p<0,001$); S ile Sham grubu arasında ($p<0,001$); G+S ile Sham grubu arasında ($p<0,001$) anlamlı istatistiksel fark vardı. Sham grubu değerleri, karşılaştırıldığı bu gruplardan anlamlı derecede düşüktü. Tedavi gruplarının her birinin prefrontal korteks IL-1 β düzeyleri iskemi grubundan düşük olmakla birlikte aralarında anlamlı istatistiksel fark gözlenmedi (One Way ANOVA, Tukey) (Tablo 7).

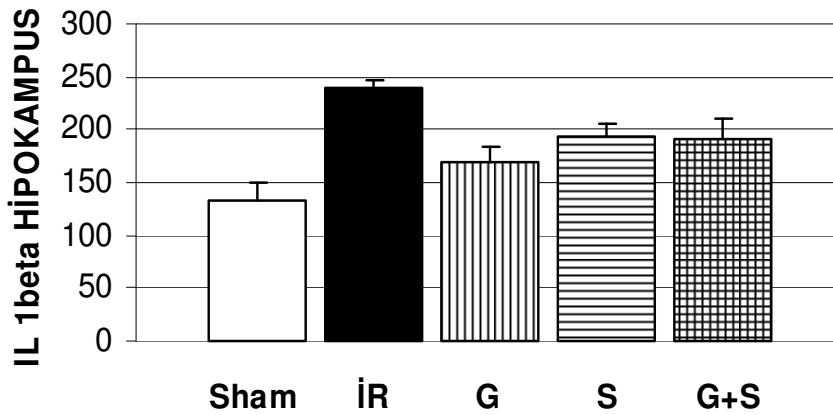


Tablo 7. Prefrontal Korteks IL-1 β düzeyleri

5.4.2.3. IL-1 β Doku (Hipokampus) Düzeyleri

Ortalama Hipokampus IL-1 β düzeyleri, Sham grubunda 134,1 \pm 15,9 pg/ml; İR grubunda 238,8 \pm 8,6 pg/ml; G grubunda 168,5 \pm 14,2 pg/ml, S grubunda 193,4 \pm 12,5 pg/ml; G+S grubunda ise 191,2 \pm 20,0 pg/ml olarak bulundu.

İstatistiksel olarak karşılaştırıldığında, gruplar arasında sırası ile; İR ve Sham grubu arasında ($p < 0,001$); İR ile G grubu arasında ($p = 0,014$), anlamlı istatistiksel fark bulundu. İR grubu karşılaştırıldığı bu gruplardan anlamlı derecede yüksekti. Bu değerler hipokampus IL-1 β düzeyleri açısından incelendiğinde G verilmesinin İR tedavisinde olumlu etkilerinin olduğu gözlemlendi (One Way ANOVA, Tukey) (Tablo 8).



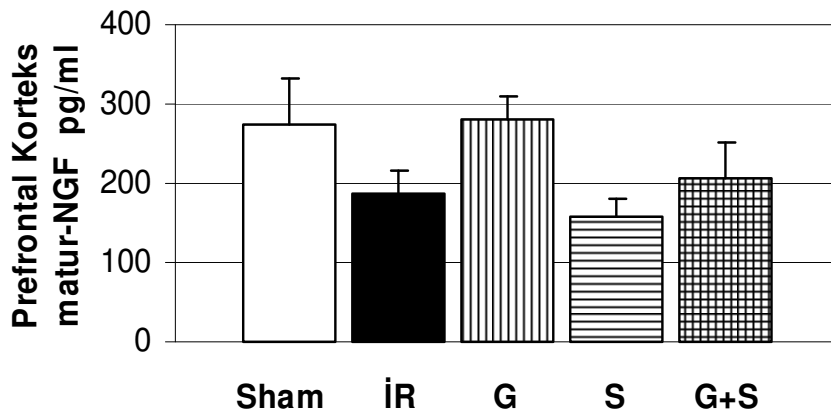
Tablo 8. Hipokampus IL-1 β düzeyleri

5.4.3. Rat NGF analiz sonuçları

5.4.3.1. matur-NGF Doku (Prefrontal Korteks) Düzeyleri

Ortalama Prefrontal Korteks matur-NGF düzeyleri, Sham grubunda $275,0 \pm 56,5$ pg/ml; İR grubunda $187,0 \pm 27,5$ pg/ml; G grubunda $281,4 \pm 28,1$ pg/ml; S grubunda $158,0 \pm 22,0$ pg/ml; G+S grubunda ise $205,7 \pm 47,2$ pg/ml olarak bulundu.

İstatistiksel olarak karşılaştırıldığında, gruplar arasında farklılık olmadığı bulundu (One Way ANOVA, Tukey) (Tablo 9).

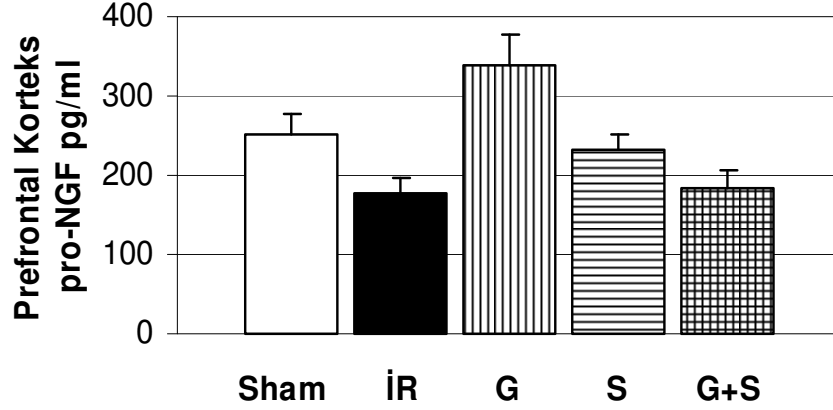


Tablo 9. Prefrontal Korteks matur-NGF düzeyleri

5.4.3.2. pro-NGF Doku (Prefrontal Korteks) Düzeyleri

Ortalama Prefrontal Korteks pro-NGF düzeyleri, Sham grubunda $250,4 \pm 27,2$ pg/ml; İR grubunda $176,5 \pm 18,9$ pg/ml; G grubunda $337,2 \pm 40,9$ pg/ml; S grubunda $232,4 \pm 18,0$ pg/ml; G+S grubunda ise $185,2 \pm 22,2$ pg/ml olarak bulundu.

İstatistiksel olarak karşılaştırıldığında, gruplar arasında sırası ile; İR ile G grubu arasında ($p=0,002$) anlamlı istatistiksel fark bulundu. İR grubu karşılaştırıldığı bu gruptan anlamlı derecede düşüktü; G ile G+S grubu arasında ($p=0,003$) anlamlı istatistiksel fark vardı. G grubu değerleri, karşılaştırıldığı bu gruptan anlamlı derecede yüksekti (One Way ANOVA, Tukey) (Tablo 10).

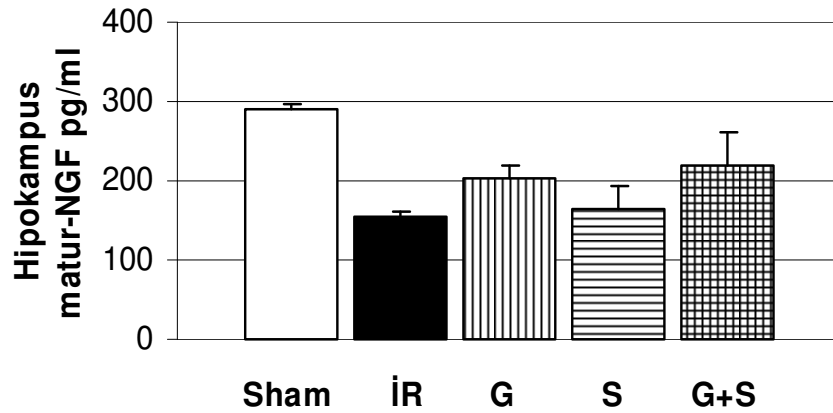


Tablo 10. Prefrontal Korteks pro-NGF düzeyleri

5.4.3.3. matur-NGF Doku (Hipokampus) Düzeyleri

Ortalama Hipokampus matur-NGF düzeyleri, Sham grubunda 290,0±6,8 pg/ml; İR grubunda 154,5±5,7 pg/ml; G grubunda 204,0±16,9 pg/ml; S grubunda 166,0±26,9 pg/ml; G+S grubunda ise 218,0±43,8 pg/ml olarak bulundu.

İstatistiksel olarak karşılaştırıldığında, gruplar arasında sırası ile; İR ve Sham grubu arasında ($p=0,014$) anlamlı istatistiksel fark bulundu. İR grubu karşılaştırıldığı bu gruptan anlamlı derecede düşüktü; S ile Sham grubu arasında ($p=0,029$) anlamlı istatistiksel fark vardı. Sham grubu değerleri, karşılaştırıldığı bu gruptan anlamlı derecede yüksekti (One Way ANOVA, Tukey) (Tablo 11).

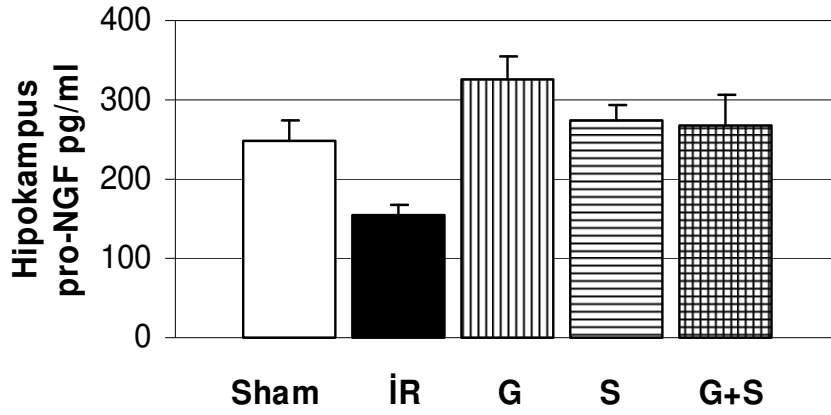


Tablo 11. Hipokampus matur-NGF düzeyleri

5.4.3.4. pro-NGF Doku (Hipokampus) Düzeyleri

Ortalama Hipokampus pro-NGF düzeyleri, Sham grubunda $248,0 \pm 25,3$ pg/ml; İR grubunda $155,0 \pm 12,7$ pg/ml; G grubunda $326,0 \pm 30,0$ pg/ml; S grubunda $274,2 \pm 18,3$ pg/ml; G+S grubunda ise $267,1 \pm 38,3$ pg/ml olarak bulundu.

İstatistiksel olarak karşılaştırıldığında, gruplar arasında sırası ile; İR ve G grubu arasında ($p < 0,001$); İR ile S grubu arasında ($p = 0,024$); İR ile G+S grubu arasında ($p = 0,038$) anlamlı istatistiksel fark bulundu. İR grubu karşılaştırıldığı bu gruplardan anlamlı derecede düşüktü (One Way ANOVA, Tukey) (Tablo 12).



Tablo 12. Hipokampus pro-NGF düzeyleri

6. TARTIŞMA

Serebral iskemi fizyopatolojisinde yer alan eksitotoksisite ve aşırı kalsiyum yüklenmesi, serbest radikal oluşumu ve lipid peroksidasyonu gibi mekanizmalar birbirleriyle karmaşık bir ilişki içindedir ve iskemi sonrası reperfüzyon ise ortaya çıkan hasarın daha da artmasına neden olmaktadır. Serebral iskemi-reperfüzyon hasar oluşumunu engellemek ve oluşan hasarı ortadan kaldırmak amacıyla glutamat reseptör antagonistleri, kalsiyum kanal blokerleri, membran stabilizatörleri, serbest radikal gidericileri, antiödem tedavi, anti-inflamatuar ve antiagregan ajanlar gibi pek çok etken kullanılmıştır (3, 4, 5, 30, 31, 34, 35, 38, 39, 49, 101).

Yapılan çalışmalarda serebral iskemi-reperfüzyon modeli oluşturmak için sıklıkla iki taraflı arteria carotis communis ligasyonu ve orta serebral arter ligasyonu kullanılmaktadır (46, 47, 113, 114, 116, 122, 125, 126, 128, 142, 143, 144). Ancak çalışmamızda, tedavi amaçlı verilen Ginkgo biloba ekstresi ve Selenyum uygulamalarının iskemi oluşturulduktan sonra 14 gün süre ile verilmesinin planlanması ve deneklerin bu süre boyunca yaşamını devam ettirmesi gerektiğinden tek taraflı carotis arter ligasyonu tercih edildi.

Ginkgo biloba ekstresi ve Selenyum'un nöronlarda iskemi-reperfüzyon hasarı üzerine koruyucu etkisini gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar Ginkgo biloba ekstresinin peroksid radikal çöpçüsü, süperoksid dismutaz aktivitesi ve superoksid anyonlarını ortadan kaldırarak ve nitrik oksid oluşumunu inhibe ederek antioksidan etkileri olduğunu göstermiştir. Kan akımını arttırarak serebral iskemide kortikal infarkt hacmini azalttıkları saptanmıştır. Sitokrom-c salınımını azalttıkları, bcl-2 regülasyonunu arttırdıkları, kaspaz-3 aktivasyonunu inhibe ederek antiapoptotik etki gösterdikleri bildirilmiştir (8, 80, 116, 120, 121, 122, 125, 126, 128, 129). Selenyumun ise glutatyon benzeri etki ile serbest radikal ve peroksid oluşumunu inhibe ederek nöronlar üzerinde antioksidan etki gösterdiği bildirilmiştir. Glutamat salınımı ve kalsiyum artışına bağlı meydana gelen oksidatif stresi glial aktivasyon artışına neden olarak doku hasarını azalttığı görülmüştür (10, 11, 137, 138, 145, 146).

Yapılan çalışmaların etkenlerin koruyucu etkileri üzerine olduğu görülmüş, tedavi edici etkilerini inceleyen ya da bu iki etkeni birbirleri ile karşılaştıran bir araştırmaya literatürde rastlanmamıştır.

Serebral İR modeli ile yapılan çalışmalarda histopatolojik olarak nöronlarda belirgin büzülmeler, hücre ve çekirdek sınırlarında düzensizlikler, perinöral ve perikapiller ödem saptanmıştır. Özellikle serebral korteks ve hipokampusta nöron sayısının azaldığı gözlenmiş ve iskemiye bağlı infarkt alanları izlenmiştir (125, 126, 147, 148, 149). Shang ve arkadaşları İR uygulanan sıçanlarda hipokampus ve serebral kortekste nöron kaybı, nöronlarda şişme, nükleer büzülme veya kaybolma, nöronofaji ve Nissl cisimciklerinin yoğunluğunda azalma gibi patolojik değişiklikler saptamışlardır. İR ile nöron sayısında hipokampus CA1'de yaklaşık % 32, serebral kortekste ise yaklaşık % 38 azalma gözlenmiştir (150). Çalışmamızda biz de benzer şekilde İR modeli oluşturulan deneklerin crezyl-violet ile boyanan kesitlerinde nöronlarda belirgin büzülme, hücre ve çekirdek sınırlarında düzensizlik, bazı hücrelerde çekirdek kromatininde yoğunluk, nöron sitoplazmasında dansite artışı, perinöral ve perikapiller ödem gözledik. S verilen tedavi grubunda nöronlarda büzülmeler seyrek olarak izlense de, G ve G+S verilen tedavi gruplarında nöron ve kapiller yapısı ile glial hücre dağılımlarının sham grubuna benzer şekilde normal olduğu gözledik. Hücre sayımı çalışmalarımızda hem prefrontal korteks, hem de hipokampus kesitlerinde hücre sayılarını İR grubunda sham grubundan anlamlı derecede düşük olduğunu, tedavi gruplarında ise İR uygulanmış gruba kıyasla sham değerlerine doğru yaklaşma olduğunu saptadık. Prefrontal kortekste hücre sayılarını G ve G+S verilen tedavi gruplarının daha fazla yükselttiği gözlene de bu iki grup arasındaki yükselmeler istatistiksel olarak birbirine üstünlük göstermemektedir. Hücre sayıları açısından incelediğimiz hipokampus kesitlerinde ise G+S verilen tedavi grubunun G ve S verilen tedavi gruplarından istatistiksel olarak anlamlı derecede hücre sayısını yükselttiği, G ve S verilen tedavi gruplarının ise birbirlerine üstünlüğünün olmadığını gözledik.

Şimdiye kadar yapılan serebral İR hasarı oluşturulmuş deney modellerinde apoptoz belirleyicisi olarak TUNEL yöntemi ve kaspaz-3 immunreaktivitesi çalışılmış ve yapılan boyamalarda apoptoz ile uyumlu TUNEL pozitif ve kaspaz-3 pozitif hücreler gözlenmiştir (44, 45, 46, 47, 110, 112, 113, 114, 115, 116, 128, 151,152). Xia ve arkadaşları yaptıkları çalışmada serebral İR uygulanmış grupta kontrol grubuna göre hem nöron, hem de glial hücrelerde TUNEL pozitif apoptotik hücrelerin ve kaspaz-3 aktif hücrelerin sayısında anlamlı artış gözlenmiştir. Serebral infarkt

alanlarının astrositler için spesifik bir marker olan GFAP (glial fibriler asidik protein) ile boyanmadığını ortaya koymuşlardır (153). Noto ve arkadaşları yaptıkları çalışmada serebral İR uygulanmış grupta kaudat putamen ile kortekste iskemik merkez ve iskemik penumbra TUNEL pozitif hücrelerin ve sitokrom-c immun pozitif hücrelerin bulunduğunu gözlemişlerdir (154). Li ve arkadaşları İR uygulanan grupta priform korteks ve parietal kortekste ve hipokampus CA1, CA3, CA4 alanlarında TUNEL ve kaspaz-3 immun pozitif hücreler bulmuştur. İR grubunda korteks ve hipokampusda bax düzeylerinin arttığı, bcl düzeylerinin ise anlamlı değişiklik göstermediği saptanmıştır (155). Sharma ve arkadaşları İR sonrası Western blot ile saptanan sitokrom-c, kaspaz-3 ve PARP seviyelerinin yükseldiğini gözlemişlerdir (156). Harvey ve arkadaşları iskemi sonrası korteks ve striatumda daha koyu boyanan kaspaz-3 immun pozitif hücreler saptamışlardır (157).

TUNEL, DNA kırığı olan tüm hücreleri boyamaktadır. Hem nekrotik, hem de apoptotik hücreleri boyadığından sadece apoptotik hücrelerin belirlenmesi amacı ile yapılan çalışmalarda güvenilirliği yetersizdir. Bu nedenle biz çalışmamızda apoptoz belirleyicisi olan apostain boyasını ve kaspaz-3 işaretlemeyi tercih ettik. Çalışmamızda sham grubunda hem prefrontal korteks, hem de hipokampusta apostain ve kaspaz-3 ile boyanan kesitlerde apoptoza giden nöronlara rastlanmazken, İR oluşturulan deneklerde ise apostain ve kaspaz-3 ile boyanan kesitlerde apoptoza giden nöronlar belirgin olarak işaretlendi. G, S ve G+S verilen tedavi gruplarında ise sham grubuna benzer şekilde apostain ve kaspaz-3 ile boyanan hücrelere rastlanmadığı ve tedavinin olumlu etki gösterdiği gözlemlendi.

TNF- α ve IL-1 β salınımı iskemide inflamatuvar reaksiyonu artırırken, lenfosit ve monositlerin daha etkili adezyon ve proliferasyonuna neden olmaktadır (55). İR modeli uygulanan çalışmalarda TNF- α ve IL-1 β düzeylerinin arttığı, iskemiye azaltan ajanların kullanılması halinde ise yükselen düzeylerini sham düzeylerine doğru yaklaştığı gözlenmiştir (67, 68, 69, 70, 86, 87, 88). Çalışmamızda benzer şekilde TNF- α ve IL-1 β düzeyleri hem doku, hem serum örneklerinde İR grubunda sham grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu bulgular deneysel model olarak İR oluşturulan grupta deneysel iskeminin başarıyla gerçekleştiğinin göstergesi olarak kabul edilebilir. Sitokin düzeyleri açısından incelediğimiz ve sağaltım uyguladığımız gruplarda farklı derecelerde olmak üzere sadece İR uygulanmış gruba

kıyasla sham değerlerine yaklaşma söz konusudur. İR değerlerinden sham düzeylerine yaklaşma TNF- α ve IL-1 β sonuçları açısından incelendiğinde hem serum, hem de prefrontal korteks ve hipokampus doku düzeylerinde azalma gözlenmektedir. Her üç incelemede de bu düşüş istatistiksel olarak anlamlıdır. Ancak TNF- α ve IL-1 β açısından baktığımızda G, S ve G+S gruplarının birbirlerine üstünlüğünün olmadığı görülmektedir. Her ne kadar S tedavisinin serumda, prefrontal korteks ve hipokampus doku örneğinde TNF- α düzeylerini daha fazla düşürdüğü, G tedavisinin ise serumda, prefrontal korteks ve hipokampus doku örneklerinde IL-1 β düzeylerini daha fazla düşürdüğü gözlenirse de bu durum istatistiksel olarak birbirlerine üstünlük oluşturmamaktadır.

NGF'nin nöronların yaşamsal, differansiasyon ve fonksiyonel aktivitelerinden sorumlu olduğu ve dokularında hasar onarımı ve nöral rejenerasyonda önemli rol oynadığı çalışmalarla gösterilmiştir (84, 85, 158, 159, 160). Pro-nörotropinlerin p75 reseptörlerine, matür nörotropinlerin ise TrkA reseptörlerine daha yüksek afinite ile bağlandıkları saptanmıştır. Pro-NGF hücreyi ölüme götüren yolağa saptırırken, matür NGF ise hücrenin yaşamını devam ettirici yönde hareket etmesini sağlamaktadır (78, 79).

NGF tayini sırasında kullandığımız immunassay yönteminde analizi yapılacak doku örneklerinin asitle işleme alınması, proteolize neden olur, bu da matür NGF'nin ölçülebilir seviyelerde tanımlanmasına olanak sağlar. Biz bu çalışmada yöntemler bölümünde tanımlandığı gibi doku örneklerini –proNGF düzeylerinin (asitsiz bakı) saptanmasının yanı sıra- asitle işleme olarak matür NGF düzeylerini de saptadık. Böylece, prefrontal korteks ve hipokampus doku örneklerinin ayrı ayrı pro ve matür NGF düzeyleri tesbit edildi.

Prefrontal korteks matür NGF düzeyleri açısından incelendiğinde tedavi grupları değerlerinin sham grubuna yaklaştığı, hatta G verilen grubun sham grubu matür NGF düzeylerine çok yakın olduğu gözlenmiş ancak gruplar arasında anlamlı istatistiksel fark bulunamamıştır. Öte yandan hücreyi daha sıklıkla “ölüm yolağına götüren” ve p75 reseptörlerine yüksek afinite ile bağlandığını bildiğimiz pro-NGF düzeylerinin, tedavi gruplarında birbirleri ile aralarında anlamlı istatistiksel fark olmadığı saptanmıştır. Pro-NGF düzeylerinin yüksek olması her ne kadar hücrenin ölüm yolağına kaydığını düşündürürse de proNGF düzeylerinin tamamının tek yolakla işlev

görmediği bilinmektedir. Bizim oluşmuş matür NGF'yi saptamak için kullandığımız proteoliz bir yandan da organizmada devam etmekte ve proNGF'nin matür NGF'ye dönüşümünü sağlamaktadır. Bu açıdan bakılırsa, bizim modelimizde nöronların yaşamının devam edebilmesi açısından hücrenin yaşam yolağına sapması istenmektedir. Çalışmamızda prefrontal korteks proNGF düzeylerini tedavi verdiğimiz grupların her biri yükseltmiştir. İR grubuna göre anlamlı istatistiksel yükseklik G grubundadır. Verilen bu tedavi ile nöronların stabilitesi açısından devamlılığı sağlayıcı matür NGF'ye dönüşümünü karşılaştırdığımızda yine prefrontal korteks matür NGF düzeylerinin G verilen grupta yüksek olduğunu gözlenmektedir.

Çalışmamızdaki hipokampus matür NGF düzeyleri incelendiğinde sham grubunun İR grubuna göre anlamlı istatistiksel yüksekliğini gözluyoruz. G ve G+S verilen tedavi gruplarının sham düzeyine yaklaştığını ve İR grubu seviyelerini geçtiğini gözlesek de anlamlı farklılık saptanmamıştır. S grubunun ise matür NGF'ye dönüşümüne yol açmak açısından, diğer tedavi gruplarına göre daha geride kaldığı gözlenmektedir. ProNGF düzeylerini hipokampus dokusunda incelediğimizde her bir tedavi grubu proNGF düzeyleri açısından sham grubu düzeylerine yaklaşmıştır. İR grubu proNGF düzeylerinin tedavi gruplarının her birinden anlamlı istatistiksel düşüş olduğunu görüyoruz. Diğer bir deyişle tedavi verilen gruplarda bir yandan p75 reseptörlerine bağlanma ve hasarlı hücrelerin ölüme götürülmesi hızlanmışken diğer yanda onarılabilecek ya da sağlam hücrelerin matür NGF'ye dönüşümü de hızlanmıştır yorumu yapılabilir. İstatistiksel olarak anlamlılık olmasa da bu yolda da G tedavisinin daha etkili olduğu düşünülebilir.

Biyokimyasal açıdan bakıldığında G ve S verilen tedavi grubunun birbirlerine üstünlüğü olmadığı, kombine verilen tedavi grubunun da tek tek G ve S verilen tedavi gruplarına istatistiksel olarak üstünlük göstermediği görülmüştür.

7. SONUÇ

Ginkgo biloba ekstresi ve selenyum preparatları günümüzde kolay ulaşılabilir, çok çeşitli ve ucuz preparatlardır. Koruyucu etkinliği birçok çalışma ile gösterilmiş olan bu ajanların düzenli aralıklarla kullanımı durumunda tedavi edici etkinliği de öngörülmüştür. Bu nedenle planlanan bu çalışmada ginkgo biloba ve selenyum serebral dokuda oluşan iskemi-reperfüzyon hasarını azaltarak biyokimyasal ve histolojik sonuçlarıyla bu öngörüü desteklemiştir. Sonuçlarımızın alışılmış iskemi-reperfüzyon hasarı tedavisinde klinik uygulamalara katkı sağlayacağı inancındayız.

8. KAYNAKLAR :

1. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *The British Journal of Surgery*. 1994; 81(5):637-647
2. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *Journal of Pathology*. 2000; 190:255-266.
3. Neumar RW. Molecular mechanisms of ischemic neuronal injury. *Ann Emerg Med*. 2000; 36:483-506.
4. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiological Reviews*. 1999; 79 (4):1431-1568
5. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*. 1999; 22:391–397
6. Crack PJ, Taylor JM. Reactive oxygen species and the modulation of stroke. *Free Radical Biology & Medicine* 2005; 38:1433–1444
7. Chan PH. Reactive Oxygen Radicals in Signaling and Damage in the Ischemic Brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2001; 21:2–14
8. MacLennan KM, Darlington CL, Smith PF. The CNS effects of ginkgo biloba extracts and ginkgolide B. *Prog Neurobiol*. 2001; 67:235-257.
9. Smith JV, Luo Y. Studies on molecular mechanisms of Ginkgo biloba extract. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004; 64:465-472
10. Schweizer U, Brauer AU, Köhrle J, et al. Selenium and brain function: a poorly recognized liaison. *Brain Research Reviews*. 2004; 45:164–178.
11. Chen J, Berry MJ. Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases. *Journal of Neurochemistry*. 2003; 86:1-12
12. Sait Şen. Hücre zedelenmesi ders notları. Ege Ü. Tıp Fak. Patoloji AD.rev.2005
13. Contran RS, Kumar V, Collins T. Hücre zedelenmesi, Adaptasyonu ve Ölümü. In: Çevikbaş U, editör. *Temel Patoloji*, 7. basım, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi, 2003:3-31
14. Junqueira LC, Carneiro J. Sinir Dokusu ve Sinir Sistemi. In: Aytakin Y, Solakoğlu S, editors. *Temel Histoloji*. 10. basım, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi, 2006;161-189

15. Paker Ş. Histoloji. 2.Baskı. Bursa, Uludağ Üniversitesi Basımevi, 1990;187-203, 439-444
16. Dan W. Fawcett. Bloom and Fawcett A text Book of Histology. 11th Edition: 1986; 333-385
17. Gartner LP, Hiatt JL. Color Textbook of Histology. Second Edition: Philadelphia: WB Saunders Co, 2001;183-217
18. Snell RS. Klinik Nöroanatomi. 1. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 2000;48-299
19. Gray H. Gray's Anatomy. 38th Edition. London, Churchill Livingstone, 1995;1164-1165
20. Gökmen FG. Sistemik Anatomi. 1. Baskı. İzmir, Güven Kitapevi, 2003;615-720
21. Guyton AC. Textbook of Medikal Physiology (Türkçe 1. baskı), İstanbul; Merck Yayıncılık, 1987;942-981
22. İstanbul Tıp fakültesi Klinik Ders Kitapları. Nöroloji. 3. Baskı. İstanbul, 1989:90-91
23. Kutluk K. İskemik İnme. 1. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 2004: 1-35
24. Markus HS. Cerebral perfusion and stroke. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 2004; 75;353-361
25. Phan TG, Wright PM, Markus R, et al. Salvaging the ischaemic penumbra: more than just reperfusion? Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. 2002; 29:1–10
26. Clampe PC, Harvey RA. Lippincott's Illustrated reviews serisinden: Biyokimya. 2. Baskı, İstanbul, Nobel Kitapevi: 87-190
27. Bramlet HM, Dietrich WD. Pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma: Similarities and differences. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolizm. 2004; 24: 133-150
28. Hacke W, Hennerci M, Gelmers HJ, and Kramer G. Cerebral Ischemia. Springer- Verlag. 1991; 2:23-34
29. Blomgren K, Zhu C, Hallin U, Hagberg H. Mitochondria and ischemic reperfusion damage in the adult and in the developing brain. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2003; 304:551–559

30. Liang D, Dawson TM, Dawson VL. What have Genetically Engineered Mice Taught Us About Ischemic Injury? *Current Molecular Medicine*. 2004; 4:207-225
31. Aarts MM, Tymianski M. Molecular Mechanisms Underlying Specificity of Excitotoxic Signaling in Neurons. *Current Molecular Medicine* 2004; 4:137-147
32. Swanson RA, Ying W, Kauppinen TM. Astrocyte Influences on Ischemic Neuronal Death. *Current Molecular Medicine*. 2004; 4:193-205
33. Hoyte L, Barber PA, Buchan AM. The Rise and Fall of NMDA Antagonists for Ischemic Stroke. *Current Molecular Medicine*. 2004; 4:131-136
34. Akins PT, Atkinson RP. Glutamate AMPA receptor antagonist treatment for ischaemic stroke. *Current Medical Research and Opinion*. 2002; 18:9-13
35. Martin LJ, Al-Abdulla NA, Brambrink AM, et al. Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deorivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Research Bulletin*. 1998; 46(4):281- 309
36. Abe K, Aoki M, Kawagoe J, Yoshida, et al. Ischemic Delayed Neuronal Death: A Mitochondrial Hypothesis. *Stroke*. 1995; 26:1478-1489
37. Kristián T, Siesjö BK. Calcium in Ischemic Cell Death. *Stroke*. 1998; 29:705-718
38. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of Cell Death: The Calcium-Apoptosis Link. *Molecular Cell Biology*. 2003; 4:552-565
39. G. Nicholls DG. Mitochondria and calcium signaling. *Cell Calcium*. 2005; 38: 311–317
40. Calapai G., Marciano M. C., Corica F., Allegra A., Parisi A., Firisina N., Buemi M. Erythropoietin Protects Against Brain Ischemic Injury By Inhibition of Nitric Oxide Formation. *European Journal of Pharmacology* 2000; 401:349-356
41. Yakovlev AG, and Faden AI. Mechanisms of Neural Cell Death: Implications for Development of Neuroprotective Treatment Strategies. *The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2004; 1:5–16
42. Rami A. Ischemic neuronal death in the rat hippocampus: the calpain–calpastatin–caspase hypothesis. *Neurobiology of Disease*. 2003; 13:75–88
43. Philchenkov A. Caspases: potential targets for regulating cell death. *J. Cell. Mol. Med*. 2004; 8(4):432-444

44. Ünal-Çevik I, Kiliç M, Can A, et al. Apoptotic and Necrotic Death Mechanisms Are Concomitantly Activated in the Same Cell After Cerebral Ischemia. *Stroke*. 2004; 35:2189-2194;
45. Kimura H, Gules I, Meguro T, Zhang JH. Cytotoxicity in cerebral microvascular endothelial cell. *Brain research*. 2003; 990:148-156
46. Rabuffetti M, Scioratti C, Tarozzo G, et al. Inhibition of Caspase-1-Like activity by Ac-Tyr-Ala-Asp-Cholromethyl Ketone Induces Long-Lasting Neuroprotection in cerebral Ischemia through Apoptosis Reduction and Decrease of Proinflammatory Cytokines. *The Journal Neuroscience*. 2000; 20(12):4398-4404
47. Simon L, Szilagyi G, Bori Z, et al. (-)-D-Deprenyl attenuates apoptosis in experimental brain ischaemia. *European Journal of Pharmacology*. 2001; 430:235–241
48. Boldyrev A, Song R, Vladimir A, et al. Neuronal Cell Death and Reactive Oxygen Species. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2000; 20(4):433-450
49. Kontos HA. Oxygen Radicals in Cerebral Ischemia: The 2001 Willis Lecture. *Stroke*. 2001; 32:2712-2716
50. Nelson CW, Wei EP, Povlishock JT, et al. Oxygen radicals in cerebral ischemia. *The American Journal of Physiology*. 1992; 263(5 Pt 2):1356-1362
51. Tamer L, Polat G, Eskandari G, et al. Serbest radikaller. Tamer L, Polat G, Eskandari G, et al. Serbest radikaller. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 2000; 1:52-58
52. Mancardi D, Rindour L, Thomas DD, et al. The Chemical Dynamics of NO and Reactive Nitrogen Oxides: A Practical Guide. *Current Molecular Medicine*. 2004; 4:723- 749
53. Keynes RG, Garthwaite. Nitrogen Oxide and its Role in Ischaemic Brain Injury. *Current Molecular Medicine*
54. Gibson RM, Rothwell NJ, Feuvre RA. CNS injury: the role of the cytokine IL-1. *The Veterinary Journal*. 2004; 168:230–237
55. Wang CX, Shuaib A. Involvement of inflammatory cytokines in central nervous system injury. *Progress in Neurobiology*. 2002; (67):161–172
56. www.copewithcytokines.de/cope.cgi

57. Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *TRENDS in Cell Biology*. 2001; 11(9):372-377
58. Shohami E, Ginis I, Hallenbeck JM. Dual role of tumor necrosis factor alpha in brain injury. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 1999; 10:119-130
59. Rothwell N. Interleukin-1 and neuronal injury: mechanisms, modification, and therapeutic potential. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2003; 17:152–157
60. Dinarello CA. Interleukin-1beta. *Crit Care Med*. 2005; 33(12):460-462.
61. Allan SM, Pinteaux E. The interleukin-1 system: an attractive and viable therapeutic target in neurodegenerative disease. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 2003; 2(5):293-302.
62. Boutin H, Kimber I, Rothwell NJ, Pinteaux E. The expanding interleukin-1 family and its receptors: do alternative IL-1 receptor/signaling pathways exist in the brain? *Mol Neurobiol*. 2003 Jun;27(3):239-248
63. Giulian D, Woodward J, Young DG, et al. Interleukin-1 injected into mammalian brain stimulates astrogliosis and neovascularization. *J. Neurosci*. 1989; 8:2485–2490.
64. Brosnan CF, Litwak MS, Schroeder CE, et al. Preliminary studies of cytokine-induced functional effects on the visual pathways in the rabbit. *J. Neuroimmunol*. 1989; 25:227–239.
65. Eng LF, Yu A, Lee YL. Astrocytic response to injury. *Prog. Brain Res*. 1992; 94:353–365.
66. Correale J, Villa A. The neuroprotective role of inflammation in nervous system injuries. *J Neurol*. 2004; 251:1304–1316
67. Savitz SI, Erhardt JA, Anthony JV, et al. The novel beta-blocker, arvedilol, provides neuroprotection in transient focal stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000;20(8):1197-204
68. Kim YO, Leem K, Park J, et al. Cytoprotective effect of *Scutellaria baicalensis* in CA1 hippocampal neurons of rats after global cerebral ischemia. *Ethnopharmacol*. 2001; 77(2-3):183-188
69. Huang Q, Tatro JB. Alpha-melanocyte stimulating hormone suppresses intracerebral tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta gene expression

- following transient cerebral ischemia in mice. *Neurosci Lett.* 2002 16;334(3):186-90
70. Zhu Y, Saito K, Murakami Y, et al. Early increase in mRNA levels of pro-inflammatory cytokines and their interactions in the mouse hippocampus after transient global ischemia. *Neurosci Lett.* 2006;393(2-3):122-6
 71. Micera A, Puxeddu I, Aloe L, Levi-Schaffer F. New insights on the involvement of Nerve Growth Factor in allergic inflammation and fibrosis. *Cytokine & Growth Factor Reviews.* 2003; 14:369–374
 72. Barde YA. The nerve growth factor family. *Prog Growth Factor Res.* 1990; 2:237–248.
 73. Branchi I, Francia N, Alleva E. Epigenetic control of neurobehavioural plasticity: the role of neurotrophins *Behavioural Pharmacology.* 2004; 15(5-6):353-362
 74. Levi-Montalcini L. Selective growth-stimulating effects of mouse sarcomas on the sensory and sympathetic nervous system of chick embryos. *Journal of Experimental Zoology.* 1951; 116:321-362.
 75. Cohen S. Purification of a nerve-growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neurocytotoxic antiserum. *PNAS Proc. Natl. Acad. Sci* 1954/1960; 46:302-311
 76. Chao M. *Peptide Growth Factors and their Receptors II*, Sporn, M, and Roberts, A., eds., Springer-Verlag, NY, 1991 p. 135
 77. Wooten MW, Seibenhener ML, Mamidipudi V, et al. The atypical protein kinase C-interacting protein p62 is a scaffold for NF- κ B activation by nerve growth factor. *J Biol Chem.* 2001; 276:7709–7712
 78. Nykjaer A, Lee R, Teng KT, et al. Sortilin is essential for proNGF induced neuronal cell death. *NATURE.* 2004; 427(26):843-848
 79. Majdan, M. and Miller, F.D. Neuronal life and death decisions functional antagonism between the Trk and p75 neurotrophin receptors. *Int. J. Dev. Neurosci.* 1999; 17:153–161
 80. Semkova I, Krieglstein J. Neuroprotection mediated via neurotrophic factors and induction of neurotrophic factors. *Brain Research Reviews.* 1999; 30:176–188
 81. Leon A, Buriani A, Dal Toso R, et al. Mast cells synthesize, store, and release nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1994; 91:3739–3743.

82. Bischoff SC, Dahinden CA. Effect of nerve growth factor on the release of inflammatory mediators by mature, human basophils. *Blood*. 1992; 79:2662–2669
83. Aloe L, Tuveri MA. Nerve growth factor and autoimmune rheumatic diseases. *Clin Exp Rheum*. 1997; 15:433–438
84. Wang ZF, Tang LL, Yan H, Wang YJ, Tang XC. Effects of huperzine A on memory deficits and neurotrophic factors production after transient cerebral ischemia and reperfusion in mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2006; 83(4):603–611
85. Debeir T, Marien M, Ferrario J, Rizk P, et al. In vivo upregulation of endogenous NGF in the rat brain by the alpha2-adrenoreceptor antagonist dexefaroxan: potential role in the protection of the basolocortical cholinergic system during neurodegeneration. *Exp Neurol*. 2004; 190(2):384–395
86. Sun N, Zou X, Shi J, et al. Electroacupuncture regulates NMDA receptor NR1 subunit expression via PI3-K pathway in a rat model of cerebral ischemia-reperfusion. *Brain Res*. 2005; 1064(1-2):98–107
87. Soltys Z, Janeczko K, Orzylowska-Sliwinska O, et al. Morphological transformations of cells immunopositive for GFAP, TrkA or p75 in the CA1 hippocampal area following transient global ischemia in the rat. A quantitative study. *Brain Res*. 2003; 987(2):186–193
88. Zhu Y, Culmsee C, Semkova I, Krieglstein J. Stimulation of β_2 -Adrenoceptors Inhibits Apoptosis in Rat Brain After Transient Forebrain Ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 1998; 18:1032–1039
89. Bonini S, Lambiase A, Bonini S, Levi-Schaffer F, Aloe L. Nerve growth factor: an important molecule in allergic inflammation and tissue remodelling. *Int Arch Allergy Immunol*. 1999; 118:159–162
90. Öztürk Feral. Apoptoz. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 2002; 9(2):143–148
91. Cohen JJ. Apoptosis. To be or not to be. *Postgraduate Syllabus* 1998; 1:1–19.
92. Kerr JFC, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis; a basic biological phenomenon with wide- ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26:239–257

93. Fox CK, Furtwaengler A, Nepomuceno RR, et al. Apoptotic pathways in primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis. *Liver* 2001; 21(4):272-279
94. Öktem S, Özhan MH, Özol D. Apoptozisin Önemi. *Toraks Dergisi*. 2001; 2(1):91-95
95. Ovalı E, Apoptosis, İn: Ustaçelebi Ş, Temel ve Klinik Mikrobiyoloji E, Apoptosis, Mikrobiyoloji, Ankara, Güneş Kitabevi. 1999; PP:195-203
96. Gavrieli Y, Sherman Y, Sasson SAB. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Cell Biology* 1992; 119:493-501
97. Wyllie AH. What is apoptosis? *Histopathology*. 1986; 10: 995-998
98. Reed JC. Warner-Lambert/Pekte-Davis award lecture: mechanism of apoptosis. *Am. J. Pathol.* 2000; 157:1415-1430
99. Locksley RM, Kilen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 2001; 104:487-500
100. Kanan K, Jain SK. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology*. 2000; 7(27):153–163
101. Love S. Apoptosis and brain ischaemia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003; 27(2):267-282
102. Sugawara T, Fujimura M, Noshita N, et al. Neuronal Death/Survival Signaling Pathways in Cerebral Ischemia. *The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2004; (1):17–25
103. Lossi L, Cantile C, Tamagno I, Merighi A. Apoptosis in the mammalian CNS: Lessons from animal models. *The Veterinary Journal*. 2005; 170:52–66
104. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: Signaling and modulation. *Science*. 1998; 281:1305-1308
105. Gogvadze V, Orrenius S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Chemico-Biological Interactions*. 2006;
106. Borner C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Molecular Immunology*. 2003; 39:615–647
107. Polster BM, Fiskum G. Mitochondrial mechanisms of neural cell apoptosis. *Journal of Neurochemistry*. 2004; 90:1281–1289

108. Pak H. Chan. Mitochondria and Neuronal Death/Survival Signaling Pathways in Cerebral Ischemia. *Neurochemical Research*, 2004; 29(11):1943–1949
109. Cooper GM. Cell signaling. In: *The cell: a molecular approach*. ASM press, 2th edition, Washington D.C, 2000; 13, PP:523-552
110. Johnson EA, Svetlov SI, Wang KW, et al. Cell-specific DNA fragmentation may be attenuated by a survivin-dependent mechanism after traumatic brain injury in rats. *Experimental Brain Research*. 2005; 167(1):17-26
111. Jones PA, May GR, McLuckie JA, et al. Apoptosis is not an invariable component of in vitro models of cortical cerebral ischaemia. *Cell Research*. 2004; 14(3):241-250
112. Benchoua A, Gue´gan C, Couriaud C, et al. Specific Caspase Pathways Are Activated in the Two Stages of Cerebral Infarction. *The Journal of Neuroscience*, 2001; 21(18):7127–7134
113. Xu XH, Zhang SM, Yan WM, et al. Development of cerebral infarction, apoptotic cell death and expression of X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein following focal cerebral ischemia in rats. *Life Sciences*. 2006; 78:704-712
114. Li Y, Powers C, Jiang N, Chopp M. Intact, injured, necrotic and apoptotic cells after focal cerebral ischemia in the rat. *Journal of the Neurological Sciences*. 1998, 156:119-132
115. Haia J, Linb Q, Lia ST, Pana QG. Chronic cerebral hypoperfusion and reperfusion injury of restoration of normal perfusion pressure contributes to the neuropathological changes in rat brain. *Molecular Brain Research*. 2004; 126:137–145
116. Unal I, Ozdemir Y, Bolay H, et al. Chronic daily administration of selegeline and Egb 761 increases brain's resistance to ischemia in mice. *Brain Res*. 2001; 917:174-181.
117. Ahlemeyer B, Krieglstein J. Neuroprotective effects of Ginkgo biloba extract. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2003; 60:1779-1792
118. Ponto B. L. L, Schultz S, K. Ginkgo biloba Extract: Review of CNS Effects. *Annals of Clinical Psychiatry*. 2003; 15(2):109-119
119. Ikeda K, Negishi H, Yamori Y. Antioxidant nutrients and hypoxia/ischemia brain injury in rodents. *Toxicology*. 2003; 189:55-61

120. Ahlemeyer B, Junker V, Huhne R, Krieglstein J. Neuroprotective effects of NV-31, a bilobalide-derived compound: evidence for an antioxidative mechanism. *Brain Research* 2001; 890:338–342
121. Bridi R, Crossetti FP, Steffen VM, Henriques AT. The Antioxidant Activity of Standardized Extract of Ginkgo biloba (EGb 761) in Rats. *Phytother. Res.* 2001; 15: 449–451
122. Calapai G ve ark. Neuroprotective effects of Ginkgo biloba extract in brain ischemia are mediated by inhibition of nitric oxide synthesis. *Life Sciences* 2000; 67:2673–2683
123. DeFeudis F, Drieu K. Ginkgo biloba extract (Egb 761) and CNS functions: basic studies and clinical applications. *Current Drug Targets.* 2000; 1:25-58
124. DeFeudis F.V. Bilobalide and Neuroprotection. *Pharmacological Research.* 2002; 46(6):565-568
125. Clark WM, Rinker LG, Lessov NS, et al. Efficacy of Antioxidant Therapies in Transient Focal Ischemia in Mice. *Stroke.* 2001; 32:1000-1004
126. Lee EJ, Chen HY, Wu TS, et al. Acute Administration of Ginkgo biloba Extract (EGb 761) Affords Neuroprotection Against Permanent and Transient Focal Cerebral Ischemia in Sprague-Dawley Rats. *Journal of Neuroscience Research.* 2002; 68:636-645
127. Smith P, Maclennan K, Darlington C. The neuroprotective properties of the Ginkgo biloba leaf: a review of the possible relationship to platelet-activating factor (PAF) *J Ethnopharmacol.* 1996; 50:131-139
128. Donato G, Volpentesta G, Lavano A, et al. Effects of Ginko Biloba and caspase inhibitors on brain ischemia in the Mongolian Gerbil. *J Neurosurg Sci.* 2003; 47(3):149-155
129. Dasa A, Shankera G, Natha C, et al. A comparative study in rodents of standardized extracts of Bacopa monniera and Ginkgo biloba Anticholinesterase and cognitive enhancing activities. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* 2002; 73:893–900
130. Itegin M. Seleyum: Hem eser elementtir hem de zehirdir. *ARSIV.* 2002; 11:305-320

131. Burk RF, Hill KE, Motley AK. Selenoprotein metabolism and function: evidence for more than one function for selenoprotein P. *J Nutr.* 2003;133(5 Suppl1):1517-1520.
132. Hardy G, Hardy I. Selenium: the Se-XY nutraceutical. *Nutrition.* 2004; 20(6):590-593
133. Gupta R, Singh M, Sharma A. Neuroprotective effect of antioxidants on ischaemia and reperfusion-induced cerebral injury. *Pharmacol Res.* 2003; 48(2):209-215.
134. Arteel GE, Sies H. The biochemistry of selenium and the glutathione system. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 2001; 10:153-158
135. Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomed Pharmacother.* 2003; 57(3-4):134-144
136. Tinggi U. Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review. *Toxicol Lett.* 2003; 137(1-2):103-110
137. Imai H, Graham DI, Masayasu H, Macrae IM. Antioxidant ebselen reduces oxidative damage in focal cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med.* 2003; 34(1):56-63
138. Porciuncula LO, Rocha JB, Boeck CR, et al. Ebselen prevents excitotoxicity provoked by glutamate in rat cerebellar granule neurons. *Neurosci Lett.* 2001; 299(3):217-220
139. Santamaria A, Salvatierra-Sanchez R, Vazquez-Roman B, et al. Protective effects of the antioxidant selenium on quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats: in vitro and in vivo studies. *J Neurochem.* 2003; 86(2):479-488
140. Patrick L. Selenium biochemistry and cancer: a review of the literature. *Altern Med Rev.* 2004; 9(3):239-58
141. Combs GF Jr, Gray WP. Chemopreventive agents: selenium. *Pharmacol Ther.* 1998; 79(3):179-92
142. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* 4th ed. Academic Pres, New York, USA. 2002.
143. Kwon YS, Ann HS, Nabeshima T, et al. Selegiline potentiates the effects of EGb 761 in response to ischemic brain injury. *Neurochem Int.* 2004; 45(1):157-170
144. Chandrasekaran K, Mehrabian Z, Spinnewyn B, et al. Neuroprotective effects of bilobalide, a component of Ginkgo biloba extract (EGb 761) in global brain

- ischemia and in excitotoxicity-induced neuronal death. *Pharmacopsychiatry*. 2003; 36(1):89-94
145. Dawson DA, Masayasu H, Graham DI, Macrae IM. The neuroprotective efficacy of ebselen (a glutathione peroxidase mimic) on brain damage induced by transient focal cerebral ischaemia in the rat. *Neurosci Lett*. 1995; 185(1):65-69
 146. Takasago T, Peters EE, Graham DI, et al. Neuroprotective efficacy of ebselen, an anti-oxidant with anti-inflammatory actions, in a rodent model of permanent middle cerebral artery occlusion. *Br J Pharmacol*. 1997; 122(6):1251-1256
 147. Kumral A, Uysal N, Tugyan K, et al. Erythropoietin improves long-term spatial memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Behav Brain Res*. 2004; 153(1):77-86
 148. Letechipia-Vallejo G, Gonzalez-Burgos I, Cervantes M. Neuroprotective effect of melatonin on brain damage induced by acute global cerebral ischemia in cats. *Arch Med Res*. 2001; 32(3):186-192
 149. Paterson IA, Barber AJ, Gelowitz DL, Voll C. (-)Deprenyl reduces delayed neuronal death of hippocampal pyramidal cells. *Neurosci Biobehav Rev*. 1997; 21(2):181-6
 150. Shang Y, Cheng J, Qi J, Miao H. Scutellaria flavonoid reduced memory dysfunction and neuronal injury caused by permanent global ischemia in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 2005; (82):67-73
 151. Clemens JA, Stephenson DT, Smalstig EB, et al. Global ischemia activates nuclear factor-kappa B in forebrain neurons of rats. *Stroke*. 1997; 28(5):1073-1081
 152. Nitatori T, Sato N, Waguri S, et al. Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis. *J Neurosci*. 1995; 15(2):1001-11
 153. Xia C, Yin H, Borlongan CV, Chao J, et al. Postischemic infusion of adrenomedullin protects against ischemic stroke by inhibiting apoptosis and promoting angiogenesis. *Experimental Neurology*. 2006; (197): 521–530
 154. Noto T, Masayuki Ishiye M, et al. Neuroprotective effect of tacrolimus (FK506) on ischemic brain damage following permanent focal cerebral ischemia in the rat. *Molecular Brain Research*. 2004; (128):30–38

155. Li Z, Britton M, Sima AF, et al. Diabetes enhances apoptosis induced by cerebral ischemia. *Life Sciences*. 2004; (76):249–262
156. Sharma P, Karain J, Sharma S, et al. Pyruvate ameliorates post ischemic injury of rat astrocytes and protects them against PARP mediated cell death. *Brain Research*. 2003; (992):104-113
157. Harvey BK, Chang CF, Chian YH, et al. HSV amplicon delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor is neuroprotective against ischemic injury. *Experimental Neurology*. 2003; (183):47-55
158. Bruno MA, Cuello AC. Activity-dependent release of precursor nerve growth factor, conversion to mature nerve growth factor, and its degradation by a protease cascade. *PNAS*. 2006; 103(17):6735–6740
159. Oderfeld-Nowak B, Orzylowska-Sliwinska O, SoltysZ, et al. Concomitant up-regulation of astroglialhigh and low affinity nerve growth factor receptors in the CA1 hippocampal area following global transient cerebral ischemia in rat. *Neuroscience*. 2003; (120):31–40
160. Takman R, Jiang H, Schaefer E, et al. Nerve growth factor pretreatment attenuates oxygen and glucose deprivation-induced c-Jun amino-terminal kinase 1 and stress-activated kinases p38alpha and p38beta activation and confers neuroprotection in the pheochromocytoma PC12 Model. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2004; 22(3):237-250.

9. EKLER

Etik Kurul Raporu:

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DENEY HAYVANI ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

35340, Inciraltı, İzmir-232 277777-2254
http://tip.deu.edu.tr/etik/denevetik/

Sayı : 113
Tarih : 02/09/2004
Toplantı No : 04/10/113
Toplantı Tarihi : 01/09/2004

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü, Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı, Histoloji Embriyoloji Doktora Programı Öğrencisi **Seda ÖZBAL**'ın sorumlu olduğu "**Deneysel İskemi-Referfüzyon Hasarında Deprenyl ve Selenyumun Hippocampus Üzerine Histolojik Etkileri**" isimli projede araştırmacı tarafından yapılan değişiklikler uygun bulunmuştur. Projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Doç. Dr. Mustafa ÖLGÜNER
Deney Hayvanı Araştırmaları Etik Kurul Başkanı

Değişiklik Karar Örneği:

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ YÖNETİM KURULU KARARLARI

TOPLANTI SAYISI	: 31	TOPLANTI GÜNÜ	: Salı
TOPLANTI TARİHİ	: 28.09.2004	TOPLANTI GÜNÜ	: 10.00

KARAR 22/ Enstitümüz Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Histoloji – Embriyoloji doktora programı öğrencisi Seda ÖZBAL'ın, tez danışmanı Yrd.Doç.Dr. Güven ERBİL tarafından 27.09.2004 tarihli yazı ile önerilen ve Etik Kurul onayı alınan aşağıdaki tez konusu değişikliğinin kabulüne mevcudun oy birliği ile karar verildi.
Tez konusu : 'Deneysel İskemi Reperfüzyon Hasarında Ginkgo Biloba (EGb 761) ve Selenyumun Beyin Dokusu Üzerine Histolojik Etkileri'

İMZA
Prof.Dr. Gül GÜNER
Enstitü Müdürü

İMZA
Prof.Dr. Mine YÜCESOY
Müdür Yardımcısı

İMZA
Prof.Dr. Neşe ATABEY
Üye

İMZA
Prof.Dr. Yeşim TUNÇOK
Müdür Yardımcısı

İMZA
Prof.Dr. Berna MUSAL
Üye

BULUNAMADI
Prof.Dr. Süleyman TETİK
Üye

ASLI GİBİDİR
Bahriye DEMİREL
Enstitü Sekreteri